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

Atividade antimicrobiana de nisina e óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes*
isolada de alimentos

Patrícia Polleti Bettini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dra. Bernadette D.G.M.Franco

São Paulo

2005

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

Atividade antimicrobiana de nisina e óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes*
isolada de alimentos

Patrícia Polleti Bettini

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^ª. Dra. Bernadette D.G.M.Franco

São Paulo

2005

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

Bettini, Patrícia Polleti
B565a Atividade antimicrobiana de nisina e óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes* isolada
de alimentos / Patrícia Polleti Bettini. -- São Paulo, 2005.
37p.
38

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e
Nutrição Experimental. FBA

Orientador: Franco, Bernadette Dora Gombossy de Melo

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

664.07 CDD

Patrícia Polleti Bettini

Atividade antimicrobiana de nisina e óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare* L.) sobre *Listeria monocytogenes*
isolada de alimentos

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Bernadette Dora G. Melo Franco
orientador/presidente

1º examinador
Roxane Maria Fontes Piazza

2º examinador
Jorge Herman Behrens

São Paulo, 27 de setembro de 2005.

AGRADECIMENTOS:

- À Profª Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pela orientação, carinho, dedicação e amizade.
- Às professoras do departamento, Marisa Landgraf e Maria Tereza Destro, pela amizade, e pelos ensinamentos.
- Às funcionárias do laboratório, Lúcia e Kátia, pelas dicas e pelos momentos alegres dentro do laboratório.
- Aos queridos colegas do laboratório: Alcina, Antônio, Eb, Cecília, Cristiano, Gabriela, Gunnar, Hans, João, Juliana, Jane, Janine, Kátia Lima, Lina, Luciano, Mônica, Patrícia Kary, Paulo, Ricardo, Tatiana, Vanessa Vieira, Vanessa Tsuhako, Vinícius, Susana, pelo apoio e amizade, por participarem de minhas alegrias, e do meu trabalho no laboratório durante esses anos.
- Agradecimento especial à Cláudia Moreno Rosa, pela sua ajuda, dedicação e apoio no início do meu trabalho.
- Aos colegas e professores de outros departamentos e laboratórios da USP.
- Ao Paulo Sobrinho, pela sua ajuda e dedicação na parte estatística do meu trabalho.
- À todos os momentos muito felizes que tive na USP.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.OBJETIVO.....	11
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1. Meios de Cultura e Soluções.....	11
3.2. Cultura Microbiana.....	12
3.3. Antimicrobianos Naturais.....	13
3.3.1. Nisina.....	13
3.3.2. Óleo essencial de orégano.....	13
3.4. Avaliação da ação dos antimicrobianos naturais sobre <i>Listeria monocytogenes</i>.....	15
3.4.1. Avaliação da ação individual da nisina sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.4.2. Avaliação da ação individual do óleo essencial de orégano sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	15
3.4.3. Avaliação da ação da nisina em combinação com o óleo essencial de orégano.....	16
3.5. Interpretação dos Resultados.....	17

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

FIGURAS

Figura 1: Procedimentos adotados para a avaliação do efeito combinado do óleo essencial de orégano e nisina sobre *L. monocytogenes*.....14

Figura 2: Taxa de inativação de *L. monocytogenes* causados por óleo essencial de orégano e nisina, isoladamente e em diferentes combinações.....22

TABELAS

Tabela 1: Efeito do óleo essencial de orégano e de nisina, isoladamente e combinados, sobre uma cultura de *L. monocytogenes* contendo 10^6 UFC/ml.....19

Tabela 2: Resultados dos testes de médias de Duncan aplicados às contagens de *L. monocytogenes* em TSBYE contendo nisina e óleo essencial de orégano em diferentes concentrações, após incubação a 30 °C por 2, 4, 6 e 8 horas.....20

Tabela 3. Resultados dos testes de médias de Duncan aplicados às contagens de *L. monocytogenes* em TSBYE contendo 0,02% de óleo essencial de orégano e 5 ou 10 UI/ml de nisina, após incubação a 30°C por 2, 4, 6 e 8 horas..... 21

1. INTRODUÇÃO:

A listeriose, doença causada por *Listeria*, foi primeiro observada em animais por Hulphers em 1911, quando o gênero era chamado de *Listerella*. A doença foi relatada em humanos pela primeira vez em 1929 e foi associada com doença perinatal em 1933. A partir de 1940, o gênero passou a ser designado de *Listeria* (JAY,1996).

Análises filogenéticas por métodos de biologia molecular permitiram uma melhor observação da diversidade dentro do gênero *Listeria*, que contém atualmente seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*, como evidenciado por técnicas de homologia de DNA, sequência 16rRNA, propriedades quimiotaxonômicas e análise de enzima multilocus (ROCOURT,1999).

O agente etiológico da maioria dos casos de listeriose em humanos é *Listeria monocytogenes*, um bacilo Gram positivo, pequeno, curto, de 0,4-0,5 µm de diâmetro e 0,5 -2 µm de comprimento, com extremidades arredondadas, anaeróbio facultativo, não esporulado, e amplamente distribuído no meio ambiente (FARBER & PETERKIN,1999; ROCOURT, 1999). Pode se apresentar em unidades ou em cadeias pequenas, produz catalase, mas não oxidase, é móvel a 25°C, com movimento característico de tombamento, e é imóvel a 35°C (HENSYL, 1994).

São conhecidas 13 sorovariedades, mas somente três (4b, 1/2a e 1/2b) são responsáveis por 89% a 96% dos casos de listeriose humana (ICMSF, 1996; TOMPKIN, 2002).

Listeria monocytogenes pode ser isolada do solo, lama, vegetação íntegra ou em decomposição, silagem, rios, lagos, águas residuais, efluentes de abatedouros e plantas processadoras de alimentos, além de aves, mamíferos, insetos, peixes e crustáceos (FARBER & PETERKIN,1999).

A vegetação e a silagem em decomposição têm sido citadas como fontes de infecção de animais , podendo a contaminação ser capaz de se propagar através da cadeia alimentar, e dessa maneira, tornar-se um perigo para a indústria de alimentos, já que *L. monocytogenes* pode sobreviver por um longo período no ambiente, em condições adversas, multiplicando-se em plantas de processamento de alimentos (FENLON, 1999).

A temperatura ideal de multiplicação de *L. monocytogenes* é de 30 a 37°C, com capacidade de sobrevivência em uma ampla faixa de temperatura: de 1 - 2°C a 45°C, tornando-se assim, um risco para a segurança de alimentos refrigerados. *L. monocytogenes* pode tolerar concentrações de 10 a 30% de cloreto de sódio e multiplicar-se em uma atividade de água de 0,90. O patógeno se multiplica em valores de pH de 4,4 a 9,6, com pH ótimo de 7,0 (DONNELLY,1999).

A listeriose em humanos é uma doença contraída principalmente pelo consumo de alimentos contaminados e é freqüentemente vista como uma doença invasiva em um grupo de risco bem definido, ocorrendo principalmente em mulheres grávidas, idosos, indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida, alcoolismo e cirrose, portadores de *diabetes mellitus*, doenças cardiovasculares e renais, carcinomas e outras doenças que comprometem o sistema imunológico (FARBER & PETERKIN,1999).

A síndrome clínica associada à listeriose é semelhante à causada pelo vírus influenza, sendo sua sintomatologia semelhante a da gripe, acompanhada de febre moderada. O índice de mortalidade é de 30% entre imunodeprimidos, debilitados ou recém nascidos. Nos casos de comprometimento do SNC, a manifestação se dá através de meningite, encefalite e abscessos. Em mulheres grávidas, pode haver contaminação do feto, podendo ocorrer aborto, parto prematuro, nascimento de natimorto ou septicemia neonatal (FARBER & PETERKIN, 1999; SCHUCHAT,1999).

