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

**Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça frescal
refrigerada através do uso de óleo essencial de orégano e
nisina**

Monika Francisca Kruger

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2006

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

**Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça
frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de
orégano e nisina**

Monika Francisca Kruger

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Assoc. Bernadette D.G.M. Franco

São Paulo
2006

Monika Francisca Kruger

**Controle de *Listeria monocytogenes* em lingüiça
frescal refrigerada através do uso de óleo essencial de
orégano e nisina**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Assoc. Bernadette D.G.M. Franco
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

*À minha família e aos amigos, pelo amor,
confiança, e apoio. Em especial aos meus pais,
Armin (in memoriam) e Elza pela dedicação e
compreensão e à minha tia Brunilde pelo
carinho e incentivo profissional, ensinando-me
o amor e o respeito à microbiologia.*

Agradecimentos

À minha orientadora, **Prof^a Dra. Bernadette D. G. de M. Franco**, pela confiança em meus esforços, pelo apoio, e orientação segura durante todo o curso de mestrado.

À **Prof^a Dra. Maria Teresa Destro**, e à **Prof^a Dra. Marisa Landgraf**, pelo incentivo, pelo apoio e pelas sugestões nos momentos de dúvidas.

Ao **Prof^o Júlio da Motta Singer** do Departamento de Matemática Estatística do IME / USP, pelas explicações, correções e sugestões nas análises estatísticas, e principalmente pela paciência.

À **Kátia** e à **Lúcia**, funcionárias do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo apoio, colaboração e amizade.

À **Kátia Lima**, pela amizade sincera, apoio e paciência durante meu período de estágio no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

Aos amigos do laboratório, **Antônio, Cecília, Vanessa, Lina, João, Vinícius, Cristina Garcia, Ângela, Cristina Cruz, Hans, Patrícia Kary, Daniela, Gabriela, Tatiana, Marildes** e principalmente os amigos do “grupo de estudos da física” **Alcina, Patrícia Bettini, Paulo, Ricardo, Janine, Cristiano, Susana, Eb, Vanessa Tsuhako, Ana, Vanessa Biscola e Gunnar**, pelo companheirismo, troca de conhecimentos, participação e incentivo.

Ao **Paulo Sobrinho** pela análise estatística, pelas explicações, paciência, troca de conhecimentos e amizade.

Aos funcionários da secretaria de pós graduação **Jorge e Elaine**, pela paciência e disposição.

Às secretárias **Mônica e Tânia**, pela colaboração e ajuda nos momentos necessários.

Aos meus amigos “irmãos”, sempre presentes, **Angélica, André, Paulo, Anderson, Wellington, Alberto (Beto) e Gustavo** pelo apoio, carinho, ombro amigo, broncas e cumplicidade.

Aos meus irmãos, **Rainer, Karin e Roberto**, pelo amor, respeito, compreensão e apoio em todos os momentos de minha vida, aos dois últimos, também por permitirem que uma nova força faça parte de nossas vidas, que veio carinhosamente com o nome de **Anna Luiza**.

Ao **Fábio de Oliveira Franco e Vanessa Biscola** pelo auxílio e disposição para a realização da análise sensorial.

À empresa **EMBRARAD**, nas pessoas de Osnir, Eduardo, Beatriz e Dirceu pela colaboração na execução deste trabalho.

À empresa **KRAKI**, na pessoa de Daniela, que gentilmente forneceu os condimentos e tripas para elaboração das lingüiças.

À empresa **DUAS RODAS** que forneceu os óleos essenciais.

À empresa **DANISCO**, na pessoa de Adriana, que gentilmente forneceu a nisina.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de estudo.

A todos que participaram da sessão de análise sensorial ou que cooperaram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

<u>LISTA DE TABELAS.....</u>	<u>X</u>
<u>LISTA DE FIGURAS.....</u>	<u>XI</u>
<u>LISTA DE ANEXOS.....</u>	<u>XIV</u>
<u>RESUMO.....</u>	<u>XV</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>XVII</u>
<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>01</u>
<u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>04</u>
<u>2.1. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i></u>	<u>04</u>
<u>2.2. ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....</u>	<u>06</u>
2.2.1. BACTERIOCINAS	08
2.2.1.1. Bacteriocinas da Classe I.....	10
2.2.1.2. Nisina.....	11
2.2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS	16
2.2.2.1. Óleo essencial de orégano (O.E.O.)	18
<u>3. OBJETIVOS</u>	<u>25</u>

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<u>4. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>25</u>
4.1. CULTURA MICROBIANA E PREPARO DO INÓCULO	25
4.2. ANTIMICROBIANOS NATURAIS.....	26
4.3. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO " <i>IN VITRO</i> " DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SCOTT A POR ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NISINA	26
4.4. AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SCOTT A EM LINGÜIÇA FRESAL REFRIGERADA POR ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NISINA	27
4.4.1. FABRICAÇÃO E INOCULAÇÃO DAS LINGUIÇAS.....	27
4.5. ENUMERAÇÃO DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> NAS AMOSTRAS DE LINGÜIÇA FRESAL REFRIGERADA	31
4.6. ANÁLISE SENSORIAL	32
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>34</u>
5.1. EFEITO COMBINADO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NISINA NO CONTROLE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SCOTT A EM MEIO DE CULTURA.....	34
5.2. EFEITO COMBINADO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO E NISINA NO CONTROLE DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> SCOTT A EM LINGÜIÇA FRESAL REFRIGERADA	43
5.3. ANÁLISE SENSORIAL	52

6. CONCLUSÕES.....	53
---------------------------	-----------

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos nos alimentos, adaptado de Gould (1996).	06
Tabela 2. Sistemas antimicrobianos naturais em alimentos, adaptado de Gould (1996).	07
Tabela 3. Classificação de Bacteriocinas, adaptado de Cleveland <i>et al.</i> (2001).	09
Tabela 4. Exemplos de lantibióticos conhecidos atualmente, adaptado de McAuliffe, Ross e Hill (2001).	11
Tabela 5. Efeito de nisina combinada com outros fatores no controle de <i>Listeria monocytogenes</i> , adaptado de Devlieghere <i>et al.</i> (2004).	15
Tabela 6. Efeito inibitório de óleo essencial de orégano contra microrganismos, adaptado de Burt (2004).	20
Tabela 7. Composição de componentes fenólicos em óleo essencial de orégano, adaptado de Burt (2004).	22
Tabela 8. Atividade antimicrobiana de carvacrol e timol contra diversos microrganismos, adaptado de Dorman e Deans (2000).	23
Tabela 09. Formulação 1 de lingüiça frescal.	30
Tabela 10. Formulação 2 de lingüiça frescal.	30
Tabela 11. Formulação 3 de lingüiça frescal.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da nisina Z.	12
Figura 2. Estrutura química de carvacrol, timol, p-cimeno e γ -terpineno.	21
Figura 3. Representação das medidas dos halos realizada no experimento “ <i>in vitro</i> ”.	27
Figura 4. Representação esquemática das etapas de preparo de lingüiça frescal contendo <i>L. monocytogenes</i> e antimicrobianos naturais.	28
Figura 5. Inibição de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação de diferentes concentrações de nisina e óleo essencial de orégano, determinada pelo método de difusão em poços a 37°C.	34
Figura 6. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano na ausência de nisina, pelo método de difusão em poços a 37°C.	39
Figura 7. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 100 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.	39
Figura 8. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 200 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.	39
Figura 9. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 400 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.	39
Figura 10. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 600 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.	39
Figura 11. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 800 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.	39

- Figura 12.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1000 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 13.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1200 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 14.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1400 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 15.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1600 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 16.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1800 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 17.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 2000 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C. 40
- Figura 18.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,05% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C. 41
- Figura 19.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,10% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C. 41
- Figura 20.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,20% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C. 41
- Figura 21.** Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,30% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C. 41

Figura 22. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 0,40% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.	41
Figura 23. Medida do halo de inibição (mm) de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A pela ação combinada de 0,50% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.	41
Figura 24. Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 1.	45
Figura 25. Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 2.	45
Figura 26. Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 3.	45
Figura 27. Efeito da combinação de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano e 200 ppm de nisina contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A nas diferentes formulações de lingüiça frescal refrigerada.	47
Figura 28. Efeito de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A nas diferentes formulações de lingüiça frescal refrigerada.	47
Figura 29. Efeito de 200 ppm de nisina contra <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A nas diferentes formulações de lingüiça frescal refrigerada.	48
Figura 30. Multiplicação de <i>Listeria monocytogenes</i> nas diferentes formulações de lingüiça frescal refrigerada não adicionada de óleo essencial de orégano ou nisina.	48
Figura 31. Variações nas contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> nas diferentes formulações de lingüiça frescal refrigerada submetidas aos tratamentos com óleo essencial de orégano e/ou nisina.	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Cadastro de provadores	71
Anexo 2. Aprovação do comitê de ética	74

Resumo

Listeria monocytogenes é conhecida como um importante patógeno causador de doenças transmitidas por alimentos na última década. Apesar do número de casos por ano ser relativamente baixo, a infecção pode ser grave, com mortalidades acima de 30%. Pesquisas realizadas no Brasil relataram uma incidência de 32% em amostras de produtos cárneos, e o microrganismo foi encontrado em 80% das amostras lingüiças frescal de carne suína. Apesar dos recentes avanços nas tecnologias de controle de patógenos em alimentos, os consumidores têm procurado alimentos “naturais”, isto é, submetidos a tratamentos menos agressivos e isentos de conservadores químicos. Antimicrobianos naturais são uma opção interessante, mas sua aplicação requer uma melhor compreensão de sua funcionalidade nos alimentos. Os óleos essenciais e seus compostos fenólicos estão se tornando agentes antimicrobianos naturais bastante populares, assim como a nisina, uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Esta pesquisa foi desenvolvida para avaliar o efeito de óleo essencial de orégano (O.E.O.) e de nisina, individualmente ou em combinação, na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A *in vitro* (em meio de cultura e *in situ* - em lingüiça frescal suína). A atividade inibitória foi testada pela metodologia de difusão em poços, e os halos de inibição foram medidos 24 horas após a incubação à 37°C. Foram testadas as concentrações 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5% (v/v) de O.E.O. e 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 ppm de nisina. Quando o óleo essencial foi usado em combinação com a nisina foi observado um efeito sinérgico na inibição de *L. monocytogenes*. As concentrações que apresentaram o maior efeito contra o patógeno nos testes *in vitro*, ou seja 0,5% (v/v) O.E.O. com 200 ppm de nisina, foram utilizadas nos experimentos com três formulações diferentes lingüiça frescal, contendo pernil de porco, sal (2%), nitrito (0,015%), condimentos, emulsificantes e antioxidantes, experimentalmente contaminadas com *L. monocytogenes* Scott A (10^6 UFC/g). A multiplicação do patógeno foi monitorada no produto refrigerado a 5°C por até 10 dias, através da contagem em placas. Controles sem antimicrobianos também foram estudados. Os resultados indicaram que o O.E.O., usado isoladamente, não conferiu proteção ao alimento. A nisina causou uma redução de 2 log imediatamente após o contato com o microrganismo, mas durante o armazenamento, as células sobreviventes apresentaram a mesma taxa de multiplicação que na lingüiça controle ($\alpha \leq 0,05$), mantendo as contagens

2 log inferiores as do controle por até 9 dias. Quando os dois antimicrobianos foram usados em combinação, a redução imediata após o contato foi de 4 log, e, quando comparado ao controle, a taxa de multiplicação durante o armazenamento a 5°C foi significativamente mais altas que no controle ($\alpha \leq 0,05$). Entretanto, as amostras de lingüiça contendo esses antimicrobianos nas concentrações testadas não foram aprovadas nos testes sensoriais de aceitação ($\alpha \leq 0,05$). Esses resultados indicam que a combinação desses antimicrobianos pode ser utilizada como uma barreira adicional para a multiplicação de *L.monocytogenes* em lingüiça frescal suína, mas os atributos sensoriais que conferem ao produto podem limitar sua aplicação.

Palavras-chave: Antimicrobianos naturais, nisina, óleo essencial de orégano, *Listeria monocytogenes*, inibição, lingüiça frescal suína.

Abstract

Listeria monocytogenes has been recognized as an important foodborne pathogen for the past decade. Although the number of cases per annum is relatively low, the infections can be acute, with mortality up to 30%. In Brazil, some works reported that 32% of dairy meat products were contaminated with *L. monocytogenes*, and this organism was found in 80% of fresh pork sausage. In spite of modern improvements in food production techniques, the consumers are seeking for “natural” food products, i.e., not submitted to aggressive treatments or added of chemical preservatives. Natural antimicrobials are a promising option, but their application requires a better understanding of their functionality in foods. Naturally occurring antimicrobial agents, such as essential oils and their phenolic components, are becoming increasingly popular as preservation agents. Other compound with increased application in foods is nisin, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. This study aimed to evaluate the antimicrobial effect of oregano essential oil (O.E.O.) and nisin, individually or in combination, on the inhibition of growth of *Listeria monocytogenes* Scott A *in vitro* (agar culture medium) and *in situ* (fresh pork sausage). The inhibitory activity was tested by the well diffusion method, measuring the inhibition halos after 24 hours incubation at 37°C. The concentrations tested were 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% (v/v) for OEO and 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 and 2000 ppm for nisin. When the essential oil was used in combination with nisin, a synergistic effect was observed for *L. monocytogenes*, i.e., the oil enhanced the activity of the bacteriocin. The combination 0.5% (v/v) O.E.O. with 200 ppm nisin presented the best results and was used to test the functionality in fresh pork sausage prepared with three different formulations, containing deboned minced pork meat, 2% salt and 0.015% nitrite, plus spices, emulsifier and antioxidant, and experimentally contaminated with *L. monocytogenes* Scott A (10^6 CFU/g). The growth of the pathogen was monitored in the refrigerated product (5°C) up to 10 days, by means of plate counting. Controls without antimicrobials were included in the experiments. Results indicated that O.E.O., used alone, was not effective. Nisin alone caused a 2-log reduction immediately after contact, but during storage the surviving cells presented the same multiplication rate as in the control ($\alpha \leq 0.5$), keeping the counts 2 log lower up to 9 days. When used in combination, the two antimicrobials caused a 4-log count reduction immediately after

addition and, when compared to the control, the multiplication rate of the surviving cells during storage under refrigeration up to 10 days was significantly higher ($\alpha \leq 0.5$). However, samples containing these antimicrobials in the tested concentrations failed the sensorial acceptance tests ($\alpha \leq 0.5$). These results indicate that the combination of these antimicrobials can be an additional hurdle for the control of *L. monocytogenes* in fresh pork sausages, but the final sensorial attributes of the product may hamper their application.

Key-words: Natural antimicrobials, nisin, oregano essential oil, *Listeria monocytogenes*, inhibition, fresh pork sausage

1. Introdução

Apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade de alimentos, as doenças transmitidas por alimentos (DTA) continuam sendo um problema de saúde pública (Jay, 2005).

Diversos microrganismos podem causar DTA, e *Listeria monocytogenes* destaca-se devido à sua capacidade de sobreviver e proliferar em alimentos mantidos sob temperaturas de refrigeração, podendo também se desenvolver em atmosferas modificadas, devido a sua característica de microaerofilia (Rocourt, 1999; Ryser 1999). *L. monocytogenes* possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua presença em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico (Bersot *et al.*, 2001; Lukinmaa *et al.*, 2004; 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 lingüiças 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, etc. Além disso, lingüiças produzidas artesanalmente são submetidas a intenso manuseio durante seu processamento, aumentando a probabilidade de contaminação com microrganismos indesejáveis (Martinis e Franco, 1998; Liserre *et al.*, 2002; Samelis *et al.*, 2005).

