

MODELAGEM DO CRESCIMENTO DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* EM MAIONESE ADICIONADA DE ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

WEBER DA SILVA ROBAZZA^{1*}, MARINA VOLPATO DACOREGGIO¹, ALESSANDRO
CAZONATTO GALVÃO¹, LIZIANE SCHITTLER¹

RESUMO

A *Salmonella Enteritidis* é um micro-organismo patogênico que está associado a surtos de salmonelose acarretados por produtos à base de ovos. Uma alternativa para a inibição do crescimento da *Salmonella* envolve o uso de óleos essenciais. Estas substâncias são constituídas por compostos fenólicos que atuam na membrana da célula microbiana interferindo em seu funcionamento. Neste contexto, a adição do óleo de orégano em alimentos pode ter um efeito benéfico do ponto de vista do crescimento da *Salmonella*. Neste trabalho avaliou-se o crescimento da *Salmonella Enteritidis* em maionese industrial do tipo caseira em pH 5 a três temperaturas diferentes, para posterior avaliação da atividade do óleo essencial de orégano e sua influência sobre os parâmetros cinéticos de crescimento da bactéria. Para este fim, o método utilizado para enumeração das células microbianas foi a contagem padrão em placas. Os resultados obtidos indicam que o óleo é mais eficiente para temperaturas mais elevadas e que a ação bactericida é mais eficiente para concentrações maiores do óleo essencial. Estudos adicionais são necessários para que se obtenham modelos matemáticos secundários que permitam a estimativa de parâmetros cinéticos em função da concentração de óleo essencial de orégano.

PALAVRAS-CHAVES: SEGURANÇA ALIMENTAR. BACTÉRIAS PATOGÊNICAS. MODELOS MATEMÁTICOS.

MODELING THE GROWTH OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* IN MAYONNAISE ADDED WITH OREGANO ESSENTIAL OIL

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis is a pathogenic microorganism associated to outbreaks of salmonellosis caused by foods composed by eggs. A useful option to inhibit the growth of *Salmonella* consists in the use of essential oils. These oils are composed by phenolic compounds that act in the membrane of the microbial cell preventing its complete development. Thus, the addition of oregano essential oil in food products can be a valuable tool to prevent microbial growth. In this study, it was evaluated the growth of *Salmonella Enteritidis* in home-made mayonnaise at pH 5 and three different temperatures added with oregano essential oil in order to estimate the influence of the oil on the kinetic parameters of growth of this bacteria. The method adopted for enumerating microbial cells was the plate counting. Results obtained for the mortality rate seem to indicate that the bactericide effect of the oil is stronger at higher temperatures and for oil more concentrated. Further studies are necessary in order to obtain secondary mathematical models to estimate kinetic parameters as a function of the concentration of oregano essential oil.

¹Departamento de Engenharia de Alimentos/Centro de Educação Superior do Oeste, Universidade do Estado de Santa Catarina; *e-mail: wrobazzi@yahoo.com.br

KEYWORDS: Food Safety. Pathogenic Bacteria. Mathematical Models.

1. INTRODUÇÃO

Desde o final da década de 1980, a indústria e o setor público começaram a dar atenção à produção de produtos alimentícios como uma questão de saúde pública. Em estudos independentes realizados no início da década de 1990, os custos provenientes de contaminações alimentares no Canadá e nos Estados Unidos foram estimados como sendo cerca de 1,3 bilhão de dólares [19] e 5 bilhões de dólares [6] por ano, respectivamente. Recentemente, foi estimado que os gastos com contaminações alimentares nos Estados Unidos no ano de 2010 foram de 13 bilhões de dólares, sendo 1,1 bilhão desse total dispendidos com contaminação de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos embutidos [4]. É claro que o Brasil, dadas as suas dimensões e o seu poderio econômico, também sofre com casos de intoxicação alimentar. Entretanto, não existem estudos ou pesquisas que revelem de forma sistemática a frequência de ocorrência desses eventos no país.