Seres humanos e animais saudáveis podem atuar como portadores intestinais da bactéria. Estima-se que 2 a 16% dos animais saudáveis, entre eles, bovinos, suínos e ovinos, albergam *L. monocytogenes* no trato intestinal, eliminando a bactéria em seus excrementos (FARBER & PETERKIN, 1999).

L. monocytogenes está presente em vários tipos de alimentos, porém os laticínios são considerados um dos mais importantes veículos da listeriose. Há casos de contaminação tanto de leite cru como pasteurizado, e também em outros produtos derivados de leite como sorvetes, queijo fresco, ricota, queijos dos tipos Munster, Roquefort, Camembert e Brie. Os primeiros surtos confirmados de listeriose causados por queijo contaminado foram relatados em 1980 nos EUA e na Suíça (HOF, 2003).

Os laticínios se tornam mais susceptíveis à contaminação por *L. monocytogenes* porque esse microrganismo pode se manter vivo no leite, introduzindo uma contaminação na planta processadora de leite, e conseqüentemente no produto final (HARRIS *e cols.*, 1989). Vários surtos de listeriose foram causados pelo consumo de queijo, geralmente queijos macios frescos ou maturados com bolores superficiais. Verificou-se que a causa da contaminação foi o emprego de leite cru na fabricação dos produtos, ou contaminação pós- processamento (FDA, 2003).

FIGUEIREDO (2000) analisaram 260 amostras de diferentes pontos de uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C, obtendo 15% (39) de positividade para o gênero *Listeria*, e 7,3% (19) para *L. monocytogenes*. Entre as cepas de *L. monocytogenes* submetidas à tipagem sorológica, foram identificados os sorogrupos 1/2 e 4, principais responsáveis pelos casos de listeriose em humanos (TOMPKIN, 2002).

Objetivando monitorar a presença de *L. monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* em pontos críticos de controle (PCC) e ambientes do processamento de queijo Minas frescal em dois laticínios do Estado da Bahia, SILVA *e cols.*, (2002) analisaram 218 amostras, sendo 54 de alimentos, 129 de utensílios, equipamentos e mãos de manipuladores, e 35 de pisos e drenos. *Listeria* spp foi detectada em 6,0% das amostras, com presença de *L. monocytogenes* 4b em leite cru e de *L. monocytogenes* 1/2a no piso de câmara fria (1,0%); *L. innocua* 6a em leite cru, leite pasteurizado, massa de queijo, mangueira utilizada para retirar o soro, pisos e drenos (4,13%) e *L. grayi* em leite cru e massa (1,0%). Os autores concluíram que a presença de *L. monocytogenes* nas amostras de leite cru indica a necessidade de monitoramento freqüente na etapa de pasteurização do leite e durante as operações de lavagem e sanitização de utensílios, equipamentos e ambientes, para evitar a ocorrência de contaminação cruzada.

L. monocytogenes também pode ser isolada de produtos cárneos, como aves, principalmente peru e frango, embutidos, carnes cruas e carne bovina moída (HOF, 2003). Tem sido relatada uma prevalência de 5 a 13% em produtos cárneos, sendo que no Brasil essa incidência é muito maior (DE MARTINIS & FRANCO, 1998).

No Rio Grande do Sul, LIMA *e cols.* (2003a) analisaram 106 amostras de lingüiça de carne suína, de carne de frango, mista, tipo calabresa e tipo toscana, coletadas entre maio de 2002 e maio de 2003. *Listeria* sp. foi encontrada em 73 amostras (70%) e *L. monocytogenes* foi isolada em 11 amostras (10,4%). Os mesmos autores (2003b) estudaram a disseminação de *Listeria* spp, em especial *L. monocytogenes*, dentro de plantas de processamento de lingüiças mistas do tipo frescal, elaboradas em três frigoríficos com Inspeção Sanitária Estadual, na região de Pelotas/RS. Das 55 amostras analisadas, *Listeria* sp. foi isolada em 41 amostras (74,5%), com *L. innocua* em 21 (38,2%), *L. monocytogenes* em 11 (20%), *L. welshimeri* em 8 (14,5%) e *L. graveyi* em 1 (1,8%). Dos tipos de lingüiças analisadas, a de carne de frango apresentou maior incidência de *L. monocytogenes* (33,3%), *L. innocua* (66,7%) e *L. graveyi* (8,3%). A lingüiça tipo calabresa apresentou maior incidência de *L. welshimeri* (33,3%).

Em Pelotas/RS, VON LAER (2004) avaliou a presença de *L. monocytogenes* em uma linha de processamento de lingüiça mista frescal em um frigorífico, analisando-se amostras de matéria-prima, manipuladores, produto final e equipamentos. Das 69 amostras coletadas, o autor observou que 17 (24,6%) apresentaram contaminação com *L. monocytogenes*. As amostras provenientes do produto final apresentaram maior contaminação pelo patógeno: todas (100%) estavam contaminadas. Em relação ao ambiente, equipamentos, manipuladores e matéria-prima, 21% (4), 20,8% (5), 20% (1) e 6,6% (1) das amostras apresentaram contaminação com *L. monocytogenes*, respectivamente.

ARAGON *e cols.*, 2003, analisaram 120 amostras de carne e derivados, adquiridas no comércio na cidade de São Paulo, verificaram que *Listeria* sp. foi encontrada em 65,8% das amostras e *L. monocytogenes* em 48,3% .

JAY, 1996, fez uma revisão referente à prevalência de *L. monocytogenes* em produtos cárneos, no período de 1971 a 1994, e relatou que geralmente as carnes frescas tendem a conter uma quantidade de *L. monocytogenes* inferior a 100 células/g, enquanto as carnes processadas e produtos avícolas contém um número muito maior desse microrganismo.

As frutas e vegetais são menos mencionados como fontes de *L. monocytogenes*, entretanto alface fresca, aipo e tomates já tinham sido envolvidos em casos de listeriose. Em um surto envolvendo repolho, concluiu-se que o esterco de ovelhas, utilizado para fertilizar a plantação, pode ter sido a principal fonte de contaminação (HARRIS *e cols.*, 1989).

A maioria dos surtos de listeriose foram relatados em países desenvolvidos, como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, França e Holanda, sendo conhecidos desde os anos 80. O primeiro surto documentado ocorreu em 1981, no Canadá, quando 41 pessoas ficaram doentes após ingerirem salada de repolho tipo “coleslaw”. Nesse surto, a taxa de mortalidade foi superior a 28% (SCHLECH *e cols.*, 1983).

No ano 2000, nos Estados Unidos, 29 pessoas de dez Estados ficaram doentes, e quatro delas morreram, após ingerirem carne de peru pronta para consumo (“turkey deli meats”), contaminada com o microrganismo. E no ano de 2002, também nos Estados Unidos, após ingerirem o mesmo tipo de alimento contaminado com o microrganismo, 46 pessoas de oito Estados ficaram doentes, e sete delas morreram (CDC, 2000; CDC, 2002).

Outro grupo de alimentos que tem recebido grande atenção, pelo seu potencial em transmitir a listeriose, são os peixes e frutos do mar, incluindo ostras, mariscos e mexilhões (HOF, 2003). Estudos demonstraram que *L. monocytogenes* pode sobreviver a todas as etapas do processo de defumação de salmão, sendo capaz de se multiplicar no produto final, quando mantido sob refrigeração, por um período de aproximadamente 30 dias (MOTT & HUDSON, 1993).