Uma das formas de se controlar a multiplicação de microrganismos indesejáveis nos alimentos é o uso de conservadores químicos. No entanto, a utilização desses agentes não é compatível com a imagem de produtos “naturais”, de grande apelo comercial atualmente. Além disso, alguns conservadores adicionados aos alimentos, visando o aumento da segurança e da vida útil, podem levar à formação de compostos com efeito carcinogênico ao organismo humano, como ocorre com o nitrato adicionado à produtos cárneos (Rodgers, 2001; Pranoto, Rakshit e Salokhe, 2005).

A nisina é um exemplo de agente conservador natural com efeito inibitório sobre vários tipos de bactérias (Periago e Moezelaar, 2001). É uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, que possui ação inibitória comprovada contra bactérias Gram positivas, incluindo *L. monocytogenes*, *Clostridium* sp. e algumas espécies de *Bacillus*. A nisina age provocando a lise de células vegetativas através da

permeabilização da membrana citoplasmática, com a formação de poros que causam efluxo de constituintes intracelulares, levando a um completo colapso da força próton motriz (Martinis *et al.*, 2002; Guinane *et al.*, 2005). 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; Garneau, Martin e Vederas, 2002; Guinane *et al.*, 2005). Entretanto, o uso de nisina em alimentos pode ser limitado, já que perde sua estabilidade e sua atividade em pH alcalino (Cleveland *et al.*, 2001; Reunanen e Saris, 2004).

Segundo Kuipers, Buist e Kok (2000) e Riley e Wertz (2002), a utilização de nisina como único conservador em alimento não é a melhor opção, pois múltiplas exposições de um patógeno à nisina aumentam a probabilidade de seleção de mutantes resistentes estáveis. Segundo esses autores, a utilização de nisina em conjunto com outros obstáculos comumente utilizados na conservação de alimentos reduz a frequência da ocorrência de microrganismos resistentes.

Alguns estudos demonstraram que os efeitos da nisina podem ser potencializados pela sua associação com outros antimicrobianos naturais em baixas concentrações (Ettayebi, Yamani e Rossi-Hassani, 2000; Periago e Moezelaar, 2001; Dykes e Moorhead, 2002; Yamazaki *et al.*, 2004; Burt, 2004).

Certas ervas e condimentos, adicionados aos alimentos com o objetivo de melhorar suas características sensoriais, têm também ação efetiva como substâncias bactericidas e/ou bacteriostáticas (Mourey e Canillac, 2002; Dorman *et al.*, 2003; Baydar *et al.*, 2004; Demo *et al.*, 2005). Os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana são compostos fenólicos, como o timol, eugenol e carvacrol, presentes no tomilho, orégano e outros condimentos, que têm característica hidrofóbica, com atuação na membrana citoplasmática microbiana. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica, levando à ruptura da estrutura da membrana e de suas funções (Davidson e Naidu, 2000; Dorman *et al.*, 2003; Burt, 2004; Baydar *et al.*, 2004).

Estudos “in vitro” têm demonstrado a ação efetiva de extratos vegetais contra diversos microrganismos (Remmal *et al.* 1993; Pol e Smid, 1999; Marino, Bersani e Comi, 2001; Mourey e Canillac, 2002; Baydar *et al.*, 2004). Ettayebi, Yamani e Rossi-Hassani (2000) avaliaram o efeito combinado de nisina, timol, pH e temperatura contra *L. monocytogenes* e *B. cereus*, observando que concentrações baixas de nisina e de

timol resultam em efeito sinérgico contra *L. monocytogenes* quando a temperatura é próxima de 8°C e o pH é inferior a 7,0.

Este projeto de mestrado pretendeu verificar se o óleo essencial de orégano tem alguma capacidade de inibir a multiplicação de *L. monocytogenes* em lingüiça suína fresca refrigerada, e se existe algum efeito sinérgico quando o óleo essencial de orégano é usado em conjunto com a bacteriocina nisina. Se esse efeito for comprovado, o uso desses ingredientes em combinação poderá contribuir para o aumento da segurança microbiológica de lingüiça refrigerada, pelo menos em relação a *L. monocytogenes*, que é um patógeno de frequência elevadíssima nesse produto no Brasil (Destro, Serrano e Kabuki, 1992; Silva *et al.*, 2004).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é amplamente distribuído na natureza, podendo ser isolado do solo e fezes de humanos e de outros animais. A espécie patogênica é *Listeria monocytogenes*, sendo os alimentos os principais vetores. Uma importante característica deste patógeno é sua capacidade para multiplicar-se em temperaturas de refrigeração, podendo assim proliferar em alimentos mantidos nesta condição (Schillinger, Kaya e Lücke, 1991; Benkerroum *et al.*, 2005).

As bactérias do gênero *Listeria* são bastonetes curtos, Gram positivos, móveis (com flagelos peritríquios), apresentando reações de catalase e oxidase positivas. Em meio de cultura seletivo, suas colônias medem cerca de 0,2 a 0,8 mm de diâmetro, com aparência translúcida após 24 horas de incubação e, sob luz oblíqua em microscópio óptico, apresentam coloração verde-azulada (Rocourt, 1999; Ryser, 1999).

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

Listeria monocytogenes caracteriza-se por ser patogênica para indivíduos com algum comprometimento do sistema imunológico, tais como idosos, neonatos, pacientes com HIV, que podem apresentar infecção do sistema nervoso central (SNC), bacteremia e endocardite. No caso de mulheres grávidas pode também ocorrer aborto, parto prematuro e septicemia neonatal (Marco *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2004).

A importância deste patógeno está mais associada à mortalidade causada por sua infecção do que à morbidade. Slutsker e Schuchat (1999) comentam que, diferentemente de outras doenças causadas por alimentos, como a salmonelose, que raramente é fatal, a taxa de mortalidade da listeriose é alta, cerca de 20%. Altekruze, Cohen e Swerdlow (1997) comentam que taxas de mortalidade acima de 40% foram relatadas em casos de surtos de listeriose humana.

L. monocytogenes é frequentemente encontrada em carnes e produtos cárneos. Nos animais, este microrganismo pode ser encontrado nas fezes, sem que haja manifestação de sintomatologia (Jay, 1996; Martín *et al.*, 2004; Benkerroum *et al.*, 2005). Estudos realizados no Brasil demonstram que a presença de *L. monocytogenes* em alimentos cárneos também é freqüente. Destro, Kabuki e Serrano (1991) relataram uma incidência de 32% deste microrganismo em diferentes alimentos, como carne, lingüiça, salsicha, leite “in natura” e queijo tipo “Minas Frescal”. Quanto às lingüiças, 80% das amostras foram positivas para o microrganismo.

Bersot *et al.* (2001) pesquisaram a presença deste patógeno em 30 amostras de mortadela comercializadas na cidade de São Paulo, observando uma incidência de 36,7% para *Listeria* ssp. e de 26,7% para *Listeria monocytogenes*. Em uma pesquisa mais recente, Silva *et al.* (2004) estudaram a presença de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de lingüiças mistas do tipo frescal na região de Pelotas, RS. *Listeria* ssp. foi observada em 100% das amostras analisadas e 29,3% foram caracterizadas como *L. monocytogenes*. Esses resultados são preocupantes porque 16,6% das amostras positivas para o patógeno correspondiam ao produto final.

Lima, Rossini e Popermayer (2003) verificaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, através da análise de 106 amostras de cinco tipos diferentes de lingüiças (de carne suína, de carne de frango, tipo calabresa, mista e tipo toscana). A presença de *Listeria* sp. foi evidenciada em 62 amostras (58,5%) e *L. monocytogenes* em 11 amostras (10,4%). A maior ocorrência de *L. monocytogenes* foi em lingüiça de carne de frango (18,2 %).

Listeria monocytogenes possui elevada resistência fisiológica, sendo difícil controlar ou prevenir sua contaminação em alimentos, principalmente naqueles que não sofrem tratamento térmico durante o processamento. Sua capacidade de colonização, multiplicação, e formação de biofilmes nos equipamentos de plantas processadoras de alimentos tornam este microrganismo uma ameaça à indústria (Rórvik *et al.*, 2003). Assim, cuidados especiais, como adoção de boas práticas de higiene durante as etapas de produção de alimentos, associadas às técnicas de preservação do produto final tornam-se imprescindíveis (Fenlon, 1999; Bersot *et al.*, 2001; Devlieghere, Vermeiren e Debevere, 2004).

2.2. Antimicrobianos Naturais

A indústria de alimentos busca técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, como tratamentos intensos de calor, acidificação, congelamento, desidratação, e adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de microrganismos por métodos não-térmicos, como o uso de alta pressão hidrostática, utilização de pulsos eletromagnéticos, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada, utilização de compostos antimicrobianos naturais e bioconservação (Devlieghere, Vermeiren, Debevere, 2004). A Tabela 1 resume os procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos nos alimentos.

Tabela 1: Procedimentos existentes e emergentes para o controle de microrganismos nos alimentos, adaptado de Gould (1996)

Objetivo	Fundamento	Procedimento
Redução ou inibição da multiplicação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes	Conservadores	Adição de conservadores: inorgânicos (nitrito, sulfito), orgânicos (propionato, sorbato, benzoato) e antibióticos (natamicina) e bacteriocinas (nisina, pediocina)
	Baixa Atividade de Água	Liofilização e processo de cura
	Redução de Nutrientes Disponíveis	Compartimentalização de emulsões em água-e-óleo
	Retirada de Oxigênio	Embalagem com nitrogênio e vácuo
	Dióxido de Carbono	Embalagem com atmosfera modificada
	Acidificação	Adição de ácidos e fermentação
	Fermentação Alcoólica	Vinificação e fermentação em cervejarias
	Baixa Temperatura	Armazenagem sob refrigeração e congelamento
Inativação de microrganismos	Aquecimento	Pasteurização e esterilização
	Irradiação	Radiação ionizante
	Pressurização	Aplicação de alta pressão hidrostática
	Eletricidade	Cargas elétricas de alta voltagem
	Termosonificação	Aquecimento através de ultrasonificação à baixa pressão
	Lise Bacteriana	Enzimas bacteriolíticas (lisozima)

Nos últimos anos os consumidores passaram a exigir alimentos com mais qualidade, sem conservadores químicos e com longa vida útil. (Brul e Coote, 1999; Pranoto, Rakshit e Salokhe, 2005). Segundo Rodgers (2001), a utilização de agentes químicos para a conservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos

“frescos”. Além disso, a adição de nitrato a alimentos cárneos, visando o aumento da segurança e da vida útil, pode levar à formação de nitrosaminas, que tem efeito carcinogênico ao organismo humano (Abee, Krockel e Hill, 1995).

Em consequência ao aumento do interesse dos consumidores por produtos naturais ou minimamente processados (Zink, 1997; Cleveland *et al.*, 2001; Pranoto, Rakshit e Salokhe, 2005), o uso de antimicrobianos naturais pode ser uma alternativa aos métodos utilizados atualmente pela indústria alimentícia. Uma alternativa seria o uso combinado de diferentes tipos de tratamentos considerados subletais para promover a proteção dos alimentos e consumidores contra microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, através do efeito sinérgico apresentado entre os tratamentos (Brul e Coote, 1999).

Existem diversos agentes antimicrobianos naturais em animais, plantas e microrganismos. Na Tabela 2, estão descritos alguns sistemas antimicrobianos naturais conhecidos atualmente.

Tabela 2: Sistemas antimicrobianos naturais em alimentos, adaptado de Gould (1996)

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

Uma das vantagens do uso destes compostos em alimentos é a imagem de produto natural. Porém, a eficiência de seu uso depende de diversos fatores, como difusão em matrizes sólidas, solubilidade em meio aquoso, interação com os componentes do alimento (proteínas, carboidratos e lipídeos), eficácia como agente antimicrobiano e alterações nas características sensoriais (sabor e textura principalmente). Outro aspecto a ser levado em consideração é o espectro de atividade antimicrobiana e o surgimento de bactérias resistentes ao composto antimicrobiano natural (Devlieghere, Vermeiren e Debevere, 2004).

2.2.1. Bacteriocinas

Bacteriocinas são peptídeos ou proteínas biologicamente ativas que apresentam atividade inibitória sobre diversos microrganismos patogênicos de origem alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (Abee, Krockel e Hill, 1995; Caplice e Fitzgerald, 1999; Cleveland *et al.*, 2001; Riley e Wertz, 2002; Guerra e Pastrana, 2003). As bacteriocinas diferem dos antibióticos clássicos principalmente pelo seu limitado espectro antimicrobiano e por serem tóxicas às bactérias semelhantes às cepas produtoras da bacteriocina (Riley e Wertz, 2002).

Segundo Riley e Wertz (2002), a colicina é a bacteriocina mais estudada. A colicina é produzida por *Escherichia coli*, uma bactéria Gram negativa, que pode ser patogênica ao homem. Vários tipos de colicina já foram identificados, podendo apresentar atividade de RNase e DNase, capacidade de formar poros na membrana citoplasmática e de inibir a síntese de peptidoglicanos e LPS. As colicinas são ativas principalmente contra cepas de *E. coli* e espécies relacionadas a este microrganismo.

As bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas diferem das colicinas em muitos aspectos da sua fisiologia. Bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas possuem espectro antimicrobiano mais amplo do que as colicinas. Outra importante diferença é a organização genética, onde são observados tipicamente de 8 a 12 grupos de genes ativos em uma bactéria Gram positiva produtora de bacteriocina enquanto que são apenas 2 ou 3 requeridos para a produção de colicinas (Riley e Wertz, 2002).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são peptídeos sintetizados nos ribossomos, e contém aminoácidos diferentes daqueles encontrados nos peptídeos clássicos, como lantionina e β -metil-lantionina. São considerados diferentes dos antibióticos clássicos também quanto à síntese (antibióticos são produzidos através de condensação enzimática de aminoácidos livres), modo de ação, espectro antimicrobiano, toxicidade e mecanismos de resistência (Montville e Chen, 1998; Guinane *et al.*, 2005).

Em 1993, Klaenhammer definiu quatro classes distintas de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas, descritas na Tabela 3 (Klaenhammer, 1993). As bacteriocinas mais estudadas pertencem às classes I e II (Ennahar *et al.*, 2000).

Tabela 3: Classificação das bacteriocinas, adaptado de Cleveland *et al.* (2001)

Classe	Características	Bacteriocinas
I	Ia Lantibióticos, peptídeos pequenos (<5kDa), contendo aminoácidos lantionina e β -metil-lantionina, catiónicos e hidrofílicos com estrutura flexível	Nisina, lactinina 481
	Ib 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	IIa Peptídeos pequenos (<5kDa), estáveis ao calor, sintetizados através de resíduos de glicina, ativos contra <i>Listeria</i> , contendo uma sequência YGNGV-C no N-terminal	Pediocina PA-1, sakacinas A e P, leucocina A, carnobacteriocinas, etc.
	IIb 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 dependente da associação de um ou mais grupos funcionais (carboidratos ou fosfolípidios)	Plantaricina S, leucocina S, lactacina 27 e pediocina SJ-1

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas agem através de alterações na membrana citoplasmática. A interação entre a bacteriocina e a célula ocorre 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). A atividade das bacteriocinas na permeabilização da membrana citoplasmática de bactérias Gram positivas pode ser explicada pela sua natureza anfifílica. Montville, Winkowski e Ludescher (1995) e Jack, Tagg e Ray (1995) sugerem dois esquemas para explicar esta ação: aquele no qual a bacteriocina provoca a formação de poros na membrana citoplasmática e outro, no qual a bacteriocina age através de sua natureza catiônica (surfactante), como detergente, causando desestabilização da integridade da membrana.

Em estudo mais recente, McAuliffe, Ross e Hill (2001) reportaram que lantibióticos tipo A agem de uma maneira dependente de receptor específico na membrana citoplasmática da célula alvo. Já bacteriocinas da classe II interagem com receptores protéicos da membrana para ocorrer sua inserção, porém de modo independente de voltagem. Lantibióticos tipo B formam poros na membrana através da interferência em atividades enzimáticas essenciais das células alvo.