A microbiologia preditiva é uma ferramenta útil para o estudo do crescimento de populações de micro-organismos e da produção de toxinas em alimentos quando sujeitos a diferentes ambientes. Ela é baseada na premissa de que é possível estimar, através do uso de modelos matemáticos gerados através de estudos quantitativos dos micro-organismos, o crescimento destes nos alimentos [10]. Como a tecnologia empregada nos diagnósticos de casos de intoxicações alimentares tem evoluído, e problemas relacionados a micro-organismos tem se tornado cada vez mais comuns. Os estudos visando prever o crescimento de microbiano em alimentos e a deterioração causada por estes receberam destaque nos últimos anos. O verdadeiro poder das abordagens feitas pela microbiologia preditiva é que, ao contrário do processo tradicional de armazenamento, os modelos, uma vez validados, podem ser utilizados para prever com rapidez e segurança a resposta dos micro-organismos sob várias condições, dentro dos limites investigados para temperatura, pH e concentração de sal, por exemplo. Isto faz com que a microbiologia preditiva seja considerada uma ferramenta preciosa para os microbiologistas de alimentos na tomada diária de decisões [9].

Dentre os modelos encontrados na literatura especializada, o mais utilizado é o modelo de Baranyi e Roberts [2]. Este conjunto de equações pode ser utilizado para descrever o crescimento de micro-organismos patogênicos tanto em um ambiente isotérmico quanto em um ambiente não-isotérmico, e como foi o primeiro modelo a incluir explicitamente uma descrição biológica para a fase de adaptação do micro-

organismo acabou adquirindo esta posição de destaque em relação aos outros modelos. Além desta equação, o modelo de Gompertz modificado é também bastante utilizado para o estudo do crescimento de bactérias [7]. Recentemente foi introduzido um novo modelo que consiste na generalização de outras equações da literatura, incluindo o modelo de Gompertz modificado como um caso especial [18].

Uma demanda crescente dos consumidores de produtos alimentícios está relacionada à substituição de compostos antimicrobianos sintetizados quimicamente por alternativas naturais, com o intuito de assegurar a segurança alimentar e o consumo de alimentos saudáveis [20]. Neste contexto, uma alternativa viável envolve o emprego de óleos essenciais, os quais, em geral, apresentam propriedades antimicrobianas. Os óleos essenciais consistem em misturas de baixa massa molar que são biosintetizadas em diferentes regiões das plantas [1]. Embora sua eficácia como agente bactericida tenha sido confirmada em muitos estudos, não há registros confiáveis do seu modo de ação até o momento [8]. Além do uso para eliminação de micro-organismos, os óleos essenciais, quando empregados em pequenas quantidades, podem ser usados em produtos alimentícios sem exercer influência sobre suas propriedades organolépticas ou sensoriais [5].

Estudos prévios demonstraram que o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) possui propriedades antimicrobianas contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos [12, 17]. No que diz respeito à *Salmonella*, o óleo essencial de orégano apresentou forte atividade antibacteriana, porém a suscetibilidade microbiana foi observada como sendo dependente do sorovar considerado [14]. Em outro estudo realizado com cinco diferentes marcas comerciais, foi avaliada a atividade inibitória de óleo essencial de orégano frente à *Salmonella Enteritidis in vitro*. Os resultados evidenciaram a inibição, mas não foi observada diferença significativa entre as marcas [15].

Entretanto, estudos quantitativos que visam sistematizar a ação inibitória do óleo essencial de orégano sobre *Salmonella Enteritidis* não são encontrados em grande quantidade na literatura especializada. Tais estudos estão compreendidos no escopo da microbiologia preditiva e envolvem o emprego de modelos matemáticos, que fornecem estimativas da influência da concentração de óleo sobre parâmetros cinéticos da curva de crescimento microbiana, tais como a duração da fase de adaptação e a velocidade de crescimento específico do micro-organismo sendo considerado [2]. Através deste procedimento, é possível que sejam obtidos modelos secundários, ou seja, equações matemáticas que relacionem parâmetros ambientais (no caso, a concentração de óleo essencial) e os parâmetros cinéticos previamente mencionados,

fato este que possibilitará uma determinação da concentração ótima de óleo no que diz respeito à contaminação por *Salmonella Enteritidis*.

O alimento escolhido foi a maionese pelo fato de seu consumo ser bastante difundido, além da alta suscetibilidade à contaminação por bactérias e fungos, e da possibilidade de contaminação cruzada que pode ocorrer durante a preparação da mesma. Já a seleção da *Salmonella Enteritidis* como micro-organismo alvo se justifica com base na sua grande associação com surtos de intoxicação em alimentos de consumo popular.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultura microbiana

Salmonella enterica subspécie enterica sorovar Enteritidis ATCC 13076 (SE) mantida em ágar TSA (Trypticase soy agar) a 7°C, foi reativada em caldo BHI (Brain Heart Infusion) a 36°C por 18 h.