A indústria alimentícia tem grande preocupação em fornecer aos consumidores produtos microbiologicamente seguros e que atendam à grande demanda por alimentos prontos para o consumo, sem adição de conservadores químicos e submetidos a processamento mínimo (CLEVELAND *e cols.*, 2001). Devido à crença que todos os conservantes químicos em alimentos são tóxicos, há um aumento da cobrança sobre as indústrias alimentícias para que não utilizem esses produtos, adotando alternativas naturais para a obtenção de alimentos microbiologicamente seguros (SOUZA, LIMA e NARAIN, 2003).

Uma alternativa natural para o controle de *L. monocytogenes* em alimentos é a adição de bacteriocinas, que são um grupo heterogêneo de proteínas antibacterianas, produzidas principalmente por bactérias lácticas. Esses compostos variam em seu espectro de atividade, modo de ação, peso molecular, origem genética e propriedades bioquímicas (ABEE, 1995; POL & SMID, 1999).

Quatro classes de bacteriocinas tem sido bem caracterizadas por estudos bioquímicos e genéticos. Essas classes são: (i) lantibióticos; (ii) pequenos peptídios termo-estáveis; (iii) proteínas maiores termolábeis; e (iv) complexo protéico que requer lipídio ou carboidrato para sua atividade (CHEN & MONTVILLE, 1995).

A bacteriocina mais conhecida e mais estudada é a nisina A, produzida por cepas de *Lactobacillus lactis* sp *lactis*. A nisina A é um peptídio com 34 resíduos de aminoácidos, que possui uma grande capacidade de inibir o crescimento principalmente de bactérias Gram positivas (ABEE, 1995; LAUKOVÁ, 2000; CLEVELAND *e cols.*, 2001).

A nisina é classificada como um lantibiótico, uma bacteriocina da classe Ia, que consiste de peptídios de baixo peso molecular (< 5kDa) que contem aminoácidos incomuns como a lantionina e β metil-lantionina. Esses peptídios são catiônicos e hidrofóbicos e possuem uma estrutura mais flexível comparada à estrutura mais rígida das bacteriocinas de classe Ib (CLEVELAND *e cols.*, 2001).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas atuam na membrana celular. Elas causam um desarranjo na integridade da membrana citoplasmática, aumentando sua permeabilidade a pequenos compostos. A adição da bacteriocina à células vegetativas resulta em um efluxo dos íons pré acumulados, aminoácidos e moléculas de ATP no citoplasma da célula. Isto aumenta o fluxo de compostos através da membrana, dissipando rapidamente os gradientes químico e elétrico. A nisina causa um colapso imediato no potencial de membrana ($\Delta\psi$) e também no gradiente de pH (ΔpH) da célula bacteriana (BRUNO & MONTVILLE, 1992; MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997).

A nisina é a única bacteriocina considerada pelo comitê de aditivos do Codex Alimentarius da FAO (Food and Agriculture Organization) como GRAS (Generally Recognised As Safe) e de uso liberado como aditivo alimentar para controle antimicrobiano desde 1969.

Na indústria de alimentos, a nisina pode ser adicionada a leite, queijos e laticínios, alimentos em conserva, maionese e alimentos infantis (MONTVILLE & WINKOWSKI, 1997).

No Brasil, a nisina é aprovada para uso em todos os tipos de queijos, a uma concentração máxima de $12,5 \times 10^3$ UI/kg. O Brasil é pioneiro na legalização do uso da nisina em produtos cárneos. A nisina pode ser pulverizada na superfície de salsichas, no final do processamento térmico a uma concentração de 200×10^3 UI/kg de Nisaplin (nisina comercial da Applin and Barret, UK) dissolvida em 0,01% de uma solução de ácido fosfórico grau alimentício (DE MARTINIS, ALVES & FRANCO, 2002).

Estudos recentes desenvolvidos com salsichas no Brasil demonstraram que esse procedimento não é efetivo no controle de *L. monocytogenes* e microrganismos deteriorantes, incluindo os psicrotróficos e bactérias lácticas (CASTRO, 2002).

A eficiência do emprego de nisina em carnes é limitada, devido a sua baixa solubilidade no pH da carne e pela sua ineficiência em reduzir populações de microrganismos deteriorantes e patogênicos associados às carnes. Além disso, a nisina pode ser inativada pela enzima glutathione S-transferase de carnes cruas, confirmando que o uso desta bacteriocina nesses alimentos pode ser limitado (DE MARTINIS, ALVES & FRANCO, 2002).

Segundo DE MARTINIS e cols. (1998), 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.

Vários estudos demonstraram que o uso combinado de nisina com outros fatores de conservação em alimentos, como atmosfera modificada, baixa temperatura, baixo pH e elevadas concentrações de NaCl, entre outros, pode ser eficiente no prolongamento da vida de prateleira e da segurança microbiológica de alimentos (ECKNER, 1992; POL e cols., 2001).

Além disso, diversos estudos sugerem que os efeitos da nisina podem ser potencializados pela associação com antimicrobianos naturais em baixas concentrações (ETTAYEB e cols., 2000; POL & SMID, 1999; PERIAGO & MOEZELAAR, 2001), entre eles, óleos essenciais extraídos de ervas e condimentos usados para dar sabor em alimentos industrializados. Os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana de

óleos essenciais são, principalmente, componentes fenólicos, como o timol [5 metil-2-(1-metiletil)fenol] e o carvacrol [2-metil-5-(1-metiletil)fenol], presentes nas folhas e flores do orégano (*Origanum vulgare* L.). O timol também pode ser extraído das folhas do tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Outros exemplos de componentes fenólicos são o aldeído cinâmico (3- fenil-2—propenal) encontrado na canela (*Cinnamomun zeylanicum* Nees.) e o eugenol [2-metoxi-4-(-propenil)-fenol] encontrado no cravo (*Syzigium aromaticum* L.) (DAVIDSON & NAIDU, 2000; ULTEE & SMID, 2000; KARATZAS *e cols.*, 2000).

Os compostos fenólicos são hidrofóbicos, e o seu sítio de ação é a membrana celular da célula microbiana. Esses compostos se acumulam na bicamada lipídica, causando um desarranjo na função e na estrutura da membrana (POL & SMID, 1999).

Estudos conduzidos por ELGAYAR *e cols.*, 2001, verificaram que o óleo essencial de orégano inibiu completamente a multiplicação de bactérias Gram negativas como *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* e *E. coli*. Outros microrganismos envolvidos neste estudo foram *Aspergillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes*, que também tiveram sua multiplicação inibida pelo óleo de orégano.

O carvacrol tem sido testado frente à diferentes microrganismos, como *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizobium leguminosarum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *B. subtilis*, *Vibrio vulnificus* e *Rhodobacter sphaeroides*. Todos os testes demonstraram que o carvacrol inibiu a multiplicação de todas essas cepas, apresentando assim atividade antifúngica e antibacteriana (ULTEE, GORRIS & SMID, 1998).

Os óleos essenciais de ervas e condimentos são classificados como GRAS (Generally Recognized as Safe), e são considerados uma barreira potencial e adicional na multiplicação de microrganismos patogênicos em alimentos prontos para consumo (HAO, BRACKETT & DOYLE, 1998).

MENON & GARG, 2001, avaliaram a atividade do óleo essencial de cravo em carnes e queijos, a 30°C e a 7°, e verificaram uma diminuição na multiplicação de *Listeria monocytogenes* em ambas as temperaturas. Esses resultados revelaram o potencial do óleo essencial de cravo como um conservador natural nesses alimentos.