O alvo primário destes peptídeos produzidos por bactérias lácticas é a membrana de células sensíveis, onde eles atuam dissipando a força próton motriz (FPM) através da formação de pequenos poros na membrana citoplasmática, privando a célula de sua

fonte essencial de energia (Chung, Montville e Chikindas, 2000). A FPM, composta de um componente químico (gradiente de pH – ΔpH) e um componente elétrico (potencial de membrana – $\Delta\Psi$), controla a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos. O colapso da FPM, induzido pela ação de bacteriocinas, leva à morte da célula através da cessação de reações que requerem energia (McAuliffe, Ross e Hill, 2001).

A atividade inibitória destas substâncias é limitada às bactérias Gram positivas. A membrana externa de bactérias Gram negativas contém lipopolissacarídeos que atuam como uma barreira contra macromoléculas e solutos hidrofóbicos, como as bacteriocinas (Rodgers, 2001). Segundo Abee *et al.* (1994), a membrana externa de bactérias gram negativas possui permeabilidade para substâncias com peso molecular inferior a 600 Da. A menor bacteriocina produzida por bactérias lácticas possui aproximadamente 3 kDa, portanto, muito grande para passar pela membrana externa.

Hanlin *et al.* (1993) e Samelis *et al.* (2005) comentam que existem três limitações para o uso de bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas como conservadores em alimentos: 1- não são ativas contra bactérias deteriorantes e patogênicas Gram negativas, bolores e leveduras; 2- não são ativas contra todas as células e/ou esporos de bactérias Gram positivas e; 3- existem variantes de cepas de células sensíveis que são resistentes e podem multiplicar-se na presença de bacteriocinas.

Neste trabalho vamos nos ater apenas as bacteriocinas da classe I, pois nela está incluída a nisina, utilizada nos experimentos deste projeto.

2.2.1.1. Bacteriocinas da Classe I

Também denominadas lantibióticos (Cleveland *et al.*, 2001), são peptídeos pequenos (<5 kDa) contendo os aminoácidos lantionina (Lan) e β -metil-lantionina (MeLan). Têm de 19 até mais de 50 aminoácidos. Este grupo inclui a nisina A e Z, a lactinina 481 e bacteriocinas contendo dois aminoácidos lantionina, como a citolisina produzida por *Enterococcus faecalis*, lactinina 3147 produzida por *L. lactis* e estafilococcina C55 produzida por *Staphylococcus aureus* (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Guinane *et al.*, 2005). O termo lantibióticos (“*lanthionine containing antibiotic*”) foi definido pela presença de aminoácidos tioeter lantionina (Lan) e/ou β -metil-lantionina (MeLan) no anel intramolecular, incluindo outros resíduos modificados (2,3-

dideidroalanina ou Dha e 2,3-dideidrobutirina ou Dhb) na estrutura química destes compostos (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Garneau, Martin e Vederas, 2002). A Tabela 4 apresenta uma lista de lantibióticos conhecidos atualmente.

Tabela 4: Exemplos de lantibióticos conhecidos atualmente, adaptado de McAuliffe, Ross e Hill (2001)

Lantibiótico	Microrganismo produtor
Tipo A	
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-Ny266	<i>Staphylococcus mutans</i>
Mutacina 1140	<i>Staphylococcus mutans</i> JH1000
Pep5	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 5
Epacidina 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
Lacticina 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	Microrganismo produtor
Tipo B	
Cinamicina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>
Duramicina B	<i>Streptoverticillium</i> spp.
Duramicina C	<i>Streptomyces griseoluteos</i>
Ancovenina	<i>Streptomyces</i> spp.
Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i> HIL Y-85, 54728
Actagardina	<i>Actinoplanes</i>

Os lantibióticos são sintetizados nos ribossomos em duas etapas: na primeira, são produzidos pré-peptídeos e na segunda, estes peptídeos sofrem uma transformação, tornando-se biologicamente ativos. Estes peptídeos não são encontrados normalmente na natureza (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Garneau, Martin e Vederas, 2002).

2.2.1.2. Nisina

A nisina foi descoberta na Inglaterra em 1928, durante observação do metabolismo de uma linhagem especial de *Streptococcus lactis* (reclassificado posteriormente como *Lactococcus lactis*), que apresentava inibição sobre certas

A nisina é ativa contra diversos microrganismos Gram positivos, como *Lactococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Staphylococcus* spp, *Listeria* spp e *Mycobacterium* spp, e também atua inibindo células vegetativas ou esporos de *Bacillus* e *Clostridium*. Em condições normais, bacteriocinas produzidas por bactérias Gram positivas não são ativas contra microrganismos Gram negativos, porém já foi observado o efeito de disrupção da membrana de bactérias Gram negativas por nisina (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Lauková, 2000; Pranoto, Rakshit e Salokhe, 2005; Samelis *et al.*, 2005). Cutter e Siragusa (1995) observaram que estas bactérias podem se tornar sensíveis à nisina após tratamentos com agentes quelantes (EDTA, citrato, fosfato, etc.), que permeabilizam a membrana citoplasmática destes microrganismos (McAuliffe, Ross e Hill, 2001).

A nisina age dissipando completamente o ΔpH (gradiente de pH) e o $\Delta \Psi$ (potencial de membrana) das células alvo, causando o efluxo de aminoácidos, fosfatos inorgânicos e um efluxo parcial do ATP intracelular (Montville e Abee, 1994; Bonnet e Montville, 2005).

O mecanismo de ação não é bem determinado, mas acredita-se que a nisina interage de forma eletrostática com grupos de fosfolipídios carregados presentes na membrana citoplasmática, através de forças iônicas (Abbe, Krockel e Hill, 1995; Raju, Shamasundar e Udupa, 2003). De acordo com este modelo, há um acúmulo inicial de peptídeos na superfície da membrana, resultante da interação iônica dos fosfolipídios da membrana com o grupo C-terminal da nisina. A presença destes peptídeos induz uma mudança no potencial de membrana ($\Delta \Psi$) da célula alvo. Posteriormente as moléculas peptídicas se unem na porção transmembrânica, formando poros que causam a disrupção da FPM, inibição do transporte de aminoácidos e efluxo de substâncias com baixo peso molecular, como íons e ATP (Thomas, Clarson, Delves-Broughton, 2000; McAuliffe, Ross e Hill, 2001).

Como molécula catiônica, a atividade de nisina é mais eficiente se houver um alto percentual de moléculas aniônicas ou carregadas negativamente na membrana citoplasmática (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Aasen *et al.*, 2003). Um estudo recente mostrou que a atividade de nisina depende da concentração de lipídeo II na membrana de células sensíveis e da carga desses lipídeos. A nisina reconhece o peptídeo precursor (lipídeo II) através da interação com os grupos fosfolipídicos da região N-terminal da cabeça da nisina, bloqueando a biosíntese de peptidoglicanos. A região C-terminal da nisina, que corresponde à região flexível do anel, é um componente essencial na

formação de poros na membrana. Assim, determinou-se que a nisina mata as células-alvo interferindo na energia requerida para o processo de transporte que ocorre na membrana citoplasmática. Antes desta pesquisa, acreditava-se que a nisina atuava juntamente com o lipídio II, mediando a formação de poros na membrana. (McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Garneau, Martin e Vederas, 2002).

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. Harris, Fleming e Klaenhammer (1991) determinaram que essa resistência não está relacionada com a presença de DNA plasmidial. Alguns autores observaram que as cepas resistentes produzem enzimas proteolíticas que degradam a nisina (Brul e Coote, 1999). Outros sugerem que as células sensíveis sofrem alterações na membrana citoplasmática, tais como menor rigidez ou teores mais baixos de fosfatidiglicerol, difosfatidiglicerol e bifosfatidigliceril fosfatos (Montville e Chen, 1998; Cleveland *et al.*, 2001; McAuliffe, Ross e Hill, 2001; Garneau, Martin e Vederas, 2002; Chi-Zang, Yam e Chikindas, 2004).

Diversos estudos foram realizados para avaliar o efeito da nisina em *Listeria monocytogenes*. Harris, Fleming e Klaenhammer (1991) observaram o efeito de nisina comercial (Nisaplin®) sobre três cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115, Scott A e UAL 500), cultivadas em caldo BHI com pH monitorado a 37°C por 4 dias. Utilizando-se cerca de 10 µg/ml (400 UI/ml), o número de células viáveis decresceu de 6 a 7 ciclos log. Bruno, Kaiser e Montville (1992) observaram que concentrações de 2,5 µg/ml (100 UI/ml) de nisina dissiparam completamente a FPM e concentrações de 10,0 µg/ml (400 UI/ml) e 5,0 µg/ml (200 UI/ml) dissiparam completamente o ΔpH e $\Psi\Delta$ de *L.monocytogenes* Scott A em pH 5,5 e 7,0, demonstrando que a nisina possui forte atividade contra o microrganismo testado.

Segundo Song e Richard (1997), o uso de quantidades de nisina abaixo da concentração inibitória mínima pode levar à seleção de microrganismos resistentes. Neste sentido, o estudo combinado de nisina com outras técnicas para a inativação de microrganismos pode levar à diminuição das concentrações necessárias para o efeito bactericida e/ou bacteriostático e ainda aumentar o espectro antimicrobiano de nisina (Dykes e Moorhead, 2002; Samelis *et al.*, 2005). Na Tabela 5 estão relacionados diversos estudos realizados com nisina em combinação com algum outro fator, visando o controle de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 5: Efeito de nisina combinada com outros fatores no controle de *Listeria monocytogenes*, adaptado de Devlieghere *et al.* (2004)

Bacteriocina	Outro fator	Substrato	Efeito contra <i>Listeria monocytogenes</i>	Referências
Nisina A	Atmosfera modificada (N ₂ , CO ₂) e baixa temperatura	Meio de cultura líquido	Aumento da fase lag (400 UI/ml) e inibição do crescimento (1250 UI/ml)	Szabo e Cahil (1998)
Nisina	Atmosfera modificada (N ₂ , CO ₂) e cloreto de sódio	Salmão defumado a frio	Inibição do crescimento (30 UI/ml) com 5% NaCl e atmosfera modificada com CO ₂	Nilsson, Huss e Gram (1997)
Nisina A	Dióxido de carbono	Salmão defumado a frio	Efeito sinérgico, inclusive contra células resistentes à nisina	Nilsson <i>et al.</i> (2000)
Nisina A	Embalagem com atmosfera modificada	Carne suína cozida	Combinação é mais efetiva do que os tratamentos isolados na multiplicação do patógeno	Fang e Lin (1994)
Nisina	Cloreto de sódio e pH	Meio de cultura líquido	Atividade antimicrobiana máxima em pH 6,6; diminuição da atividade de nisina (50 UI/ ml) na presença de 2% e 4% de NaCl	Bouttefroy <i>et al.</i> (2000)
Nisina A	Cloreto de sódio	Carne de búfalo crua	2% NaCl aumenta a eficácia de nisina (400 ou 800 UI/ml) na inibição do patógeno	Pawar <i>et al.</i> (2000)
Nisina	Ácidos orgânicos e sais	Carne suína picada estocada à 4°C sob atmosfera modificada	Combinação de 3 ou 5g/100ml de ácido acético ou diacetato de sódio, ou 3g/100ml de benzoato de potássio possuem efeito bactericida até 90 dias de exposição	Samelis <i>et al.</i> (2005)
Nisina	Ésteres de ácidos graxos	Meio de cultura líquido	Efeito sinérgico na redução do patógeno	Thomas <i>et al.</i> (1998)
Nisina	Lauricina e lactoperoxidase	Meio de cultura líquido	Efeito aditivo na redução do patógeno	Dufour, Simmonds e Bremer (2003)
Nisina A	Lactoperoxidase e baixa temperatura	Meio de cultura líquido e leite cru	Efeito sinérgico na redução do patógeno	Rodriguez <i>et al.</i> (1997)
Nisina	Lactoperoxidase	Sardinha crua	Efeito sinérgico na redução de patógenos e deteriorantes	Elotmani e Assobhei (2003)
Nisina Z	Baixa e alta temperatura	Meio de cultura líquido	efeito inibitório à 30°C, porém efeito reduzido em baixas temperaturas (4°C)	Abee <i>et al.</i> (1994)
Nisina	Culturas protetoras (<i>Enterococcus faecium</i> BFE 900-6a; <i>Lactobacillus sakei</i> 706-1a; <i>Lac. lactis</i> BFE 902)	Meio de cultura sólido e “tofu”	Supressão completa da multiplicação do patógeno. Apenas <i>Lac. sakei</i> 706-1a menos eficiente na redução.	Schillinger <i>et al.</i> (2001)
Nisina	Bactérias lácticas <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Lac. casei</i>	Meio de cultura líquido e vegetais	Efeito sinérgico na redução do patógeno	Jamuna, Babusha e Jeevaratnam (2005)
Nisina	Listeriófago LH7	Meio de cultura líquido e carne crua	Redução substancial de células, sem recuperação posterior	Dykes e Moorhead (2002)
Nisina	Listeriófago LM-103 e LMP-102	Melão e maçã minimamente processados	Redução da contaminação (acima de 5 log)	Leverentz <i>et al.</i> (2003)
Nisina Z	Timol	Meio de cultura líquido	Aumento da fase lag (10-25 UI/ml) e inibição do crescimento (40 UI/ml)	Ettayebi, Yamani e Rossi-Hassani (2000)
Nisina	Ésteres de ácidos graxos (carvacrol, timol, eugenol)	Meio de cultura sólido	Inibição do patógeno possibilitando a utilização de menores concentrações de nisina	Yamazaki <i>et al.</i> (2004)
Nisina	Extrato de alho	Meio de cultura líquido	Efeito sinérgico na redução do patógeno	Singh, Falahee e Adams (2001)

Conforme pode ser visto na tabela 5, o efeito combinado de nisina e óleos essenciais já foi estudado por alguns pesquisadores. Ettayebi, Yamani e Rossi-Hassani (2000) observaram que a utilização de timol em combinação com nisina Z pode inibir o crescimento de *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido. 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 combinação possibilita diminuir as concentrações de nisina e

conseqüentemente reduzir as chances do surgimento de patógenos resistentes à nisina. O uso de nisina e extrato de alho combinado também resultou em efeito sinérgico na redução de *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido (Singh, Falahee e Adams, 2001).

2.2.2. Óleos Essenciais

A nomenclatura “óleo essencial” é uma variante do termo utilizado no século 16 por Paracelsus Von Hohenheim, que nomeou o componente ativo de drogas e medicamentos como *Quinta essentia* (Burt, 2004). Óleos essenciais são líquidos aromáticos extraídos de plantas (flor, caule, folha, fruto, broto, semente, tronco ou raiz), obtidos através de processos como destilação, pressão à frio, extração com dióxido de carbono supercrítico ou fermentação. O método de destilação à vapor é o mais utilizado na produção comercial de óleos essenciais (Davidson e Naidu, 2000; Burt, 2004).

O uso de óleos essenciais em alimentos com objetivo de melhorar suas características sensoriais é muito comum, porém sua atividade antiviral, antiparasítica (Castro *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005a), antitoxigênica, antimicótica (Abreu *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2005; Castanheira *et al.*, 2005), inseticida (Potenza *et al.*, 2005b), pesticida (Evangelista *et al.*, 2005; Potenza *et al.*, 2005a) e antibacteriana, quando aplicados em alimentos, é pouco conhecida (Burt, 2004; Abo-el Seod *et al.* 2005).

Ouattara *et al.* (1997) estudaram o efeito de óleo essencial de canela, cravo, cominho, alho, orégano, pimenta preta, pimenta e alecrim contra *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta*, e *Serratia liquefaciens*, que são os principais microrganismos deteriorantes de produtos cárneos. Os autores realizaram a contagem de microrganismos sobreviventes na superfície de meios de cultura contendo os óleos essenciais em diferentes concentrações. Os óleos de canela, cravo, alecrim, pimenta e alho foram os mais efetivos, apresentando efeito inibitório em concentração de 1% (v/v) contra todos os microrganismos testados. Os óleos essenciais de cominho, orégano e pimenta preta foram menos eficientes, apresentando efeito inibitório aos microrganismos em concentrações acima de 10% (v/v).