Uma forte atividade anti-*Listeria* foi relatada por LIS-BALCHIN & DEANS, 1997, de óleos essenciais que continham na sua composição uma alta porcentagem de

monoterpenos, eugenol, cinamaldeído, timol, e em algumas vezes, citronelol, limoneno, e geraniol.

PALMER, STEWART & FYFE, 2001, concluíram que os óleos essenciais de louro, cravo, canela e tomilho são mais eficientes na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Enteritidis* em queijos magros do que em queijos com alto teor de gordura. Além da composição química do alimento, outros fatores também podem influenciar a atividade inibitória dos óleos essenciais, incluindo-se a temperatura de armazenamento e o pH (FUNG & YUSTE, 2004).

BAGAMBOULA *e cols.*, 2004, estudaram o efeito inibitório dos óleos essenciais de tomilho, manjerição, e de seus principais componentes fenólicos como o carvacrol, timol, estragol, linalol e *p*-cimeno sobre *Shigella sonnei* e *S.flexneri*, inoculadas em folhas de alface minimamente processadas, e concluíram que esses compostos têm um grande potencial como antimicrobianos naturais e que podem ser usados para descontaminação de vegetais minimamente processados. Porém, o uso desses óleos essenciais em alimentos é desencorajado pela sua alta volatilidade e conseqüente perda da atividade antimicrobiana e pelas alterações que podem provocar nas propriedades sensoriais do alimento, além do custo.

A extração de óleos essenciais de condimentos desidratados pode ser efetuada através da utilização de solventes, destilação, pressão a frio, além de outras técnicas avançadas de separação que conduzem ao isolamento de vários compostos fitofenólicos (DAVIDSON & NAIDU, 2000).

O óleo essencial de orégano pode conter de 60 a 70% de carvacrol, enquanto no óleo essencial de tomilho a concentração desse composto é de cerca de 45% (ULTEE, GORRIS & SMID, 1998). A concentração dos compostos fenólicos nos óleos essenciais de ervas e condimentos pode variar de forma significativa, dependendo da região geográfica de produção, da variedade e idade da planta e do método de secagem e de extração do óleo (BAGAMBOULA *e cols.*, 2004).

Apesar da atividade antimicrobiana de bacteriocinas como nisina e dos óleos essenciais de ervas e condimentos ser conhecida, poucos são os estudos verificando a ação combinada desses dois compostos antimicrobianos. Os resultados disponíveis não

são conclusivos em relação ao provável efeito sinérgico ou antagônico desses componentes.

YUSTE & FUNG, 2004, conduziram um estudo sobre a atividade antimicrobiana de nisina em combinação com canela em suco de maçã inoculado com *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* O157:H7 mantido em temperatura ambiente e em refrigeração. Os autores concluíram que vários fatores, como o pH baixo do suco de maçã e a temperatura de armazenamento, além dos antimicrobianos, influenciaram a redução da população desses microrganismos.

O sinérgismo entre nisina e carvacrol, quando empregados em doses baixas, na inibição da multiplicação de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, foi demonstrado por POL & SMID (1999). Segundo esses autores, esta combinação superava as limitações no uso da nisina decorrentes de sua baixa estabilidade em pH alto e de seu custo elevado, especialmente quando há a necessidade de se utilizar altas concentrações para se obter o efeito antimicrobiano esperado. Além disso, o uso desses compostos poderia ser ampliado, já que concentrações mais baixas seriam suficientes para causar um efeito inibitório.

ETTAYEB, YAMANI & HASSANI, 2000, também conduziram um estudo demonstrando que o efeito da nisina Z sobre *L. monocytogenes* pode ser potencializado pelo óleo essencial de tomilho, usado em baixas concentrações.

Sabe-se que o modo de ação das bacteriocinas está relacionado à permeabilização de membranas de células sensíveis, enquanto que os componentes fenólicos, por serem hidrofóbicos, acumulam-se na dupla camada lipídica da membrana citoplasmática, causando danos e colapso de sua integridade, permitindo assim, o efluxo de componentes intracelulares vitais (HELANDER *e cols.*, 1998; PERIAGO & MOEZELAAR., 2001). Entretanto, o mecanismo de ação do efeito sinérgico das bacteriocinas e dos componentes fenólicos ainda não é conhecido (POL & SMID, 1999).

Dado o limitado número de informações a respeito de uma possível potencialização da ação inibitória da nisina quando usada em combinação com outros componentes antimicrobianos, objetivou-se neste estudo avaliar o comportamento de uma cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de alimentos frente à nisina e óleo essencial de orégano, quando usados isoladamente e em combinação. Uma potencialização da ação da nisina pelo óleo essencial de orégano, ou vice e versa, possibilitaria a diminuição da concentração necessária desses compostos em um alimento no qual se objetivasse o controle da multiplicação desse patógeno

2. OBJETIVO

- Avaliar o efeito de nisina A e de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) isoladamente e em combinação, na multiplicação de uma cepa de *Listeria monocytogenes* isolada de lingüiça frescal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultura e Soluções

Os meios de cultura e soluções utilizados neste estudo foram:

a) TSBYE : Caldo soja triptona (TSB- CM129, Oxoid), acrescido de 0,6% de extrato de levedura (YE – L21, Oxoid).

b) TSAYE : Ágar soja triptona (TSA – CM131, Oxoid), acrescido de 0,6% de extrato de levedura (YE – L21, Oxoid).

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos, e mantidos em geladeira a 8°C. Para uso, o meio TSAYE foi fundido em forno de microondas e mantido em banho maria (Julabo®) a 48°C até o momento de ser utilizado.

c) Água peptonada 0,1%:

A água peptonada 0,1% foi preparada utilizando-se 1 g de peptona bacteriológica (L37, Oxoid) dissolvida em 1000 ml de água destilada. Essa solução foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos, e mantida em geladeira a 8°C.

d) Solução Tampão Fosfato de Sódio pH 6,0:

A solução tampão fosfato de sódio com pH 6,0 foi preparada misturando-se 44 ml de uma solução de NaH_2PO_4 0,2 M e 6 ml de uma solução de Na_2HPO_4 0,2 M, completando-se o volume para 100 ml com água destilada.

Para a obtenção de uma solução de NaH_2PO_4 0,2M, dissolveu-se 1,2g de NaH_2PO_4 em 44 ml de água destilada. Para a obtenção de uma solução de Na_2HPO_4 0,2M, dissolveu-se 0,18g de Na_2HPO_4 em 6 ml de água destilada (GERHARTT, MURRAY, WOOD & KRIEG, 1994).

O pH da solução foi ajustado para 6,0 com NaOH 1N ou HCl 1N, conforme a necessidade. Para leitura do pH utilizou-se um potenciômetro (Digimed®). A solução tampão foi esterilizada em autoclave a 121°C por 15 minutos e mantida em refrigeração a 8°C.

3.2 Cultura Microbiana

A cepa utilizada neste estudo foi *Listeria monocytogenes*, isolada de lingüiça fresca no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, mantida em freezer a -70°C.

Para reativação, a cepa foi transferida para um tubo contendo caldo TSBYE, que foi incubado a 37°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se uma alíquota dessa cultura para novos tubos contendo ágar TSAYE, que foram incubados a 37°C por 24 horas.

Essas culturas foram colocadas em geladeira e mantidas em refrigeração a 8°C até o momento do uso.