Elgayyar *et al.* (2001) estudaram o efeito inibitório de óleos essenciais de anis, manjerição, cenoura, endro (dill) e erva-doce contra *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Pseudomonas aeruginosa*,

Salmonella typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum* e *Rhodotorula* pelo método de difusão em discos. *L. monocytogenes* apresentou maior resistência que os outros microrganismos aos vários óleos testados, sendo necessárias concentrações de 10% (v/v) para sua inibição.

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) 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* pelo método de difusão em poços. Os óleos essenciais de louro, canela, cravo e tomilho apresentaram maior atividade antimicrobiana, com efeito bactericida em concentrações de 0,075% (v/v) contra todos os patógenos, exceto contra *C. jejuni* (1% (v/v)).

No Brasil já foram realizados alguns estudos sobre a atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Pimenta-Rodrigues *et al.* (2005) avaliaram a atividade antibacteriana de óleo essencial de folhas de pitanga sobre *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. e *Proteus vulgaris* pelo método de difusão em poços, e observaram atividade contra todas as cepas testadas.

Marinho *et al.* (2005) testaram a atividade antimicrobiana de óleo essencial concentrado de *Pimenta dioica*, popularmente conhecida como pimenta da Jamaica, contra cepas de *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus coagulase positiva*, *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio parahaemolyticus* pelo método de difusão de Bauer-Kirby e observaram que, das doze cepas testadas, apenas *A. caviae* e *A. hidrophila* não apresentaram sensibilidade ao óleo essencial.

A atividade antimicrobiana intrínseca de um óleo essencial pode ser diretamente relacionada com a configuração química individual de seus componentes, a proporção em que se apresentam e a interação entre eles (Burt, 2004). Os óleos essenciais podem ter vários componentes antimicrobianos individuais, mas os componentes fenólicos são os responsáveis primários pela ação antimicrobiana e antioxidante, podendo atuar inclusive com efeito sinérgico.

Os compostos fenólicos, responsáveis pelo aroma característico dos óleos essenciais, são hidrofóbicos e contém estruturas aromáticas similares aos solventes

(tolueno) e conservadores clássicos (ácido benzóico) (Brul e Coote, 1999; Dorman *et al.*, 2003).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais é pouco conhecido. Considerando o grande número de diferentes compostos químicos presentes nos óleos essenciais, provavelmente sua atividade não é atribuída à apenas um mecanismo específico, mas por diversas influências na membrana de microrganismos. Por sua característica hidrofóbica, estes compostos atuam nos lipídios da membrana das células, modificando sua estrutura e tornando-a mais permeável, podendo ocorrer a passagem de íons e/ou outras substâncias. Dois mecanismos foram propostos até o momento para explicar a ação dos componentes fenólicos na membrana celular: essas moléculas de hidrocarbonetos cíclicos podem se acumular na bicamada lipídica da membrana e distorcer a interação lipídeo-proteína, ou ainda, pode haver uma interação direta com compostos lipofílicos com partes hidrofóbicas das proteínas de membrana (Burt, 2004).

Geralmente, os óleos essenciais que possuem uma forte atividade contra microrganismos patogênicos são aqueles com alto percentual de compostos fenólicos, como o carvacrol, timol e eugenol (Burt, 2004). Aparentemente, a posição relativa do grupo hidroxila no anel fenólico não possui influência na atividade antimicrobiana, visto que o carvacrol e o timol possuem atividade antimicrobiana similar (Burt, 2004).

Pouco se conhece sobre o mecanismo de resistência de microrganismos contra estes compostos antimicrobianos naturais. Acredita-se que as células se protegem liberando compostos neutros, cátions anfipáticos ou ânions (Brul e Coote, 1999). Ultee *et al.* (2000) observaram que células de *B. cereus* submetidas ao tratamento com concentrações subletais de carvacrol se adaptaram ao antimicrobiano através de alterações nos ácidos graxos que levou à diminuição da fluidez da membrana citoplasmática.

2.2.2.1. Óleo essencial de orégano (O.E.O.)

Orégano (*Origanum*) é uma erva pertencente à família *Lamiaceae* e possui uma grande diversidade de espécies (*Origanum vulgare*, *O. marjoram*, *O. dictamnus*, etc.) (Dorman e col, 2003). Uma grande parte do orégano comercializado no mundo pertence às espécies *O. vulgare* ssp. *hirtum* e *O. onites*, cultivados em áreas montanhosas do Mediterrâneo e algumas áreas da Turquia (Baydar *et al.* 2004; Kokkini *et al.* 2004).

O óleo essencial de orégano tem atividade antimicrobiana contra diversos microrganismos Gram positivos, Gram negativos e fungos (Ouattara *et al.*, 1997; Davidson e Naidu, 2000;). Vários estudos avaliaram o efeito de O.E.O. sobre diversos microrganismos (Tabela 6). Os valores de concentração inibitória mínima variam de acordo com a cepa testada, o tipo de óleo essencial utilizado e a metodologia aplicada para o teste (Burt, 2004).

Trabalhando com meio de cultura líquido, Marino, Bersani e Comi (2001) observaram que O.E.O. na concentração de 800 ppm (0,08%) inibiu totalmente a multiplicação de *Escherichia coli*, *E. 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*, *Listeria inócua*.

Baydar *et al.* (2004) avaliaram o efeito de O.E.O. pelo método de difusão em discos contra *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*. A utilização de 2% (v/v) de O.E.O. foi inibitória para todos os microrganismos testados.

Vários fatores podem influenciar a atividade antimicrobiana do O.E.O., sendo a concentração dos compostos ativos o fator mais importante. Os teores variam de acordo com a espécie e maturidade da planta, origem geográfica, época de colheita e a forma de extração do óleo essencial (Burt, 2004). Duarte *et al.* (2005) verificaram a influência da época de colheita na atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas cultivadas na região de Campinas – Brasil, e os resultados demonstraram que houve maior síntese de óleo essencial na primavera/verão, enquanto que a maior atividade antimicrobiana foi observada durante outono/inverno. Outro estudo realizado no Brasil por Lima *et al.* (2005b) demonstrou que o maior rendimento de óleo essencial de folhas de goiabeira foi obtido em amostras coletadas durante os primeiros horários da manhã (7:30 – 9:00 horas) quando comparadas com extrações realizadas às 12:00 horas.

Tabela 6: Efeito inibitório de óleo essencial de orégano contra microrganismos, adaptado de Burt (2004)

Microrganismo	Óleo essencial de orégano		Metodologia	Referência
	<i>O. marjoram</i>	<i>O. vulgare</i>		
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0,25% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Aeromonas sobria</i>	0,25% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Aspergillus niger</i>	np	15% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida albicans</i>	0,25% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Candida rugosa</i>	np	15,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Carnobacterium piscicola</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,0% (v/v)	0,25% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Enterococcus faecalis</i>	np	10,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Escherichia coli</i>	0,25% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Escherichia coli</i>	np	1,8% (v/v)	Microdiluição em ágar	Moreira <i>et al.</i> (2005)
<i>Escherichia coli</i>	np	10,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	np	0,062% (v/v)	Difusão em discos	Burt e Reinders (20003)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,5% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Lactobacillus curvatus</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactobacillus sake</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 2,0% (v/v)	2,0% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>P. digitarum</i>	0,025% (v/v)	np	Difusão em disco	Daferera, Ziogas e Polisssiou (2000)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	np	0,05% (v/v)	Filé de peixe embalado com atmosfera modificada	Mejlholm e Dalgaard (2002)
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	np	0,0025% (v/v)	Meio de cultura líquido	Mejlholm e Dalgaard (2002)
<i>Rhizopus oryzae</i>	np	15,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	np	15,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Salmonella typhimurium</i>	0,5% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Salmonella typhimurium</i>	np	10,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Serratia liquefaciens</i>	np	10,0% (v/v)	Semeadura por superfície em ágar adicionado de O.E.O.	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
<i>Serratia marcescens</i>	0,5% (v/v)	0,25% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5% (v/v)	0,12% (v/v)	Difusão em poços	Hammer, Carson e Riley (1999)
<i>Staphylococcus aureus</i>	np	10,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	np	10,0% (v/v)	Difusão em ágar	Özcan e Erkmen (2001)

(np) não foi pesquisado

A atividade antimicrobiana do orégano é atribuída aos seus óleos essenciais que contém terpenos como o carvacrol [2-metil-5-(1metiletil)fenol] e timol [5-metil-2-(1metiletil)fenol] (Burt, 2004; Baydar *et al.*, 2004). O γ -terpinene [1-metil-4(1metiletil)-1,4 ciclohexadieno] e o p-cimeno [1-metil-4(1metiletil)-benzeno] são precursores do

timol e carvacrol, respectivamente (Burt, 2004; Baydar *et al.*, 2004), portanto sua concentração no produto é proporcional aos teores de seus precursores.

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

Fonte: <http://kenko.int.kitami-it.ac.jp/herb/catnip/images/graph1.jpg>

Devido à diversidade e à complexidade dos compostos fenólicos presentes nos extratos de ervas, torna-se difícil fazer a caracterização e quantificação destes compostos, bem como a comparação da atividade antimicrobiana entre eles (Mann e

Markham, 1998; Zheng e Wang, 2001),. Na Tabela 7 estão apresentados os diferentes teores de compostos fenólicos detectados em óleos essenciais de orégano.

Tabela 7: Composição de componentes fenólicos em óleo essencial de orégano, adaptado de Burt (2004).

Espécie de <i>Origanum</i>	Carvacrol (%)	Timol (%)	γ -terpineno (%)	p-cimeno (%)	Referências bibliográficas
Óleo essencial comercial	0,43	31,8	1,32	40,15	Sivropoulou <i>et al.</i> (1996)
Óleo essencial comercial	5,19	0,37	0,11	np	Ouattara <i>et al.</i> (1997)
(Food Ingredients – Canadá)					
<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	Daferera, Ziogas e Polissiou (2000)
<i>O. marjorana</i>	0,2	14,0	0	0	Daferera, Ziogas e Polissiou (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. scobrum</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	Daferera, Ziogas e Polissiou (2000)
<i>O. vulgare</i>	2,4	5,6	np	np	Milos, Mastelic e Jerkovic (2000)
<i>O. vulgare</i>	0	46,84	12,88	6,64	Marino, Bersani e Comi (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

Além da atividade antimicrobiana, os terpenos presentes no óleo essencial de orégano possuem também importante atividade antioxidante (Almeida-Doria e Regitano-D'Arce, 2000; Milos, Mastelic e Jerkovic, 2000; Zheng e Wang, 2001), pois são capazes de doar elétrons aos radicais livres reativos, tornando-as moléculas mais estáveis ou não reativas (Dorman *et al.*, 2003). Estudos demonstram que os óleos essenciais contendo carvacrol, timol e eugenol possuem maior atividade antimicrobiana que outros óleos essenciais que não possuem estes compostos (Ouattara *et al.* 1997).

Diversos autores pesquisaram o efeito individual de carvacrol e timol contra microrganismos. Na Tabela 8 estão relacionadas algumas destas pesquisas.

Tabela 8: Atividade antimicrobiana de carvacrol e timol contra diversos microrganismos, adaptado de Dorman e Deans (2000)

Cepa	Componente fenólico	Metodologia	Referências
<i>Acinetobacter calcoacetica</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Bacillus cereus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Ultee, Gorris e Smid (1998)
<i>Bacillus cereus</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Pol, Krommer Smid (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 e 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 e Deans (2000)
<i>Brocothix thermosphacta</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e 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 e Deans (2000)
<i>Clostridium sporogenes</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Carvacrol	Densidade ótica	Aligiannis <i>et al.</i> (2001)
<i>Erwinia carotova</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Escherichia coli</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e 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 e Deans (2000)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e 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 e Deans (2000)
<i>Leuconostoc cremosis</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Micrococcus lúteos</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Moraxella sp.</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Penicillium digitatum</i>	Carvacrol e timol	Densidade ótica	Daferera, Ziogas e Polissiou (2000)
<i>Proteus vulgaris</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e Deans (2000)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e 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 e 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 e Deans (2000)
<i>Shigella sonnei</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004)
<i>Shigella flexneri</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carvacrol e timol	Difusão em poços	Dorman e 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 e Deans (2000)

Ettayebi *et al.* (2000) observaram que o timol possui uma atividade antibacteriana similar à polimixina B. Ele causa a dissipação de metabólitos intracelulares através de alterações na estrutura e permeabilidade da membrana e a adição de nisina resulta na perda imediata de potássio, despolarização da membrana citoplasmática, hidrólise e um efluxo parcial de ATP celular.

Ultee *et al.* (2000) estudaram o efeito de carvacrol e timol contra *Bacillus cereus* e observaram a passagem de metabólitos pela membrana. O nível de ATP da célula diminuiu em contato com os compostos proporcionalmente com o aumento de ATP extracelular, indicando que a síntese de ATP foi reduzida ou a taxa de hidrólise foi aumentada. O potencial de membrana ($\Psi\Delta$) diminuiu e o gradiente de pH (ΔpH) cessou completamente, causando o efluxo de íons potássio. Os autores concluíram que o carvacrol pode atuar na FPM e formar poros através da interação com fosfolipídios da membrana citoplasmática.

As substâncias ativas dos óleos essenciais podem interagir com componentes dos alimentos e seu uso como conservador pode requerer concentrações mais elevadas, que podem levar à alterações nas características sensoriais originais, de modo negativo (Mejlholm e Dalgaard, 2002; Smith *et al.* 2005). Leuschner e Ielsch (2003) observaram que no alimento é necessário o aumento das concentrações de condimentos para obter o mesmo efeito obtido em estudos “*in vitro*”. Concentrações de 1% de alho e cravos frescos e pimenta vermelha seca apresentaram efeito listericida em meio de cultura, porém não causaram reduções quando utilizados em queijo tipo soft.

3. Objetivos

Diante da ação comprovada de O.E.O. e de nisina contra *L. monocytogenes* e sua permissão de uso como conservador em alimentos, que pode ser limitada pelo efeito adverso nas características sensoriais dos alimentos, bem como do pouco conhecimento a respeito da funcionalidade desses compostos antimicrobianos em diferentes modelos alimentares, este projeto objetivou avaliar a viabilidade da utilização desses compostos em lingüiça fresca, visando o controle de *Listeria monocytogenes* durante o armazenamento em refrigeração.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1. avaliar ação inibitória “*in vitro*” de óleo essencial de orégano e de nisina contra *Listeria monocytogenes*, determinando as concentrações que resultam na ação inibitória máxima.

3.1.2. utilizando as concentrações determinadas no item anterior, avaliar a ação destes compostos em alimento modelo (lingüiça fresca) durante armazenamento sob refrigeração.

4. Materiais e Métodos

4.1. Cultura microbiana e preparo do inóculo

Utilizou-se a cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A, mantida a -70°C em caldo TSBye (Caldo Triptose Soja – Oxoid, adicionado de 0,6% de extrato de levedura) contendo 20% de glicerina. A cultura foi reativada em 10 ml de caldo TSBye a 37°C por 18 a 24 horas e submetida à centrifugação a 1600xg por 10 minutos (Centrífuga Hettich Mikro 22R) à 10°C . Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspense em solução salina 0,85% estéril, de forma a reconstituir o volume inicial. Os tubos foram agitados e novamente centrifugados, repetindo-se a etapa de lavagem mais duas vezes. Em seguida, as suspensões lavadas foram submetidas à diluição decimal seriada em solução salina estéril e transferiu-se 0,1 ml de cada diluição para a superfície de placas

contendo meio TSAye (Ágar Triptose Soja - Oxoid, adicionado de 0,6% de extrato de levedura). Foi feito espalhamento com alça de Drigalsky e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As placas que continham entre 25 e 250 colônias foram selecionadas, efetuando-se a contagem das colônias com um contador de colônias (CP 600 Plus – Phoenix). O número de UFC/ml foi determinado multiplicando-se o resultado da contagem pelo inverso da diluição correspondente.

4.2. Antimicrobianos naturais

Foram utilizados nisina (Nisaplin, Danisco-Inglaterra, UK) e óleo essencial de orégano (Duas Rodas Industrial, Ltda. – Brasil), diluídos em solução de etanol (Álcool Etílico Absoluto, P.A.-A.C.S. 99,5% - Synth®) 50% hidratado com água deionizada estéril, conforme descrito por Rajkovic *et al.* (2005).

As concentrações de nisina no teste “*in vitro*” foram determinadas em ppm. As concentrações de O.E.O. foram determinadas em porcentagem (v/v). Foram estudadas sete concentrações de O.E.O., 0,0%, 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5%, e doze de nisina: 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 ppm, resultando em 84 combinações.

4.3. Avaliação da inibição “*in vitro*” de *L. monocytogenes* Scott A por óleo essencial de orégano e nisina

Para a avaliação da sensibilidade de *L. monocytogenes* Scott A à nisina e ao O.E.O., empregou-se a metodologia de difusão em poços, de acordo com Dorman e Deans (2000). Após a etapa de lavagem, descrita no item 4.1., a suspensão de células foi submetida a diluições decimais seriadas em salina estéril. Suspensões contendo 10^5 - 10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes* Scott A foram utilizadas nos testes “*in vitro*” e nos testes com lingüiça frescal refrigerada.

De cada diluição decimal, transferiu-se um mililitro para placas de Petri vazias estéreis, adicionando-se em seguida 20 ml de caldo BHI (Brain Heart Infusion) contendo 1% de ágar. Após a homogeneização e solidificação do meio, foram perfurados poços de 8 a 9 mm de diâmetro, que foram preenchidos com 50µl das

soluções de antimicrobianos naturais preparadas conforme descrito no item 4.2.. Após incubação a 37°C por 24 h, observou-se a formação de halos de inibição de crescimento de *L. monocytogenes* Scott A ao redor dos poços. A medida dos halos foi obtida com auxílio de paquímetro (Vernier calipers), sendo cada halo submetido a duas medições: duas no sentido vertical (Y1) e duas no sentido horizontal (Y2) (Figura 3). A medida do halo correspondeu à média desses dois valores, descontadas a medida do poço no sentido vertical (X1) e horizontal (X2), ou seja: $M_{\text{halo}} = [(Y1 - X1) + (Y2 - X2)] / 2$. Os experimentos foram realizados em triplicatas verdadeiras.

Figura 3: Representação das medidas dos halos realizadas nos experimentos “*in vitro*”

4.4. Avaliação da inibição de *L. monocytogenes* Scott A em lingüiça fresca refrigerada por óleo essencial de orégano e nisina

4.4.1. Fabricação e inoculação das lingüiças

A Figura 4 mostra as etapas da fabricação das lingüiças, realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF – USP.

A massa moída de pernil de porco foi adquirida no comércio de São Paulo-SP e os condimentos, aditivos e tripa de porco salgada para embutimento foram gentilmente cedidos pela empresa KRAKI (Kienast & Kratschmer Ltda.). Todos estes itens foram submetidos à irradiação com 10KGy (Fonte de cobalto 60) na EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiações Ltda. – Cotia, SP.), com o objetivo de eliminar a microbiota natural. Após a irradiação, a massa de pernil moída e a tripa foram mantidas congeladas até o início dos experimentos, enquanto que os condimentos e os aditivos (antioxidantes, emulsificantes e nitrito de sódio) foram devidamente armazenados em local seco, ventilado e dentro da embalagem original, com temperatura entre 18 e 25°C (conforme indicação do fabricante).

Figura 4: Representação esquemática das etapas de preparo de lingüiça fresca contendo *L. monocytogenes* e antimicrobianos naturais.

Para a realização dos experimentos, a carne de pernil moída e a tripa foram descongeladas durante a noite sob refrigeração (5°C), e em seguida, a carne moída foi subdividida em porções de 900 gramas. A cultura microbiana de *L. monocytogenes*, obtida conforme descrito no item 4.1., foi submetida à diluição 1:10 em salina estéril 0,85%, para a obtenção de uma suspensão com 10^8 UFC/ml. A seguir adicionou-se nove mililitros desta suspensão à 900g da massa de carne, atingindo-se a concentração de 10^5 - 10^6 UFC de *L. monocytogenes* por grama de massa de carne. A homogeneização do inóculo na massa de carne foi feita manualmente (cerca de 20 minutos) com auxílio de luvas cirúrgicas desinfetadas com etanol 70% hidratado. Após a homogeneização, a massa de carne contendo o inóculo de *Listeria monocytogenes* foi subdividida em quatro amostras de 220 gramas (denominadas A, B, C e D), às quais foram adicionados os seguintes antimicrobianos naturais:

- Amostra A: O.E.O. (0,5% (v/v)) + Nisina (200ppm)
- Amostra B: Ó. E.O. (0,5% (v/v))
- Amostra C: Nisina (200ppm)
- Amostra D: Controle (sem antimicrobianos)

As concentrações de nisina e de O.E.O. a serem adicionadas à carne foram determinadas com base nos resultados obtidos nos experimentos “*in vitro*”.

Após a adição dos antimicrobianos naturais, as massas foram submetidas a mais uma etapa de homogeneização manual (cerca de 20 minutos). As amostras A, B, C e D foram embutidas separadamente em tripa de porco com auxílio de uma embutideira (CAF, modelo mini) e subdivididas em porções de 20 gramas. Antes do uso, a tripa foi lavada assepticamente através da imersão em água deionizada estéril. As amostras A, B, C e D, já porcionadas, foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração (5°C). Todos os procedimentos para a elaboração das linguiças foram realizados em uma capela do fluxo laminar vertical e todos os utensílios (facas, colheres, bandejas, peças do moedor) utilizados para a realização do experimento foram devidamente esterilizados por autoclavação à 120°C por 15 minutos, ou quando este procedimento não era possível (peças de plástico) foram submersos em álcool 70% por 12 horas.

Foram utilizadas três formulações diferentes de lingüiça frescal (formulações 1, 2 e 3). A formulação 1 (Tabela 09) foi a mesma empregada em estudos anteriores realizados no laboratório (Martinis e Franco, 1998; Liserre *et al.*, 2002).

Tabela 09: Formulação 1 de lingüiça frescal

Matéria Prima	g/kg de produto
Carne suína (pernil sem osso)	966,8
Sal	20,0
Açúcar	1,0
Condimentos	7,0
Nitrito de sódio	0,145
Emulsificante (Krakoline E)	2,5
Antioxidante (Fixador A 80 S)	2,5

A formulação 2 foi a mesma da formulação 1, sem adição de sal (Tabela 10).

Tabela 10: Formulação 2 de lingüiça frescal

Matéria Prima	g/kg de produto
Carne suína (pernil sem osso)	986,8
Açúcar	1,0
Condimentos	7,0
Nitrito de sódio	0,145
Emulsificante (Krakoline E)	2,5
Antioxidante (Fixador A 80 S)	2,5

A formulação 3 foi a mesma da formulação 2 sem adição dos condimentos (Tabela 11).

Tabela 11: Formulação 3 de lingüiça frescal

Matéria Prima	g/kg de produto
Carne suína (pernil sem osso)	993,8
Açúcar	1,0
Nitrito de sódio	0,145
Emulsificante (Krakoline E)	2,5
Antioxidante (Fixador A 80 S)	2,5

O Fixador A 80 S (Kraki – Kienast & Kratschmer Ltda.) contém em sua formulação antioxidantes de amplo raio 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 (Kraki – Kienast & Kratschmer Ltda.) contém tripolifosfato de sódio que mantém a aparência homogênea do produto final.

Considerando que o tempo total para o preparo das lingüiças foi de cerca de duas horas, o número de *L. monocytogenes* presente nas amostras foi determinado 2 horas após a adição à mistura e após 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias de armazenamento a 5°C. Os experimentos com as três formulações de lingüiça foram realizados em três repetições verdadeiras.

4.5. Enumeração de *L. monocytogenes* nas amostras de lingüiça fresca refrigerada

Para a contagem de *L. monocytogenes*, cada amostra de 20g foi homogeneizada com 180 ml de água peptonada 0,1% estéril, empregando-se um *Stomacher* (Seward Medical, Inglaterra). A partir desse homogeneizado, foram preparadas diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1% estéril até 10^{-9} .

A enumeração de *L. monocytogenes* Scott A foi feita através do método de Hartman, Hartman e Lanz (1975), com adaptações. Um mililitro de cada diluição do homogeneizado de lingüiça foi semeado em placas de petri vazias e adicionou-se aproximadamente 20 ml de meio TSAye. Após a homogeneização e solidificação do meio adicionou-se uma sobrecamada de 10 ml de meio Seletivo para *Listeria* (*Listeria* Selective Agar Base – Oxford Formulation). Após a solidificação da sobrecamada, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As placas contendo entre 25 e 250 colônias foram selecionadas e as colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias (CP 600 Plus – Phoenix). O resultado foi expresso como UFC/g de lingüiça fresca.

4.6. Análise sensorial

A análise sensorial teve como objetivo avaliar a aceitação do consumidor em relação às características gerais de lingüiça frescal acrescida de óleo essencial de orégano, avaliando-se os quesitos aspecto geral e sabor do produto.

As lingüiças foram produzidas conforme descrito no item 4.4.1., porém sem irradiação da massa de carne e sem a inoculação da amostra com *L. monocytogenes*. Foi utilizada somente a formulação 1, adicionada de óleo essencial de orégano. A nisina não foi utilizada porque não causa alterações nas características sensoriais da lingüiça (Nattress e Baker, 2003).

Para a análise sensorial foi utilizado o método afetivo de aceitação, segundo norma da ABNT – NBR 12806 (1993). A equipe de provadores foi composta de 53 pessoas, considerada uma amostragem satisfatória, segundo Meilgaard *et al.* (1999). O painel sensorial foi composto por indivíduos previamente selecionados com os seguintes critérios (Anexo I): 1-disponibilidade para participar da equipe, 2- ser consumidor potencial do produto, 3- não estar treinado em análise sensorial, 4- ter idade entre 18 e 55 anos. A análise foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial da FCF-USP, equipada com área de apoio para preparo das amostras e cabines individuais para os provadores. As amostras foram assadas, cortadas em rodela de tamanhos iguais, codificadas e distribuídas aos provadores, que avaliaram os quesitos mencionados. A aceitação do produto foi avaliada baseando-se nas notas atribuídas aos quesitos aspecto geral e sabor, e através da nota atribuída na escala hedônica estruturada de dez centímetros, que varia entre o desgostei muitíssimo “nota 0” e gostei muitíssimo “nota 10” (Villanueva *et al.*, 2000). A nota 5 dessa escala corresponde ao parâmetro “não gostei, nem desgostei” sendo considerada nota de corte. Abaixo deste parâmetro, as amostras encontram-se no campo da rejeição e neste ponto ou acima dele, a amostra é classificada no campo da aceitação.

A análise sensorial foi realizada após aprovação do comitê de Ética em Pesquisas (CEP) da FCF / USP (Anexo 2).

4.7. Análise estatística

Como resultados foram consideradas as médias aritméticas obtidas nas repetições de cada experimento. Os resultados referentes aos experimentos “*in vitro*” foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de comparações de médias de Duncan ($p < 0,05$). Os resultados referentes aos experimentos em lingüiça frescal refrigerada foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para a avaliação da multiplicação de *Listeria monocytogenes* em função do tempo foi feita análise de regressão e as diferenças estatísticas foram detectadas através da análise de contraste ($p < 0,05$). Utilizou-se o pacote estatístico SAS (SAS – Statistical Analysis System – The SAS Institute, Cary, N.C., versão 6.08, 1992).

5. Resultados e discussão

5.1. Efeito combinado de óleo essencial de orégano e nisina no controle de *L. monocytogenes* Scott A em meio de cultura

Na Figura 5 estão apresentados os resultados referentes à atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano e nisina, isoladamente ou em combinação, contra *L. monocytogenes* Scott A.

Figura 5: Inibição de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação de diferentes concentrações de nisina e óleo essencial de orégano, determinada pelo método de difusão em poços a 37°C.

Conforme indicado na Figura 5, verifica-se que a concentração inibitória mínima (CIM) do O.E.O., determinada pelo método de difusão em poços foi de 0,3% (v/v), que

resultou na formação de um halo de 2,09 mm. Para a nisina, a CIM foi de 600 ppm, que resultou em halos de 0,48 mm.

Baydar *et al.* (2004) estudaram o efeito de O.E.O. contra *L. monocytogenes* Scott A pelo método de difusão em discos em ágar nutriente e observaram a formação de halos de inibição de 31 mm quando foi utilizado 2,0% (v/v) e de 24,5 mm quando foi utilizado 1,0% (v/v) de O.E.O., porém, não houve inibição em concentrações de 0,5% ou 0,3% (v/v).

Smith-Palmer, Stewart e Fyfe (1998) avaliaram o efeito de diversos óleos essenciais contra *L. monocytogenes* pelo método de difusão em poços e observaram que o óleo de tomilho puro, que contém em sua estrutura o carvacrol e timol, foi o mais ativo contra o patógeno, com formação de halos de inibição de 10 mm (da base externa do poço até a base externa do halo). Esses autores também avaliaram ação de óleo essencial de tomilho em meio de cultura líquido contra de *L. monocytogenes*, e observaram que é necessário cerca de 0,02% (v/v) para obter um efeito bacteriostático, enquanto que 0,03% (v/v) já apresentou um efeito bactericida, independente da temperatura de incubação (4°C ou 35°C).

Marino, Bersani e Comi (2001) pesquisaram o efeito dos óleos essenciais de camomila, sálvia, menta e orégano contra *L. innocua* e observaram que o orégano foi o mais eficiente, onde a utilização de 400 ppm (0,04%) causou 100% de inativação do microrganismo em meio de cultura líquido.

Em outro estudo, Singh *et al.* (2003) pesquisaram o efeito antimicrobiano de tomilho, sálvia, pimenta, alecrim e cravo contra cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A, F5069 e V7 pelo método de difusão em discos em meio PCA (Plate Count Agar) com sobrecamada de TSA (Ágar Triptose Soja), e observaram que apesar do óleo de tomilho ter sido o mais efetivo, diferentes concentrações (de 0,07% a 0,25% (v/v)) foram necessárias para obter o mesmo efeito inibitório nas diferentes cepas, indicando que uma cepa em particular não pode ser determinada como a mais suscetível ou mais resistente à ação dos óleos essenciais.

Dorman e Deans (2000) utilizaram a metodologia de difusão em poços para avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais de pimenta preta, cravo, noz-moscada, orégano, tomilho e gerânio e observaram que os óleos essenciais que continham maiores concentrações de compostos fenólicos em sua estrutura (carvacrol, timol e eugenol) possuíram uma atividade maior contra os microrganismos.

Segundo Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004), o diâmetro do halo de inibição depende da capacidade de difusão uniforme da substância testada pelo ágar. A maioria dos óleos essenciais e seus compostos ativos são substâncias altamente voláteis e possuem pouca solubilidade em fase aquosa. Este fato torna difícil a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos.

Para melhor visualização dos resultados, a Figura 5 foi subdividida em gráficos simples de 2 dimensões, correlacionando-se a medida dos halos de inibição de *L. monocytogenes* Scott A com as concentrações de O.E.O., para uma dada concentração de nisina (Figuras 6 a 17). Usando o mesmo raciocínio, construímos as Figuras 18 a 23, que demonstram as medidas dos halos de inibição de *L. monocytogenes* com as concentrações de nisina, para uma determinada concentração de O.E.O. (Figuras 18 a 23).