A pureza da cultura de *L. monocytogenes* foi confirmada através da semeadura em placas com TSAYE, incubadas a 37°C por 24 horas, verificando-se a coloração azul esverdeada típica das colônias de *L. monocytogenes* quando observadas através de iluminação transmitida (DONNELLY, 1999)

Uma colônia de *Listeria monocytogenes* foi transferida para 10 ml de caldo TSBYE, incubando-se a 30°C por 18 horas. Essa cultura foi submetida à diluições decimais seriadas em tubos contendo água peptonada a 0,1%. Um ml de cada uma das diluições foi semeado em profundidade em placas de Petri à qual se adicionou aproximadamente 14 ml de TSAYE. Após a incubação a 30°C por 24 horas, determinou-se o número de UFC/ml da cultura utilizada.

3.3 Antimicrobianos Naturais

3.3.1 Nisina

Utilizou-se o produto Nisaplin® (10⁶ UI de nisina/g) fornecido por Danisco Brasil Ltda. Primeiramente preparou-se uma solução “mãe” contendo 10⁴ UI nisina/ ml, dissolvendo-se 1g de Nisaplin® em 100 ml de HCl 0,02 N (ZHANG e MUSTAPHA, 1999). Essa solução foi dividida em alíquotas de 1 ml em tubos Eppendorf que foram mantidos em freezer à -20°C.

Após o descongelamento da alíquota em temperatura ambiente, adicionou-se 1 ml de solução tampão fosfato pH 6,0 originando uma solução com 5 x 10³ UI nisina / ml.

3.3.2 Óleo essencial de orégano

Empregou-se o óleo essencial de orégano da Frutarom Fine Ingredients Division, Inglaterra.

Preparou-se uma solução concentrada contendo 10% de óleo essencial de orégano, empregando-se etanol 95% como diluente (REMMAL, et al, 1993).

Figura 1 : Procedimentos adotados para a avaliação do efeito do óleo essencial de orégano e nisina sobre *L. monocytogenes*, isolados ou em combinação.

3.4 Avaliação da ação dos antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* (Figura 1)

3.4.1 Avaliação da ação individual da nisina sobre *Listeria monocytogenes*

O efeito da nisina sobre *L. monocytogenes* foi avaliado através de curvas de crescimento feitas em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 ®) ajustado a um comprimento de onda de 600 nanômetros. À erlenmeyers contendo 50 ml de TSBYE e 50UI/ml, 25 UI/ml, 10UI/ml ou 5UI/ml de nisina, adicionou-se 50 µl de uma cultura de *L. monocytogenes* contendo 10^9 UFC/ml. Esses erlenmeyers foram incubados a 30°C em agitação a 150 rpm por um período de até 8 horas. De 2 em 2 horas, uma alíquota de 1,5 ml de cada erlenmeyer foi retirada e colocada na cubeta do espectrofotômetro para a leitura da densidade ótica. Simultaneamente retirou-se uma alíquota de 1 ml do mesmo erlenmeyer, que foi adicionada a um tubo contendo 9 ml de água peptonada 0,1%, e a partir desse tubo foram realizadas diluições decimais seriadas. De cada diluição transferiu-se 1 ml para placas as quais se adicionou 15 ml de TSAYE, empregando-se duplicatas. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 30°C, e a contagem das colônias foi realizada após 24 horas. Para determinação do número de UFC/ml, selecionou-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, calculando-se a média das duplicatas.

Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética das três repetições.

3.4.2 Avaliação da ação individual do óleo essencial de orégano sobre *Listeria monocytogenes* (Figura 1)

O efeito do óleo essencial de orégano sobre *L. monocytogenes* foi avaliado através de curvas de crescimento realizadas em espectrofotômetro (Ultraspec 2000 ®) ajustado a um comprimento de onda de 600 nanômetros. Utilizou-se erlenmeyers com 50 ml de TSBYE contendo, 1%; 0,5%; 0,25%; 0,1%; 0,05%; 0,02% ou 0,01% de óleo essencial de orégano, acrescidos de 50 µl de uma cultura de *Listeria monocytogenes* contendo 10^9

UFC/ml. Esses erlenmeyers foram incubados a 30°C em agitação a 150 rpm, por um período de até 8 horas. De 2 em 2 horas, uma alíquota de 1,5 ml foi retirada de cada erlenmeyer e colocada na cubeta do espectrofotômetro para a leitura da densidade ótica. Simultaneamente retirou-se uma alíquota de 1 ml do mesmo erlenmeyer, que foi adicionada a um tubo contendo 9 ml de água peptonada 0,1%, e a partir deste tubo foram realizadas diluições decimais seriadas. De cada diluição transferiu-se 1 ml para duas placas às quais se adicionou 15 ml de TSAYE. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 30°C e a contagem das colônias foi realizada após 24 horas. Para determinação do número de UFC/ml, selecionou-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, calculando-se a média das duplicatas.

Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética das três repetições.

3.4.3 Avaliação da ação da nisina em combinação com o óleo essencial de orégano sobre *L. monocytogenes* (Figura 1)

De uma placa de TSAYE contendo a cultura de *L. monocytogenes*, transferiu-se uma colônia para um tubo com 10 ml de caldo TSBYE, que foi incubado a 30°C por 18 horas. Alíquotas de 50 µl dessa cultura foram transferidas para quatro erlenmeyers contendo 50 ml de TSBYE e os seguintes componentes*:

Experimento A:

erlenmeyer 1: nenhum

erlenmeyer 2: nisina 5 UI/ml

erlenmeyer 3: óleo essencial de orégano a 0,01%

erlenmeyer 4: nisina 5 UI/ml + óleo essencial de orégano a 0,01%

*As concentrações dos componentes foram selecionadas em função dos resultados obtidos nos experimentos descritos nos itens 3.4.1 e 3.4.2.

Experimento B:

erlenmeyer 1: nenhum

erlenmeyer 2: nisina 5 UI/ml

erlenmeyer 3: óleo essencial de orégano a 0,02%

erlenmeyer 4: nisina 5 UI/ml + óleo essencial de orégano a 0,02%

Experimento C:

erlenmeyer 1: nenhum

erlenmeyer 2: nisina 10 UI/ml

erlenmeyer 3: óleo essencial de orégano a 0,01%

erlenmeyer 4: nisina 10 UI/ml + óleo essencial de orégano a 0,01%

Experimento D:

erlenmeyer 1: nenhum

erlenmeyer 2: nisina 10 UI/ml

erlenmeyer 3: óleo essencial de orégano a 0,02%

erlenmeyer 4: nisina 10 UI/ml + óleo essencial de orégano a 0,02%

Os erlenmeyers foram incubados a 30°C em agitação a 150 rpm por um período de até 8 horas. A cada duas horas, alíquotas de 1,5 ml foram retiradas de cada erlenmeyer, e transferidas para as cubetas do espectrofotômetro (Ultraspec 2000 ®) ajustado a 600 nanômetros, para a leitura da densidade ótica. Simultaneamente retirou-se uma alíquota de 1 ml do mesmo erlenmeyer, que foi adicionada a um tubo contendo 9 ml de água peptonada a 0,1%, e a partir deste tubo foram realizadas diluições decimais seriadas. De cada diluição transferiu-se 1 ml para duas placas as quais se adicionou 15 ml de TSAYE. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a 30°C e a leitura foi realizada após um período de 24 horas. Para determinação do número de UFC/ml, selecionou-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, calculando-se a média das duplicatas.

Todos os experimentos foram realizados em três repetições independentes. Os resultados apresentados correspondem à média aritmética das três repetições.