A Figura 7 mostra que o uso de apenas 100 ppm de nisina é suficiente para atuar sinergisticamente com o O.E.O., fazendo com que a combinação de 100 ppm de nisina e 0,2% (v/v) de O.E.O. apresente halos de inibição de 0,87 mm. Apesar do efeito ainda ser considerado baixo, não houve formação de halos de inibição quando estas concentrações foram utilizadas isoladamente (Figura 7 e 6, respectivamente).

A utilização de 200 ppm de nisina (Figura 8) resultou em uma baixa inibição do patógeno quando combinada com 0,05% (v/v) de O.E.O. (0,57 mm), porém este o efeito é sinérgico, visto que neste caso, também o uso isolado das substâncias nestas concentrações não apresentou formação de halos de inibição.

A combinação de 200 ppm de nisina com diferentes concentrações de O.E.O. apresentou um efeito antimicrobiano crescente que segue uma tendência linear (Figura 8). Segundo Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004) não se sabe se a relação entre o tamanho dos halos de inibição e a concentração de óleos essenciais é linear ou logarítmica. A adição de 0,3% (v/v) do óleo a 200 ppm de nisina apresentou halos de inibição de 2,49 mm, ou seja, 0,4 mm maior que a utilização desta concentração de O.E.O. isoladamente. A combinação de 200 ppm de nisina e 0,5% (v/v) de O.E.O. apresentou o efeito mais proeminente (4,00 mm) da ação combinada dos antimicrobianos naturais, portanto, esta concentração foi escolhida para realização dos experimentos em lingüiça frescal refrigerada.

Apesar da baixa atividade observada pela combinação de 400 ppm de nisina com 0,05% (v/v) de O.E.O., observou-se que o efeito é sinérgico. Para esta concentração de

nisina um melhor efeito sinérgico foi observado nas concentrações de 0,2% (v/v) ou maiores concentrações de O.E.O. (Figura 9).

Quando foi utilizado 600 ppm de nisina isoladamente (Figura 10), houve uma baixa atividade antimicrobiana (0,48 mm), porém a adição de O.E.O. potencializou este efeito mesmo em concentrações de 0,05% (v/v) de O.E.O.. A adição de 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% e 0,5% (v/v) resultou em halos de 1,59 mm, 1,95 mm, 2,67 mm, 3,11 mm e 3,69 mm, respectivamente.

A utilização de 800 ppm de nisina (Figura 11) causou um bom efeito antimicrobiano (1,95 mm), porém este efeito diminuiu ao se adicionar 0,05% (v/v) ou 0,1% (v/v) O.E.O., com formação de halos de 1,59 mm e 1,74 mm, respectivamente. O efeito sinérgico da combinação de 800 ppm de nisina com O.E.O. só foi observado a partir da combinação com concentrações mais altas do óleo, 0,3% (v/v) (2,77mm), 0,4% (v/v) (3,11 mm). Para esta concentração de nisina o efeito mais proeminente também é observado com a adição de 0,5% (v/v) de O.E.O. com formação de halos de 3,69mm.

Este mesmo comportamento foi observado quando concentrações de 1600, 1800 e 2000 ppm de nisina foram adicionadas às diferentes concentrações de O.E.O. (Figuras 15, 16 e 17). Nestas concentrações, o uso de nisina isoladamente foi mais ativo contra o patógeno do que quando combinados com 0,05%, 0,1% e 0,2% (v/v) de O.E.O., demonstrando a ocorrência de um efeito antagônico entre estes dois antimicrobianos.

O efeito antimicrobiano de 1000, 1200 e 1400 ppm de nisina apresentou um padrão semelhante, onde a utilização de nisina isoladamente ou em combinação com 0,05%, 0,1% e 0,2% (v/v) (Figuras 12, 13 e 14) apresentou o mesmo resultado. O efeito sinérgico só foi observado a partir da utilização de 0,3% (v/v) de O.E.O., e o efeito mais proeminente foi observado com a adição de 0,5% (v/v) de O.E.O., com formação de halos de 3,78mm, em média.

As figuras 18 a 23, relativas aos halos de inibição em função das concentrações de nisina para uma dada concentração de O.E.O., indicam que para a mesma concentração de O.E.O. a variação na concentração de nisina tem pouco efeito sobre a ação inibitória do O.E.O.

Na Figura 23, observa-se que não há diferença significativa da adição de diferentes concentrações (de 200 a 2000 ppm) de nisina a 0,5% (v/v) O.E.O., apresentando média de halos de 3,82 mm. Houve diferença estatística apenas quando 0,5% (v/v) de O.E.O. foi utilizada isoladamente ou quando utilizada em combinação com 100 ppm de nisina. As concentrações de 0,3% e 0,4% (v/v) apresentaram este

mesmo padrão de atividade inibitória, ou seja, independente da concentração de nisina adicionada (de 200 a 2000 ppm), com médias de 3,26 mm e 2,61 mm, respectivamente (Figuras 21 e 22). Porém, a adição de 100 ppm de nisina às concentrações de 0,3% (2,01 mm), 0,4% (2,34 mm) e 0,5% (v/v) (3,31 mm) não foi suficiente para aumentar o poder antimicrobiano do O.E.O., visto que os resultados não apresentaram diferença estatística significativa aos apresentados com a utilização do O.E.O. isolado.

Os efeitos benéficos do emprego do tratamento combinado de algumas concentrações de O.E.O. e nisina na inibição de *L. monocytogenes* quando comparados aos resultados obtidos quando utilizados isoladamente, concordam com os resultados de outros estudos. Ettayebi, Yamani e Rossi-Hassani (2000) estudaram o efeito individual e combinado de nisina Z e timol contra *L. monocytogenes* e *B. cereus* em meio de cultura líquido em pH 6,5 à 30°C e observaram que concentrações de 40 UI/ml e 75 UI/ml de nisina Z reduziram significativamente a multiplicação do patógeno, enquanto que o efeito combinado de 0,02% (v/v) de timol e 40 UI/ml promoveu reduções ainda maiores. Os autores concluíram que o uso combinado dos antimicrobianos apresentou efeito sinérgico sobre *L. monocytogenes* e *B. cereus*, podendo ser utilizadas concentrações inferiores às necessárias para obter o mesmo efeito quando os antimicrobianos foram utilizados isoladamente.

Yamazaki *et al.* (2004) estudaram o efeito de timol, carvacrol e nisina isolados e em combinação contra *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido à 35°C e observaram que concentrações de 0,025% (v/v) de carvacrol e 0,05% (v/v) de timol apresentaram um efeito bactericida. A utilização de 0,015% (v/v) de carvacrol e 0,02% (v/v) de timol isolados não obteve efeito contra o patógeno, porém a adição de 50 UI/ml ($1,25 \mu\text{gml}^{-1}$) de nisina causou redução na taxa de multiplicação do patógeno. Os autores concluíram que a adição desta concentração de nisina permite a redução do uso do carvacrol e do timol em cerca de 60% e 40%, respectivamente.

Pol e Smid (1999) avaliaram o efeito combinado de nisina e carvacrol contra *L. monocytogenes* em solução tampão pH 7,0 à 8 e 20°C, e observaram que a utilização de baixas concentrações dos antimicrobianos ($0,63 \mu\text{gml}^{-1}$ - 25,2 UI/ml de nisina e 0,026% - 1,7 mM de carvacrol) teve um efeito bacteriostático sobre o microrganismo, enquanto que concentrações mais altas de nisina ($5,3 \mu\text{gml}^{-1}$ - 212 UI/ml) e concentrações subletais de carvacrol (0,01% - 0,7 mM) em combinação, resultaram em efeito sinérgico na supressão completa da multiplicação do patógeno, tanto a 8°C como a 20°C.

Figura 6: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação de diferentes concentrações de óleo essencial de orégano na ausência de nisina, pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 7: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 100 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 8: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 200 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 9: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 400 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 10: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 600 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 11: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 800 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 12: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1000 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 13: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1200 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 14: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1400 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 15: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1600 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 16: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 1800 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 17: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 2000 ppm de nisina e diferentes concentrações de óleo essencial de orégano pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 18: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,05% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 19: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,10% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 20: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,20% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 21: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,30% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 22: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,40% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Figura 23: Medida do halo de inibição (mm) de *Listeria monocytogenes* Scott A pela ação combinada de 0,50% (v/v) de óleo essencial de orégano e diferentes concentrações de nisina pelo método de difusão em poços a 37°C.

Pol, Kramer e Smid (2002) pesquisaram a influência da combinação de nisina e carvacrol sobre o potencial de membrana ($\Psi\Delta$), gradiente de pH (ΔpH) e “pool” ATP intracelular de células vegetativas de *B. cereus*, através da utilização de corantes fluorescentes que se tornam ativos quando ocorrem mudanças na membrana citoplasmática. A leitura da fluorescência foi feita em espectrofotômetro (lentes de excitação a 643 nm e emissão a 666 nm). Os autores observaram que o $\Psi\Delta$ é afetado com baixas concentrações de nisina (0,005 $\mu\text{g/ml}$ – 0,005 ppm) e carvacrol (0,01 mM) isoladamente, sem afetar o número de células viáveis, porém maiores concentrações de nisina ($>2 \mu\text{g/ml}$) afetam $\Psi\Delta$ e o ΔpH . A combinação dos dois antimicrobianos resultou em um aumento da dissipação do $\Psi\Delta$ e numa redução sinérgica sobre o ΔpH e no ATP intracelular, sem o aumento do ATP extracelular, o que sugere que a hidrólise foi causada pelo efluxo de fosfatos, que conseqüentemente levou a uma mudança no equilíbrio da hidrólise de ATP. Este aumento de ATP extracelular pela utilização da combinação dos dois antimicrobianos foi idêntico ao aumento causado pela ação isolada, indicando que o carvacrol não aumenta o efluxo de ATP causado pelo efeito da nisina, ou seja, não aumenta a capacidade de nisina na formação de poros, no seu tamanho, na duração, na quantidade ou na afinidade de nisina pelo lipídio II. Assim, a hidrólise do ATP ocorre provavelmente para a regeneração da força próton motriz como resultado do distúrbio da integridade da membrana, e não pelo efluxo de ATP para o meio extracelular através dos poros.

Periago e Moezelaar (2001) estudaram o efeito combinado de nisina e carvacrol contra *B. cereus* em diferentes valores de pH e temperaturas. Os autores observaram que a combinação de nisina (6 ppm - 15 μgml^{-1}) e carvacrol (0,3 mM) foi mais efetiva contra o patógeno, atuando com efeito sinérgico em pH 5,75 a 30°C.

Singh, Falahee e Adams (2001) avaliaram o efeito combinado de extrato de alho e nisina contra diversas cepas de *L. monocytogenes* em meio de cultura líquido, a 4°C e 30°C após 48 horas de incubação. Os resultados demonstraram que a combinação 2 mgml^{-1} do extrato de alho e 60 ppm de nisina foi suficiente para inibir a mais resistente das cepas (*L. monocytogenes* M) enquanto que a combinação 2 mgml^{-1} do extrato de alho e 10 ppm de nisina foi suficiente para inibir as outras cepas (*L. monocytogenes* F6861, ATCC 2868, 2869 e 2871).

Segundo Bagamboula, Uyttendaele e Debevere (2004), o método de difusão em ágar é útil apenas para a comparação qualitativa da atividade antimicrobiana de óleos

essenciais e seus compostos purificados, visto que não há uma reprodutibilidade na obtenção dos halos de inibição. A escolha pela metodologia do teste de poços em nosso estudo objetivou a utilização de meio de cultura sólido visto que as concentrações determinadas nos experimentos “*in vitro*” foram posteriormente aplicadas em alimento modelo com matriz sólida. Mesmo assim, utilizou-se essa técnica adaptada para difusão em poços, para se determinar as concentrações do O.E.O. e de nisina a serem utilizadas no modelo alimentar que compõe a segunda parte deste trabalho. Em função dos resultados obtidos, selecionou-se 0,5% (v/v) O.E.O. e 200 ppm de nisina como as concentrações a serem testadas no alimento.

5.2. Efeito combinado de óleo essencial de orégano e nisina no controle de *L. monocytogenes* Scott A em lingüiça frescal refrigerada

As Figuras 24, 25 e 26 mostram que o O.E.O. na concentração de 0,5% (v/v), quando utilizado isoladamente, não afetou a multiplicação de *L. monocytogenes* Scott A nas três formulações de lingüiça estudadas, visto que as contagens foram semelhantes às amostras controle, inoculadas com $10^5 - 10^6$ UFC/g de *Listeria monocytogenes*. A interferência da matriz do alimento no desempenho de antimicrobianos ativos “*in vitro*” já havia sido relatada por Lin, Labbe e Shetty (2004), que observaram que a presença de proteínas e gorduras dos alimentos pode diminuir a ação de óleos essenciais por imobilizar os compostos com atividade antimicrobiana.

Outros estudos comprovam que a interferência da matriz alimentar depende do alimento e do óleo essencial testados. Menon e Garg (2001) avaliaram a atividade do óleo essencial de cravo contra *L. monocytogenes* em carne e queijo. Nas amostras de carne, a adição de 0,5% do óleo resultou numa redução da população do patógeno e restringiu a multiplicação nas temperaturas de 7°C e 30°C, mantendo contagens 1,3 ciclos log menores que a amostra controle durante todo o período de armazenamento (10 dias).

Gill *et al.* (2002) avaliaram o efeito listericida de óleo de cilantro na superfície de amostras de carne de porco embaladas à vácuo e observaram que é necessária uma concentração de 6% do óleo essencial para obter redução do patógeno, concluindo que o óleo de cilantro não é um agente adequado para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos cárneos.

Singh *et al.* (2003) estudaram o efeito de óleos de tomilho, cravo e alecrim sobre uma mistura de células de *L. monocytogenes* (Scott A, F5069 e V7) em salsichas tipo “hot-dog” e observaram que, apesar de haver redução da população bacteriana (1,5 ciclos log) pelo efeito dos antimicrobianos (1% (v/v)), este efeito foi significativamente dependente da concentração de gordura presente nas salsichas. Assim, os autores concluíram que os óleos essenciais sozinhos não conferem proteção completa contra o patógeno em salsichas.

Quanto à ação da nisina, verificou-se que imediatamente após a adição de 200 ppm de nisina ocorreu uma redução de aproximadamente 2 ciclos log na concentração de células de *L. monocytogenes* Scott A nas 3 formulações de lingüiça frescal. Entretanto, durante o armazenamento a 5°C por até 10 dias, *L. monocytogenes* continuou se multiplicando (Figuras 24, 25 e 26).

Segundo Aasen *et al.* (2003), a nisina é rapidamente absorvida por proteínas da matriz do alimento, e a alta quantidade de gordura pode diminuir sua atividade. Porém, Reunanen e Saris (2004) avaliaram o tempo de vida útil de lingüiças cozidas e mantidas sob refrigeração (6°C) adicionadas de nisina (11,25 ppm), e observaram que foi possível recuperar 68% da nisina até o 28º dia de análise. Os autores concluíram que a nisina tolerou o processo de cozimento e ainda foi resistente ao armazenamento sob refrigeração, podendo ser utilizada como conservador em lingüiças.

Schillinger *et al.* (2001) observaram que o emprego de 500 ppm de nisina em tofu resultou numa redução inicial das células de *L. monocytogenes*, mas houve multiplicação do microrganismo durante o período de armazenamento por 2 dias a 10°C. A adição de 1000 ppm de nisina foi mais efetiva, prevenindo a multiplicação do microrganismo até o 10º dia de análise.

O uso combinado de 0,5% (v/v) O.E.O. e 200 ppm de nisina na lingüiça frescal refrigerada na formulação 1 (Figura 24) resultou em uma imediata diminuição de 3 ciclos log na contagem de *L. monocytogenes* (tempo 0), que não se alterou até o 2º dia de análise. Esta redução inicial sugere uma ação bactericida, que é limitada, já que as células viáveis remanescentes de *L. monocytogenes* multiplicaram-se durante o período de estocagem. No 10º dia de análise, a contagem do microrganismo ainda manteve-se um ciclo log inferior à amostra controle.