3.5 Interpretação dos resultados

Calculou-se as médias das contagens de *L. monocytogenes* obtidas nas triplicatas de cada experimento. Com os resultados transformados em log, efetuou-se uma análise de variância de um fator (ANOVA), considerando-se 5% de probabilidade.

A significância das diferenças nos resultados de contagem de *L. monocytogenes* nas diferentes condições experimentais foi avaliada através do teste de médias de Duncan, adotando-se 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o SAS (Statistical Analysis System), versão 8.

Para avaliar comparativamente o efeito das diferentes combinações de óleo essencial de orégano e nisina após 2h, 4h, 6h e 8h de atividade, determinou-se as taxas de inativação em relação à contagem no tempo zero, calculando-se $\log (N_2/N_0)$, $\log (N_4/N_0)$, $\log (N_6/N_0)$ e $\log (N_8/N_0)$, respectivamente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes realizados com o óleo essencial de orégano a 1,0%, 0,5%, 0,25%, 0,1% e 0,05% , isoladamente e em combinação com 50 UI/ml e 25 UI/ml de nisina, não foi possível efetuar contagens de *L. monocytogenes*, pois estas concentrações apresentaram efeito listericida.

Os resultados obtidos relativos às concentrações de 0,01% e 0,02% de óleo essencial de orégano e 5 UI/ml e 10 UI/ml de nisina, estão apresentados nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 e Figura 2.

Tabela 1: Efeito do óleo essencial de orégano e de nisina, isoladamente e combinados, sobre uma cultura de *L. monocytogenes* contendo 10⁶ UFC/ml.

	<i>Tempo de contato</i>				
	<i>0h</i>	<i>2h</i>	<i>4h</i>	<i>6h</i>	<i>8h</i>
<i>L. monocytogenes</i>	6,76*	7,09	7,85	8,76	9,50
<i>L. monocytogenes</i> + OEO** 0,01%	6,70	7,01	7,67	8,32	9,30
<i>L. monocytogenes</i> + OEO 0,02%	6,65	6,57	6,67	6,97	7,55
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml	6,43	6,05	6,77	8,28	9,44
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml	6,92	5,61	6,32	8,12	9,43
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml + OEO 0,01%	6,34	5,68	6,18	8,47	9,48
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml + OEO 0,01%	6,46	5,77	5,43	5,95	6,63
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml + OEO 0,02%	6,32	4,13	4,40	4,30	4,91
<i>L. monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml + OEO 0,02%	7,07	3,84	3,82	3,66	3,38

* Média aritmética de três repetições genuínas, resultados em log UFC/ml

** OEO

tabela 2. Resultados dos testes de médias de Duncan aplicados às contagens de *L. monocytogenes* em TSBYE contendo nisina e óleo essencial de égano em diferentes concentrações, após incubação a 30 °C por 2, 4, 6 e 8 horas.

Diferença de contagem em relação ao tempo zero						
	$\text{Log} (N_2/N_0)^*$	Grupo de Duncan	$\text{Log} (N_4/N_0)$	Grupo de Duncan	$\text{Log} (N_6/N_0)$	Grupo de Duncan
<i>monocytogenes</i>	0,33**	A	1,09	A	2,00	A
<i>monocytogenes</i> + OEO 0,01%	0,31	A	0,97	AB	1,62	AB
<i>monocytogenes</i> + OEO 0,02%	-0,08	AB	0,02	C	0,32	C
<i>monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml	-0,38	B	0,34	BC	1,85	AB
<i>monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml	-1,31	C	-0,60	D	1,20	B
<i>monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml + OEO 0,01%	-0,66	B	-0,16	ABC	2,13	AB
<i>monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml + OEO 0,01%	-0,69	BC	-1,03	D	-0,51	D
<i>monocytogenes</i> + nisina 5 UI/ml + OEO 0,02%	-2,19	D	-1,92	E	-2,02	E
<i>monocytogenes</i> + nisina 10 UI/ml + OEO 0,02%	-3,23	E	-3,25	F	-3,41	F

Média aritmética de três repetições genuínas, resultados em log UFC/ml

* OEO : óleo essencial de orégano

** letras iguais na mesma coluna indicam ausência de significância na diferença das contagens de *L. monocytogenes* ($p < 0,05$)

Tabela 3. Resultados dos testes de médias de Duncan aplicados às contagens de *L. monocytogenes* em TSBYE contendo 0,02% de óleo essencial de orégano e 5 ou 10 UI/ml de nisina, após incubação a 30°C por 2, 4, 6 e 8 horas.

<i>Tempo*</i>	<i>Nisina 5 UI/ml + OEO 0,02%</i>	<i>Grupo de Duncan</i>	<i>Nisina 10 UI/ml + OEO 0,02%</i>	<i>Grupo de Duncan</i>
2h	-2,19	b**	-3,23	a
4h	-1,92	b	-3,25	a
6h	-2,02	b	-3,41	a
8h	-1,41	b	- 3,69	a

** Letras iguais, na mesma linha indicam que os resultados não tem diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

* Não houve diferença estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para as colunas.

Figura 2. Taxa de inativação de *L. monocytogenes* causados por óleo essencial de orégano e nisina, isoladamente e em diferentes combinações.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, é possível verificar que o óleo essencial de orégano, empregado isoladamente, nas concentrações de 0,01% e 0,02% não apresentou atividade inibitória sobre *L. monocytogenes* em caldo TSBYE. Apenas após 2h de contato, houve uma ligeira diminuição na contagem de *L. monocytogenes* quando foi utilizado óleo essencial de orégano a 0,02%, porém essa diminuição não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, a nisina, utilizada isoladamente, nas concentrações de 5 UI/ml e 10 UI/ml, apresentou alguma atividade antimicrobiana nas duas primeiras horas de contato com o microrganismo, apresentando uma redução na contagem de 0,38 e 1,31 log, respectivamente. Quando se utilizou nisina a 10 UI/ml, a atividade inibitória prolongou-se até 4h, causando uma redução de 0,60 log na contagem. Após 4h de contato, o efeito inibitório desapareceu e a cultura de *L. monocytogenes* voltou a se multiplicar.

Após 4h de atividade, observou-se que o óleo essencial de orégano a 0,01%, usado em combinação com a nisina a 5 UI/ml, apresentou resultados que não foram estatisticamente diferentes daqueles obtidos com o controle, indicando que essa combinação, nessas concentrações, não tem atividade inibitória sobre *L. monocytogenes*.

Entretanto, ao se associar o óleo essencial de orégano a 0,02% com nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml, obteve-se resultados estatisticamente diferentes daqueles obtidos sem o uso de nisina, ou com a nisina isoladamente nas duas concentrações. Verifica-se que após 4h, houve uma redução de 1,92 ciclos log na contagem de *L. monocytogenes* quando o óleo essencial de orégano a 0,02% foi combinado com a nisina a 5 UI/ml, e de 3,25 ciclos log quando combinado com nisina 10 UI/ml.

No tempo de 6h, os resultados obtidos com a nisina 5 UI/ml, isoladamente e combinada com o óleo essencial de orégano a 0,01%, continuaram a não apresentar diferenças estatisticamente significativas. Porém, a utilização da nisina a 10 UI/ml em combinação com o óleo essencial de orégano a 0,01%, causou uma pequena redução de 0,51 log, e após 6h esse efeito inibitório desapareceu.

Por outro lado, a associação da nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml com o óleo essencial de orégano a 0,02% causou uma redução na contagem de *L. monocytogenes* de 2,02 ciclos log e 3,41 ciclos log, respectivamente.

No tempo de 8h, a nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml, isoladamente ou em combinação com óleo essencial de orégano a 0,01%, não apresentou efeito inibitório sobre *L. monocytogenes*, pois os resultados obtidos com essas concentrações não foram estatisticamente diferentes do controle. Nesse tempo, os resultados obtidos com a nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml combinadas com o óleo essencial de orégano a 0,02%, apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação aos resultados obtidos no controle, com reduções na contagem de 1,41 ciclos log e 3,69 ciclos log, respectivamente.

A ação isolada e combinada desses antimicrobianos sobre *L. monocytogenes* foi também estudada por outros autores.

ETTAYEB *e cols.*, 2000 avaliaram várias concentrações de nisina Z e seu efeito sobre *L. monocytogenes* em meio TSB. Observaram que houve uma pequena redução na multiplicação de *L. monocytogenes* com a adição de 10 e 25 UI/ml de nisina Z, enquanto que a adição de 40 UI e 75 UI/ml de nisina Z produziu uma redução significativa na densidade ótica ($< 0,25$). Uma redução similar na densidade ótica ocorreu com o uso de 100 UI/ml de nisina Z. Nesse estudo, os autores mostraram que a combinação de timol a 0,02% com 40 UI/ml de nisina Z resultou em uma grande redução da multiplicação de *L. monocytogenes*, apresentando valores de densidade ótica abaixo de 0,02, após 11 horas e 19 horas de incubação.

Esses mesmos autores avaliaram o efeito combinado da nisina Z com timol, e concluíram que baixas concentrações de timol podem ser utilizadas em combinação com a nisina produzindo um efeito listericida. Observaram que uma completa inibição da multiplicação da bactéria, pela combinação de concentrações sub-inibitórias de timol e nisina Z, pode ser explicada pela desestabilização que o timol provoca na estrutura da membrana celular, resultando em um aumento da sua permeabilidade para a nisina.

PERIAGO & MOEZELAAR, 2001, também demonstraram que a concentração utilizada de carvacrol tem um papel importante no efeito bactericida da nisina quando combinados, pois há um sinergismo entre esses compostos.

POL & SMID, 1999, avaliaram a ação da combinação da nisina e carvacrol sobre *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* em meio BHI, e concluíram que com baixas concentrações dos antimicrobianos a fase lag da bactéria aumenta, e com altas concentrações dos antimicrobianos há uma inibição total da multiplicação do microrganismo.

No presente estudo, através da metodologia utilizada, altas concentrações de nisina e do óleo essencial de orégano, também tiveram um efeito listericida, porém, baixas concentrações desses antimicrobianos não aumentaram a fase lag da multiplicação de *L. monocytogenes*.

POL & SMID, 1999, verificaram também que baixas temperaturas não influenciaram na sensibilidade de *L. monocytogenes* à nisina. A 20°C, houve uma inibição total da multiplicação de *L. monocytogenes*, com baixas concentrações de nisina. Nesse estudo, os autores observaram um efeito sinérgico muito claro com a combinação de carvacrol e nisina, com uma redução de 3 log UFC/ml de *L. monocytogenes*.

PERIAGO & MOEZELAAR, 2001, avaliaram o efeito de diferentes valores de pH na ação da nisina, e observaram que a nisina foi mais ativa contra *B. cereus* em pH inferior a 7,0. (entre 6,30 e 5,75). Em relação à temperatura, observou-se que a 30°C a nisina foi mais eficiente sobre *B. cereus* do que a 8°C. No entanto, ocorreu sinérgismo entre o carvacrol e a nisina em ambas as temperaturas.

SMITH-PALMER e cols. 1998, demonstraram que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de louro, cravo, canela, tomilho e noz moscada em *L. monocytogenes* foi maior a 35°C do que a 4°C.

No presente estudo, o emprego da nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml em combinação com o óleo essencial de orégano a 0,02% demonstrou ser muito eficiente na inibição de *L. monocytogenes*, produzindo reduções de mais de 3,0 ciclos log.

Esses antimicrobianos, nas concentrações e combinações citadas acima, poderiam ser utilizados como conservadores em alimentos, a fim de diminuir e controlar a carga microbiana do alimento, porém mais estudos deveriam ser realizados na matriz alimentar, pois a eficiência dos antimicrobianos pode variar de acordo com as características intrínsecas de cada alimento.

Além disso, outras formas de controle do desenvolvimento microbiano no alimento poderiam ser acrescentados, como um obstáculo adicional, porém de maneira menos intensa, visando prevenir, retardar ou diminuir a carga microbiana no alimento, garantindo assim a sua qualidade microbiológica.

5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos concluir que:

1. A nisina nas concentrações de 5 UI/ml e 10 UI/ml, empregada isoladamente, apresentou atividade inibitória sobre *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE, mas essa ação desapareceu após 4h de contato, quando a bactéria retomou sua multiplicação.
2. O óleo essencial de orégano nas concentrações de 0,01% e 0,02%, empregado isoladamente, não apresentou efeito inibitório sobre *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE.
3. O uso combinado de óleo essencial de orégano a 0,01% e de nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml não modificou significativamente a ação inibitória da nisina sobre *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE.
4. O uso combinado de óleo essencial de orégano a 0,02% e de nisina a 5 UI/ml ou 10 UI/ml foi eficiente para reduzir a velocidade de multiplicação de *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE, observando-se um efeito sinérgico.
5. O efeito do uso combinado do óleo essencial de orégano e de nisina sobre *Listeria monocytogenes* em caldo TSBYE é dependente da concentração de cada um desses componentes. Em concentrações adequadas, é possível obter um efeito sinérgico.
6. O uso combinado desses dois antimicrobianos naturais apresenta um bom potencial de utilização em alimentos, podendo ser uma ferramenta adicional no controle de *Listeria monocytogenes*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com a NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI), 2004.

ABEE, T.; ROMBOUTS, 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.60, n.6, p.1962-1968, 1994.

ABEE, T.; KROCKEL, L.; HILL, C.; Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.28, p.169-185, 1995.

ARAGON, L.C.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B.D.G.M.; DESTRO, M.T. Detection of *Listeria* sp in meat and meat product using TECRA® LISTERIA VIA and BioControl VIP® for *Listeria* immunoassays and a cultural procedure. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Resumos**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003. res.MAL 022.

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

BRACKETT, R.E. Presence and resistance of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technol.**, Chicago, v.42, n.4, p.162-164, 178, 1988.

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

CASTRO, A.P. **Sobrevivência de bactérias aeróbias mesófilas, psicrotróficas e bactérias lácticas e *Listeria monocytogenes* em salsichas submetidas a tratamento com nisina.** São Paulo, 2002. 91p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. **MMWR Morb. Mortab. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.49, n.50, p.1129-1130, 2000. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm4950a1.htm>. Acesso em: 12 dez. 2000.

CENTER FOR DISEASE CONTROL. Public health dispatch: outbreak of Listerosis — Northeastern United States, 2002. **MMWR Morb. Mortab. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.51, n.42, p.950-951, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm>. Acesso em: 25 dez. 2002.

CHEN, Y.; MONTVILLE, T.J.; Efflux of ions and ATP depletion induced by pediocin PA-1 Are concomitant with cell death in *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.79, p.684-690, 1995.

- CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T.J.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.71, n.1, p.1-20, 2001. [Review].
- DAVIDSON, P.M.; NAIDU, A.S. Phyto-Phenols. In: NAIDU, A.S., eds. **Natural Food Antimicrobial Systems**. California: CRC Press, 2000. pg. 265-294.
- DE MARTINIS, E.C.P.; FRANCO, B.D.G.M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.42, p.119-126, 1998.
- DE 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 meats products. **Food Rev. Int.**, Philadelphia, v.18, n.2/3, p.191-208, 2002.
- DONNELLY, C.W. *Listeria monocytogenes* in the Natural Environment. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. p.1-20. (Food Science and Technology, 92).
- DONNELLY, C.W. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. p.225-261. (Food Science and Technology, 92).
- DOYLE, M.P. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technol.**, Chicago, v.42, n.4, p.169-171, 1998.

- ECKNER, K.F. Bacteriocins and food applications. **Dairy, Food Environ. Sanit.**, Ames, v.12, n.4, p.204-209, 1992.
- ELGAYYAR, M.; DRAUGHON, F.A.; GOLDEN, D.A.; MOUNT, J.R. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.7, p.1019-1024, 2001.
- ETTAYEBI, K.; YAMANI, J.E.; ROSSI-HASSANI, B.D. Synergistic effects of nisin and thymol on antimicrobial activities in *Listeria monocytogenes* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v.183, n.1, p.191-195, 2000.
- FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in meat products. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H, eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. p.505-564. (Food Science and Technology, 92).
- FENLON, D.R. *Listeria monocytogenes* in the natural environmental. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. p.21-39. (Food Science and Technology, 92).
- FIGUEIREDO, E. A. T. Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em linha de processamento de leite pasteurizado tipo "C". Tese apresentada à **Universidade de São Paulo - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**. São Paulo, 2000. 100p.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Triunfo import food corp. recalls queijo tipo mineiro cheese – United States. Disponível em: <http://fda.gov/oc/po/firmrecalls/triunfo1003.html>. Acesso em: 29 out. 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; DE MARTINIS, E.C.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in a pork product by a *Lactobacillus sake* strain. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.42, p.119-126, 1998.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R., eds. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: ASM, 1994. p.140.

GOULD, G.W. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **J. Food Prot.**, Des Moines, suppl., p.82-86, 1996.

HAO, Y.Y.; BRACKETT, R.E.; DOYLE, M.P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* by plant extracts in refrigerated cooked beef. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.61, n.3, p.307-312, 1998.

HARPAZ, S.; GLATMAN, L.; DRABKIN, V.; GELMAN, A.; Effects of herbal essential oils used to extend the shelf life of freshwater-reared asian sea bass fish (*Lates calcarifer*). **J. Food Prot.**, Des Moines, v.66, n.3, p.410-417, 2003.

HARRIS, L.J.; DAESCHEL, M.A.; STILES, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.52, n.6, p.384-387, 1989.

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram negative bacteria. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.8, n.5, p.146-150, 1997.

HOLT, J.G.; BERGEY, D.H.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; WILLIAMS, S.T., eds. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994. 787p.

HOF, H. History and epidemiology of listeriosis. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.35, p.199-202, 2003.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microrganisms in foods 5**: microbiological specifications of food pathogens. London: Blakel Academic & Professional, 1996. 513p.

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

- KARATZAS, A.K.; KETS, E.P.W.; SMID, E.J.; BENNIK, M.H.J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.90, p.463-469, 2001.
- LAUKOVÁ, A. *In vitro* treatment of different isolates from cattle dung and pig slurry by nisin. **Acta Vet. Brno**, Brno, v.69, p.147-151, 2000.
- LIMA, A.T.F.; ROSSONI, 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, 2003a.
- LIMA, A.T.F.; ROSSONI, E.M.M.; POMPERMAYER, D.M.C. Incidência das diferentes espécies de *Listeria* em produtos cárneos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22, Florianópolis, 2003. **Resumos**. Florianópolis: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2003.
- LIS-BALCHIN, M.; DEANS, S.G. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.82, p.759-762, 1997.
- MENON, K.V.; GARG, S.R. Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. **Food Microbiol.**, Sidcup, v.18, p.647-650, 2001.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKY, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbiology**: fundamentals and frontiers. Washington: ASM Press, 1997. cap.30, p.566-567.

MOTT, S.J.; HUDSON, J.A. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on cold-smoked salmon under refrigeration and mild temperature abuse. **Food Microbiol.**, Sidcup, v.10, p.61-68, 1993.

PALMER, A.S.; STEWART, J.; FYFE, L. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food Microbiol.**, Sidcup, v.18, p.463-470, 2001.

PERIAGO, P.M.; MOEZELAAR, R. Combined effect of nisin and carvacrol at different pH and temperature levels on the viability of different strains of *Bacillus cereus*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.68, n.1/2, p.141-148, 2001.

POL, I.E.; SMID, E.J. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.29, p.166-170, 1999.

POL, I.E.; MASTWIJK, H.C.; SLUMP, R.A.; POPA, M.E.; SMID, E.J. Influence of food matrix on inactivation of *Bacillus cereus* by combinations of nisin, pulsed electric field treatment, and carvacrol. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.64, n.7, p.1012-1028, 2001.

REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T.; TANTAOU-ELARAKI, A.; ETTAYEB, M. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. **J. Pharm. Belg.**, Bruxelles, v.48, n.5, p.352-356, 1993.

REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T.; RHAYOUR, K.; ETTAYEBI, M.; TANTAOU-ELARAKI, A. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. **J. Essent. Oil Res.**, Carol Stream, v.5, n.2, p.179-184, 1993.

ROSA, C.M. **Caracterização e purificação de uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus sake* 2a isolado de lingüiça frescal.** São Paulo, 2001. 98p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

ROCOURT, J. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T., MARTH, E.H., **Listeria, listeriosis and food safety**. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. p.1-21. (Food Science and Technology, 92).

SCHLECH, W.F.; LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C.; HALDANE, E.V.; WORT, A.J.; HIGHTOWER, A.W.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **N. Engl. J. Med.**, Waltham, v.308, n.4, p.203-208, 1983.

SILVA, J.V.; HOFFMANN, F.L.; CARNICEL, F.A; PERESI, J.T.M.; GONÇALVES, T.M.V. Ocorrência de *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* em queijo tipo “Minas Frescal”. **Simpósio Internacional de Segurança Microbiológica dos Alimentos**. 30 e 31 de outubro de 2002.(abrappa)

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H., eds. ***Listeria, listeriosis and food safety***. 2.ed. New York: Marcell Dekker, 1999. cap.3, p.75-95. (Food Science and Technology, 92).

SOUZA, E.L.; LIMA, E.O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Hig. Aliment.**, São Paulo, v.17, n.113, p.38-42, 2003.

TOMPKIN, R.B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food- processing environment. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.65, n.4, p.709-725, 2002.

ULTEE, A.; GORRIS, L.G.M.; SMID, E.J. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.85, p.211-218, 1998.

ULTEE, A.; SLUMP R.A.; STEGING, G.; SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.63, p.620-624, 2000.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.64, p.373-378, 2001.

VON LAER, A.E. **Mapeamento da contaminação por *Listeria monocytogenes* em uma planta de processamento de lingüiça mista frescal através de sorologia e de PFGE.** Pelotas, 2004. 79p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Agronomia - Universidade Federal de Pelotas.

YUSTE, J.; FUNG, D.Y.C. Inactivation of *Salmonella* thyphimurium and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.67, n.2, p.371-377, 2004.

ZHANG, S.; MUSTAPHA, A. Reduction of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 numbers on vacuum-packaged fresh beef treated with nisin or combined with EDTA. **J. Food Prot.**, Des Moines, v.62, n.10, p.1123-1127, 1999.