Figura 24: Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre *Listeria monocytogenes* Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 1

Figura 25: Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre *Listeria monocytogenes* Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 2

Figura 26: Efeito de óleo essencial de orégano e nisina isolados e em combinação sobre *Listeria monocytogenes* Scott A em lingüiça frescal refrigerada (5°C), formulação 3

A ausência de sal na lingüiça (formulação 2) intensificou a ação dos antimicrobianos, com redução de 4 ciclos log já na primeira contagem (tempo 2 horas) (Figura 25). Entretanto, a multiplicação de células viáveis remanescentes de *L. monocytogenes* foi mais rápida que nas demais lingüiças. Já no segundo dia de análise, as contagens nessa lingüiça foram semelhantes às obtidas na amostra controle, o que foi mantido ao longo do armazenamento.

Na formulação 3, a ausência de sal e de condimentos teve um efeito negativo na ação combinada dos antimicrobianos (Figura 26). Houve uma redução inicial de 2 ciclos log, com multiplicação das células viáveis remanescentes de *L. monocytogenes* logo no primeiro dia de análise, chegando a contagens que não diferiram significativamente das contagens na amostra controle a partir do segundo dia de análise ($p < 0,05$).

Periago e Moezelaar (2001) observaram que o uso combinado de 0,3 mM de carvacrol e 6 ppm de nisina resultou numa redução de *B. cereus* em duas fases: na primeira houve rápido decréscimo de células viáveis nos primeiros 5-10 minutos e na segunda o decréscimo foi menos evidente com o passar do tempo. No presente estudo, este efeito bifásico também foi observado: quando as células de *L. monocytogenes* entraram em contato com a combinação dos antimicrobianos houve uma boa redução em sua contagem, porém, com o passar do tempo, houve uma recuperação do microrganismo. É importante considerar, entretanto, que o estudo citado foi realizado em soluções tampão, enquanto que na lingüiça pode haver interação dos compostos antimicrobianos com a matriz do alimento, deixando-os indisponíveis para atuar sobre as células remanescentes de *L. monocytogenes*.

Rajkovic *et al.* (2005) analisaram o efeito antimicrobiano de nisina e carvacrol contra *B. circulans* e *B. cereus* em puree de batatas embalado à vácuo e observaram que, ao contrário do presente estudo, o efeito da nisina ($10 \mu\text{g g}^{-1}$) e da combinação de nisina e carvacrol (75,1 mM) foi mais eficiente em alimento modelo que nos experimentos em meio de cultura líquido (BHI).

Lin, Labbe e Shetty (2004) observaram que a utilização da combinação de óleo essencial de orégano, cranberry (75% e 25%, respectivamente) e ácido láctico (pH 6,0) resultou num efeito sinérgico na redução de *L. monocytogenes* (3 ciclos log) em amostras de carne bovina e de peixe até o 8º dia de análise.

Nossos resultados indicam que nos experimentos “in vitro” a ação antimicrobiana estava mais relacionada à concentração de O.E.O., enquanto que nos

experimentos em lingüiça fresca refrigerada, esta ação parece estar mais relacionada à presença de nisina.

Nas Figuras 27, 28, 29 e 30 podemos observar a interferência da formulação da lingüiça sobre o efeito de cada antimicrobiano. Os resultados demonstram que na lingüiça sem sal e sem condimentos (formulação 3) houve uma maior multiplicação de *L. monocytogenes* tanto nas amostras adicionadas dos antimicrobianos como na amostra controle, sugerindo que o sal e os condimentos têm algum efeito inibidor de *L. monocytogenes*.

Figura 27: Efeito da combinação de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano e 200 ppm de nisina contra *Listeria monocytogenes* Scott A nas diferentes formulações de lingüiça fresca refrigerada.

Figura 28: Efeito de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano contra *Listeria monocytogenes* Scott A nas diferentes formulações de lingüiça fresca refrigerada.

Figura 29: Efeito de 200 ppm de nisina contra *Listeria monocytogenes* Scott A nas diferentes formulações de lingüiça fresca refrigerada.

Figura 30: Multiplicação de *Listeria monocytogenes* nas diferentes formulações de lingüiça fresca refrigerada não adicionada de óleo essencial de orégano ou nisina.

A combinação de 0.5% O.E.O. e 200 ppm de nisina foi mais efetiva na formulação 1, mantendo contagens significativamente ($p > 0,05$) inferiores às apresentadas nas formulações 2 e 3, durante todo o período de armazenamento sob refrigeração (5°C). A formulação 2 apresentou resultados semelhantes à formulação 1, porém foram detectadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre todos os tratamentos estudados.

Para melhor avaliar a ação individual e combinada do O.E.O. e da nisina na inibição de *Listeria monocytogenes* na lingüiça, foram feitas análises de regressão,

correlacionando-se a variação da contagem de *L. monocytogenes* ($\Delta \log \text{UFC/g}$) em dois tempos seguidos com o tempo de incubação da lingüiça, preparada com as três formulações que compõem o trabalho, onde:

$$\Delta \log \text{UFC/g} = (\log \text{UFC/g})_{t_a} - (\log \text{UFC/g})_{t_b}$$

Onde: t_a = tempo da primeira contagem

t_b = tempo da contagem seguinte

Esse procedimento permitiu que todas as curvas anteriores (Figuras 24 a 30) fossem normalizadas, iniciando-se sempre no valor de $\Delta \log \text{UFC/g}$ igual a zero. Na Figura 31 estão apresentadas as variações na contagem de *L. monocytogenes* em cada um dos tempos em que a contagem foi realizada, nas três formulações de lingüiças, contendo 0,5% (v/v) O.E.O. apenas (curvas 1B, 2B e 3B, correspondentes às formulações 1, 2 e 3, respectivamente), 200 ppm de nisina apenas (curvas 1C, 2C e 3C, correspondentes às formulações 1, 2 e 3, respectivamente), ou os dois antimicrobianos em combinação (curvas 1A, 2A e 3A, correspondentes às formulações 1, 2 e 3, respectivamente), bem como na lingüiça sem nenhum antimicrobiano (curvas 1D, 2D e 3D, correspondentes às formulações 1, 2 e 3, respectivamente).

Conforme pode ser visto na Figura 31, até o 10º dia de análise, as lingüiças com 0,5% (v/v) de O.E.O. somente, com 200 ppm de nisina somente e a amostra não adicionada dos antimicrobianos (curvas 1B, 1C e 1D, respectivamente), apresentaram taxas de multiplicação ($\Delta \log \text{UFC/g}$) de *L. monocytogenes* que não diferiram estatisticamente ($P < 0,05$). Por outro lado, quando os dois antimicrobianos foram utilizados simultaneamente (curva 1A), a taxa de multiplicação de *L. monocytogenes* foi mais elevada que nos demais tratamentos aplicados às lingüiças preparadas com a formulação 1. Esses resultados indicam que o efeito antimicrobiano do O.E.O. combinado com a nisina nessas concentrações acontece nos primeiros momentos de contato desses antimicrobianos com *L. monocytogenes*. Após 24 horas, as células de *L. monocytogenes* que não foram destruídas, multiplicaram-se significativamente mais (curva 1A) do que nas lingüiças contendo cada antimicrobiano isoladamente (curvas 1B, 1C e 1D) ($P > 0,05$).

As taxas de multiplicação de *L. monocytogenes* nas lingüiças preparadas com a formulação 2, contendo 0,5% (v/v) de O.E.O. somente, 200 ppm de nisina somente e na amostra não adicionada dos antimicrobianos (2B, 2C e 2D, respectivamente) foram significativamente maiores ($P>0,05$) que as obtidas na formulação 1. O uso combinado dos antimicrobianos naturais na formulação 2, apesar de ter causado a maior redução inicial do microrganismo quando comparada às outras formulações com este mesmo tratamento, foi também o tratamento que permitiu a maior taxa de multiplicação das células viáveis remanescentes de *L. monocytogenes*, resultando em contagens de 10^6 UFC/g no último dia de análise, como indica a curva 2A na Figura 31.

Conforme apresentado nas Figuras 27, 28 e 29, as contagens de *L. monocytogenes* nas amostras preparadas com a formulação 3 foram sempre mais elevadas do que nas lingüiças preparadas com as formulações 1 e 2, independente da presença de O.E.O. ou nisina. Além disso, a Figura 31 indica que a ausência de sal e de condimentos aumenta significativamente ($P>0,05$) a taxa de multiplicação de *L. monocytogenes* na lingüiça frescal refrigerada em comparação com as taxas de multiplicação obtidas nas outras formulações. Estes resultados demonstram que o sal e os condimentos atuam como uma barreira adicional à multiplicação de *L. monocytogenes* em lingüiça.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que o O.E.O. e a nisina, quando adicionados em combinação, e a nisina, quando adicionada isoladamente, causam uma redução inicial na contagem de *L. monocytogenes* na lingüiça, independente da formulação utilizada. Entretanto, após 24 horas, as células sobreviventes de *L. monocytogenes* multiplicam-se mais rapidamente nas lingüiças que contém estes antimicrobianos do que nas lingüiças não adicionadas de nenhum composto. Esses dados indicam que esses compostos antimicrobianos não têm a capacidade de controlar o desenvolvimento de *L. monocytogenes* durante o armazenamento da lingüiça em refrigeração, apesar de causar uma imediata redução na contagem logo após a adição ao produto. Para garantir que *L. monocytogenes* não atinja concentrações que possam comprometer a saúde do consumidor, barreiras antimicrobianas adicionais são necessárias.

Legenda:

1A: formulação 1, tratamento combinado 0,5% (v/v) de O.E.O. e 200 ppm de nisina;
 2A: formulação 3, tratamento combinado 0,5% (v/v) de O.E.O. e 200 ppm de nisina;
 3A: formulação 3, tratamento combinado 0,5% (v/v) de O.E.O. e 200 ppm de nisina;
 1B: formulação 1, tratamento com 0,5% (v/v) de O.E.O.;
 2B: formulação 2, tratamento com 0,5% (v/v) de O.E.O.;
 3B: formulação 3, tratamento com 0,5% (v/v) de O.E.O.;

1C: formulação 1, tratamento com 200 ppm de nisina;
 2C: formulação 2, tratamento com 200 ppm de nisina;
 3C: formulação 3, tratamento com 200 ppm de nisina;
 1D: formulação 1, amostra controle, sem adição dos antimicrobianos;
 2D: formulação 2, amostra controle, sem adição dos antimicrobianos;
 3D: formulação 3, amostra controle, sem adição dos antimicrobianos.

Formulação 1: original
 Formulação 2: sem sal
 Formulação 3: sem sal e condimentos

Figura 31: Variações nas contagens de *Listeria monocytogenes* nas diferentes formulações de lingüiça fresca refrigerada submetidas aos tratamentos com óleo essencial de orégano e/ou nisina.

5.3. Análise sensorial

Os resultados obtidos revelaram grande rejeição da lingüiça frescal adicionada de 0.5% O.E.O., tanto no aspecto global (média 3,3), quanto no quesito sabor (média 1,05). Quanto ao aspecto global, o odor e o sabor foram os quesitos mais citados para a recusa da amostra, do total de provadores (53), cerca de 97% desaprovaram a lingüiça devido ao sabor forte e amargo. Estes resultados indicam que apesar de haver um efeito antimicrobiano da combinação de 200 ppm de nisina e 0,5% (v/v) de O.E.O., a aplicação desta concentração de O.E.O. é limitada por alterações causadas nas características sensoriais da lingüiça frescal refrigerada, principalmente no sabor.

6. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

- 1 – A combinação de concentrações adequadas de óleo essencial de orégano e nisina resultam em um efeito sinérgico sobre a inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* Scott A em meio de cultura sólido. A ação mais proeminente do efeito sinérgico nos experimentos “*in vitro*” resultou da combinação de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano e 200 ppm de nisina.
- 2 – O efeito sinérgico do uso combinado de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano e 200 ppm de nisina no controle de *Listeria monocytogenes* Scott A observado em meio de cultura foi também observado em lingüiça frescal refrigerada no tempo 2 horas, porém este efeito antimicrobiano não persiste durante o período de armazenamento à 5°C por 10 dias.
- 3 – A utilização isolada de 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano em lingüiça frescal refrigerada não foi suficiente para atuar sobre as células *Listeria monocytogenes* Scott A, embora a ação inibitória tenha sido comprovada nos experimentos “*in vitro*”.
- 4 – A ausência do sal e condimentos na lingüiça frescal refrigerada propiciou uma multiplicação maior de *L. monocytogenes* Scott A do que a observada nas lingüiças com as outras formulações adicionadas de 200 ppm de nisina e 0,5% (v/v) de óleo essencial de orégano.
- 5 – Apesar do efeito antimicrobiano apresentado pela combinação dos antimicrobianos em lingüiça frescal refrigerada, a concentração de O.E.O. estudada (0,5% (v/v)) compromete as características sensoriais, limitando seu uso neste alimento.

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**, 87, 35-43, 2003.
- ABNT - NBR 12806 – Análise Sensorial de Alimentos e Bebidas. Fevereiro, 8 páginas, 1993.
- 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**, 28, 169-185, 1995.
- ABEE, T.; ROMBOOTS, F.M.; HUGENHOLTZ, J.; GUIHARD, G.; LETELLIER, L. Mode of action of nisin Z against *Listeria monocytogenes* Scott A grown at high and low temperatures. **Applied and Environmental Microbiology**, 60, nº 6, Jun., 1962-1968, 1994.
- ABO-EL SEOUD, M.A.; SARHAN, M.M.; OMAR, A.E.; HELAL, M.M. Biocides formulation of essential oils having antimicrobial activity. **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, 38(3), 175-184, 2005.
- ABREU, C.L.M.; CÂMARA, F.L.A.; FURTADO, E.L.; MAIA E ALMEIDA, C.I. Germinação de *Alternaria solani* sob ação de óleos essenciais. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 065, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 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**, Campinas, 20 (2), 197-203, maio/ago., 2000.
- ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, 3, nº 3, July-September, 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**, 21, 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**, 15, 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**, 98, 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** 57, 13-17, 2001.
- BONNET, M.; MONTVILLE, T.J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, 40, 237-242, 2005.
- BOUTTEFROY, A.; MANSOUR, M.; LINDER, M.; MILLIERE, J.B. Inhibitory combinations of nisin, sodium chloride, and pH on *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 in Both by an experimental design approach. **International Journal of Food Microbiology**, 54, 109-115, 2000.

- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, 50, 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**, 58, n°7, July, 2255-2259, 1992.
- BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – A Review. **International Journal of Food Microbiology**, 94, 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**, 36, 162-167, 2003.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F., Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, 50, 131-149, 1999.
- CASTANHEIRA, P.Z.; SOUZA, E.K.; ARRUDA, A.L.A. MARQUES, M.C.S.; RESENDE, U.M. Atividade antifúngica de óleos essenciais. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 075, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- CASTRO, N.E.A.; SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; SOARES, M.J.; CARVALHO, G.J. Efeito do óleo essencial de *Eucalyptus camaldulensis* sobre o crescimento do tripanosomatídeo *Herpetomonas samuelpessoai*. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 061, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- 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**, 90, 15-22, 2004.

- CHUNG, H.-J.; MONTVILLE, T.J.; CHIKINDAS, M.L. Nisin depletes ATP and proton motive force in mycobacterium. **Letters in Applied Microbiology**, 31, 416-420, 2000.
- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L., Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. Journal of Food Microbiology**, 71, 1-20, 2001.
- CUTTER, C. N.; SIRAGUSA, G. Population reductions of Gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **Journal of Food Protection**, 58, n° 9, 977-983, 1995.
- 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**. 48, 2576-2581, 2000.
- DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-phenols. In: NAIDU, A.S., eds. **Natural Food Antimicrobial Systems**. California: CRC Press, 2000. pg. 265-294.
- 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**, 43 (2), 129-139, 2005.
- DESMAZEAUD, M. Bacteriocins of lactic acid bacteria (LAB) and their interest to improve the hygienic quality of products. **Tecnologia Lactea Latinoamericana**, Buenos Aires, 28 (8), 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** 2, 110-112, 1991.
- DESTRO, M.T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D.Y.; Comparison of two plating media for the isolation of *Listeria* sp from some Brazilian dairy and meat products. **Rev. Microbiol.** 23(4), 256-259, 1992.

- DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, 14, 273-285, 2004.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, 88, 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**, 83, 255-262, 2003.
- DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A. Influência da época de colheita na atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas cultivadas no CPQBA/ Unicamp. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 039, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- DUFOUR, M.; SIMMONDS, R.S.; BREMER, P.J. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of “natural” antimicrobials. **International Journal of Food Microbiology**, 85, 249-258, 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**, 73, 71-81, 2002.
- ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D.A.; MOUNT, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, 64, nº 7, 1019-1024, 2001.
- ELOTMANI, F.; ASSOBBEI, O. *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. **Letters in Applied Microbiology**, 38, 60-65, 2003.

- ENNAHAR, S.; SASHIHARA, T.; SONOMOTO, K.; ISHIZAKI, A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews**, 24, 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**, 183, 191-195, 2000.
- EVANGELISTA, A.F.; GOIS, M.S.; SANTANA, J.C.C.; SOUZA, R.R. Avaliação do efeito cupinicida de óleo essencial de cascas de laranja. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 044, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- FENLON, D.R., *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: RYSER, E. T.; MARTH, E.H.; eds. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2^a ed. Marcel Dekker, New York, 1999. Pg. 21-37.
- FERREIRA, R.S.; BARBOSA, A.M.; YASSUMOTO, L.; SOUZA, J.R.; PINTO, J.P.; FACCIONE, M.; ISHIKAWA, N.K.; FARIA, T.J. Avaliação da atividade antifúngica do eugenol obtido do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. pelo método de difusão em agar. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 069, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- GARNEAU, S.; MARTIN, N.I.; VEDERAS, J.C. Two peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochemie**, 84, 357-364, 2002.
- GILL, A.O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R.A., Evaluation of Antilisterial Action of Cilantro Oil on Vacuum Packed Ham. **International Journal of Food Microbiology**, 73, 83-92, 2002.
- GOULD, G.W., Methods for preservation and extension of shelf life. **International Journal of Food Microbiology**, 33, 51-64, 1996.

- 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**, 37, 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. (Review) **Journal of Applied Microbiology**, 98, 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**, 86, 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**, 56, nº 3, 252-255, 1993.
- HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R., Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**., Des Moines, 52, 384-387, 1989.
- HARRIS, L. J.; FLEMING, H. P.; KLAENHAMMER, T.R. Sensitivity and resistance of *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Scott A, and UAL500 to nisin. **Journal of Food Protection**, 54, nº 11, 836-840, Nov., 1991.
- HARTMAN, P. A.; HARTMAN, P.S.; LANZ, W. W. Violet Red Bile 2 Agar for Stressed Coliforms. **Applied Microbiology**, 29, nº 4, Apr., 537-539, 1975.
- 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**, 46, 3590-3595, 1998.
- JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews**, Jun., 171-200, 1995.

- JAMUNA, M.; BABUSHA, S.T.; JEEVARATNAM, K. Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. **Food Microbiology**, 22, 449-454, 2005.
- JAY, J.M., Prevalence of *Listeria spp.* in meat and poultry products. **Food Control**, 7, nº.4/5, 209-214, 1996.
- JAY, J.M. Introdução aos microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 22, p. 454-489.
- KLAENHAMMER, T.D. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 12, 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**, jun.-jul., 16, 334-338, 2004.
- KUIPERS, O.P.; BUIST, G.; KOK, J. Current strategies for improving food bacteria. **Res. Microbiology**, 151, 815-822, 2000.
- 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**, 91, 453-462, 2001.
- LAUKOVÁ, A. In vitro treatment of different isolates from cattle dung and pig slurry by nisin. **ACTA Vet. BRNO**, 69, 147-151, 2000.
- LEUSCHNER, R.G.K.; IELSCH, V. Antimicrobial effects of garlic, clove and red chilli on *Listeria monocytogenes* in both model systems and soft cheese. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 54, 127-133, 2003.

- LEVERENTZ, B.; CONWAY, W.S.; CAMP, M.J.; JANISIEWICZ, W.J.; ABULADZE, T.; YANG, M.; SAFTNER, R.; SULAKVELIDZE, A. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and bacteriocin. **Applied and Environmental Microbiology**, 69, n° 8, 4519-4526, Aug., 2003.
- LIMA, A.T.F.; ROSSINI, E.M.M.; POMPERMAYER, D.M.C. Incidência de *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Resumos**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, C.D.; NERI, D.K.P.; MORAES, J.C. Bioatividade de óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) sobre a largata-do-caruncho do milho. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 106, Campinas, 2005a. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- LIMA, R.K.; CARDOSO, M.G.; SANTOS, C.D.; FREIRE, J.M.; NASCIMENTO, E.A.; MORAES, S.A.L. Avaliação do óleo essencial de folhas de goiabeira (*Psidium guajava* L.) em diferentes horários de coleta. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 109, Campinas, 2005b. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- 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**, sept., 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**, 61, 449-455, 2002.
- LÜCKE, F-K., Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, 56, 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**, 10, 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**, 84, 538-544, 1998.
- MARCO, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J.; COLL, P.; GASSER, J.; FERRER, M.D.; SIMON M., In vitro activities of 22 antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* strains in Barcelona – Spain. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**. 38, 259-261, 2000.
- MARINHO, S.C.; NASCIMENTO, A.R.; MOUCHREK FILHO, V.E.; MOUCHREK FILHO, J.E.; MARTINS, A.G.L.A.; TELES, R.M.; MONTEIRO, O.S. Atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* (L.) Merr. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 068, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- 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**, 67, 187-195, 2001.
- MARTÍN, B.; JOFRÉ, A.; GARRIGA, M.; HUGAS, M.; AYMERICH, T. Quantification of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages by MPN-PCR method. **Journal in Applied Microbiology**, 39(3), 290-295, 2004.
- 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**, 42, 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**, 32, 32 –
37, jan., 2001.
- MARTINIS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M.; Fundamentals and
perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat
products. 18, nº1/2, 191-208, 2002.
- McAULIFFE, O.; ROSS, R.P.; HILL, C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and
mode of action, **FEMS Microbiology Reviews**, 25, 285-308, 2001.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T.; **Sensory Evaluation Techniques**.
United States of America – Florida: CRC. 3ª edição, 1999. 387p.
- 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**, 34, 27-31, 2002.
- MENON, K.V.; GARG, S.R. Inhibitory effect of clove on *Listeria monocytogenes* in
meat and cheese. **Food Microbiology**, 18, 647-650, 2001.
- 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**, 71, 79-83, 2000.
- MONTVILLE, T.J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent
progress and unresolved questions. **Applied Microbiology Biotechnology**, 50,
511-519, 1998.
- MONTVILLE, T. J.; WINKOWSKI, K.; LUDESCHER, R. D. Models and mechanisms
for bacteriocin action and application. **International Dairy Journal**, 5, 797-814,
1995.

- 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)**, 38, 565-570, 2005.
- MOUREY, A.; CANILLAC, N., Anti-*Listeria monocytogenes* activity of oil components of conifers. **Food Control**, 13, 289-292, 2002.
- NATTRESS, F.M.; BAKER, L.P. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. **International Journal of Food Microbiology**, 85, 259-269, 2003.
- NILSSON, L.; CHEN, Y.; CHIKINDAS, M.L.; HUSS, H.H.; GRAM, L.; MONTVILLE, T.J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 769-774, 2000.
- NILSSON, L.; HUSS, H.H.; GRAM, L. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere. **International Journal of Food Microbiology**, 38, 217-227, 1997.
- 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**, 37, 155-162, 1997.
- ÖZCAN, M.; ERKMEN, O. Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. **Eur. Food Res. Technology**, 212, 658-660, 2001.
- PAWAR, D.D.; MALIK, S.V.S.; BHILEGAONKAR, K.N.; BARBUDDHE, S.B. Effect of nisin and its combination with sodium chloride on the survival of *Listeria monocytogenes* added to raw buffalo meat mince. **Meat Science**, 56, 215-219, 2000.

- PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R., Combined effect on nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **International Journal Food Microbiology**. 68, 141-148, 2001.
- PIMENTA RODRIGUES, M. V.; NOGUEIRA, N.G.P.; PILLA, C.M.P.; FUSCO ALMEIDA, A.M.; PIETRO, R.C.L.R. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da *Eugenia uniflora*. In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 002, Campinas, 2005. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- POL, I.E.; KROMER, J.; SMID, E.J. Bioenergetic consequences of nisin combined with carvacrol towards *Bacillus cereus*. **Innovative Food Science % Emerging Technologies**, 3, 55-61, 2002.
- POL, I.E.; SMID, E.J., Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, 29, 166-170, 1999.
- POTENZA, M.R.; JOCYS T.; NAKAOKA SAKITA, M.; RAMOS, A.C.O.; COSTA, N.S.; FERREIRA, E.B. Avaliação inseticida de óleos essenciais para o controle do caruncho do milho (*Sitophilus zeamais*). In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 095, Campinas, 2005a. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- POTENZA, M.R.; JUSTI JUNIOR, J.; NAKAOKA SAKITA, M.; RAMOS, A.C.O.; NASCIMENTO, M.N.; OLIVEIRA, R.C.G. Avaliação de óleos essenciais de eucalipto (*Eucalyptus* spp) para o controle de baratas (*Blattella germânica*). In: III SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 093, Campinas, 2005b. **Resumos**. Campinas: Documentos Instituto Agrônômico (IAC), 77, 2005.
- 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)**, 38, 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**, 22, 189-197, 2005.
- RAJU, C.V.; SHAMASUNDAR, B.A.; UDUPA, K.S. The use of nisin as a preservative in fish sausage stored at ambient ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) and refrigerated ($6 \pm 2^\circ\text{C}$) temperatures. **International Journal of Food Science and Technology**, 38, 171-185, 2003.
- REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T; TANTAOU-ELARAKI, A.; ETTAYEBI M.,
Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. **Pharm-Belg.** 48, 352-356, 1993.
- REUNANEN, J.; SARIS, P.E.J. Bioassay for nisin in sausage; a shelf life study of nisin in cooked sausage. **Meat Science**, 66, 515-518, 2004.
- RILEY, M.A.; WERTZ, J. E., Bacteriocin diversity ecological and evolutionary perspectives. **Biochemie**, 84, 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^a ed. Marcel Dekker, New York, 1999. Pg. 1-20.
- RODGERS, S., Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures – A Review. **Trends in Food Science & Technology**. 12, 276-284, 2001.
- RODRIGUEZ, E.; TOMILLO, J.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. **Journal of Applied Microbiology**, 83, 389-395, 1997.
- RÓRVIK, L.M.; AASE, B.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in broilers and poultry products. **Letters in Applied Microbiology**, 94 (4), 633-640, 2003.

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

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)**, 38, 21-28, 2005.

SCHLLINGER, U.; BECKER, B.; VIGNOLO, G.; HOLZAPFEL, W.H. Efficacy of nisin in combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in Tofu. **International Journal of Food Microbiology**, 71, 159-168, 2001.

SCHILLINGER, U.; KAYA, M.; LÜCKE, F.K. Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. **Journal of Applied Bacteriology**, 70, 473-478, 1991.

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**, Santa Maria, 34, nº. 3, mai.-jun., 911-916, 2004.

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

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)**, 36, 787-794, 2003.

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**, 44, 1202-1205, 1996.

- SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A., *Listeriosis* in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H.; eds. ***Listeria, Listeriosis and Food Safety***. 2^a ed. Marcel Dekker, New York, 1999. Pg. 75-95.
- 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 of natural flavor complexes used as ingredients in food: essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, 43, 245-363, 2005.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, 26, 118-122, 1998.
- SONG, H-J.; RICHARD, J. Antilisterial activity of three bacteriocins used at sub minimal inhibitory concentrations and cross-resistance of the survivors. **Int. Journal of food Microbiology**, 36, 155-161, 1997.
- SZABO, E.A.; CAHILL, M.E. The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA™ 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, 43, 21-31, 1998.
- THOMAS, L.V.; CLARKSON, M.R.; DELVES-BROUGHTON, J. Nisin. In: NAIDU, A.S., eds. **Natural Food Antimicrobial Systems**. California: CRC Press, 2000. pg. 463-524.
- THOMAS, L.V.; DAVIES, E.A.; DELVES-BROUGHTON, J.; WIMPENNY, J.W. Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of Gram-positive bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, 85, 1013-1022, 1998.
- ULTEE, A.; GORRIS, L.G.M.; SMID, E.J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogens *Bacillus cereus*. **Journal of Applied Microbiology**, 85, 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**, 174, 233-238, 2000.
- VILLANEUVA, N.D.M.; PETENATE, A.J., SILVA. Performance of three affective methods and diagnosis of the ANOVA model. **Food Quality and Preference**, v. 11, p. 367-370, 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**, 21, 283-289, 2004.
- ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 49, 5165-5170, 2001.
- ZINK, D. L. The impact of consumer demands and trends on food processing. **Emerging Infectious Diseases**, 3, nº 4, October-December, 467-469, 1997.

ANEXO I
CADASTRO DE CONSUMIDORES
ANÁLISE SENSORIAL DE ALIMENTOS

Estamos selecionando pessoas para participar de uma equipe de provadores de lingüiça frescal refrigerada adicionada de óleo essencial de orégano e nisina, que avaliará a aparência, o sabor e o aroma do produto e dará a sua opinião sobre ele. Os dados serão mantidos em sigilo e você terá total liberdade em desistir da equipe de provadores.

A data, horário serão ainda definidos e a duração do teste é de apenas um dia. Se você estiver interessado em participar voluntariamente, por favor, preencha o questionário abaixo.

Nome: _____

Data: _____

Telefone p/ contato: (____) _____ / (____) _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

E-mail: _____

1- Sexo: (☐) masculino
(☐) feminino

2- Idade (faixa etária):

(☐) 21-25 anos

(☐) 25-30 anos

(☐) 31-34 anos

(☐) 35-44 anos

(☐) 45-54 anos

(☐) Acima de 55 anos

3. Grau de escolaridade:

(☐) primeiro grau

(☐) segundo grau

(☐) superior completo

(☐) superior incompleto

(☐) pós-graduação

4. Você permanecerá na USP até dezembro/2005? () Sim () Não

5. Existe algum dia ou horário de preferência para participar da sessão de degustação?

Explique. _____

6. Com que frequência você consome lingüiça frescal:

() diariamente

() de 2 a 5 vezes por semana

() 1 vez por semana

() ocasionalmente (menos de 1 vez por semana, na média)

() nunca experimentei

7. Em caso de já ter experimentado lingüiça frescal, indique na escala abaixo o quanto você gosta ou desgosta deste produto.

9. Gosto muitíssimo

8. Gosto muito

7. Gosto moderadamente

6. Gosto ligeiramente

5. Indiferente

4. Desgosto ligeiramente

3. Desgosto moderadamente

2. Desgosto muito

1. Desgosto muitíssimo

8. Você tem alguma restrição em comer lingüiça de carne suína? () Sim () Não

Em caso positivo, especifique: _____

9. Você passa no momento por algum problema de saúde? () Sim () Não

Em caso positivo, especifique: _____

10. Está fazendo uso de algum medicamento? () Sim () Não

Em caso positivo, especifique: _____

11. Está fazendo algum tipo especial de dieta? () Sim () Não

Em caso positivo, especifique: _____

12. É gestante? () Sim () Não

13. É fumante? () Sim () Não

Termo de Consentimento:

Compreendi os objetivos do teste descrito nesta ficha, as informações por mim aqui prestadas são verdadeiras e autorizo os responsáveis pela condução do referido teste a utilizar estas informações na seleção de provadores.

São Paulo, ____/____/____

Documento de Identidade

Assinatura do candidato