2.2. Óleo essencial

Foi adquirido óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) comercial da Marca Laszlo.

2.3. Preparo da Maionese

A maionese foi preparada com 175 mL de óleo de soja, 17,5 g de gema ovo, 9 mL de NaCl (10%), 1,25 mL de EDTA (1%), 25 mL de vinagre (4%) em liquidificador industrial estéril, ajustando o pH para 4,0. Na sequência, a maionese foi fracionada em três lotes de 50 mL aproximadamente e cada lote foi inserido em três sacos estéreis. Foram adicionadas nestes sacos as seguintes concentrações de óleo essencial de orégano: 0,0% (controle), 0,7% e 1,4% (v/v) sendo cada uma destas medições denominadas de A, B e C, respectivamente.

2.4. Avaliação da ação do óleo essencial de orégano sobre o desenvolvimento de *Salmonella Enteritidis* a 36°C

Nos sacos A, B e C foram inoculados 1mL da cultura de *Salmonella Enteritidis* previamente diluída à concentração de 0,5 da escala de MacFarland, o que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. As amostras obtidas foram homogeneizadas em um homogeneizador digital durante três minutos e armazenadas a 36°C. Decorridas 0, 1, 2, 4, 8 e 24 h após o armazenamento, foram retiradas alíquotas de 10 g de maionese

de cada saco (A, B e C) e estas foram diluídas em 90 mL de água peptonada e subsequentemente realizadas diluições decimais com 9 mL de água peptonada. O plaqueamento foi realizado em superfície em ágar BLPS (*Brilliant Green Agar – Salmonella sp.*) em duplicata e as amostras incubadas a 36°C por 24 h. Após a incubação, foi feita a contagem das colônias e os resultados expressos em log UFC/g de maionese. Para as outras temperaturas utilizadas neste estudo, 8°C e 20°C, o procedimento adotado foi similar exceto pelas temperaturas de armazenamento e incubação, as quais foram de 8°C e 20°C, respectivamente.

2.5. Modelagem matemática

Foi usado o modelo matemático de Baranyi-Roberts [2, 3]. Para o ajuste foi utilizado o software DMFit v.2.1, o qual consiste num suplemento do Excel e que pode ser utilizado para ajuste de curvas de crescimento microbianas, nos quais uma fase de crescimento linear (em escala logarítmica) é seguida por uma fase estacionária.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FIGURA 1 apresenta os resultados obtidos para a contagem de *Salmonella Enteritidis* na maionese adicionada de óleo essencial de orégano às concentrações de 0,0% (amostra controle), 0,7% e 1,4% para a temperatura de 36°C. Os gráficos obtidos para as outras temperaturas foram semelhantes e, por essa razão, não serão apresentados no presente estudo.

Para a temperatura de 8°C, foram realizadas contagens apenas após 0, 24 e 48 h do momento da inoculação. Este fato se justifica porque a *Salmonella Enteritidis* é uma bactéria mesófila, ou seja, cujo crescimento é mais favorável para temperaturas superiores a 20°C [1]. Logo, é mais difícil que sejam feitas medidas de contagem desta bactéria à temperaturas mais baixas. Os dados foram ajustados ao modelo de Baranyi-Roberts [2, 3], o qual é descrito pelas Equações 1 e 2:

$$\ln(N(t)) = \ln(N_0) + \mu_{\max} A_n(t) - \frac{1}{m} \cdot \ln\left(1 + \frac{e^{m\mu_{\max}A_n(t)} - 1}{e^{m(N_{\max} - N_0)}}\right) \quad (1)$$

$$A_n(t) = t + \frac{1}{\mu_{\max}} \ln\left(e^{-\mu_{\max}t} + e^{-\mu_{\max}\lambda} - e^{-\mu_{\max}(t+\lambda)}\right) \quad (2)$$

onde $N(t)$ é a população bacteriana no tempo t (UFC/g); N_0 é a população bacteriana inicial (UFC/g); μ_{\max} é a taxa de mortalidade de micro-organismos (ln UFC/g h); N_{\max} é a população bacteriana máxima (UFC/g); λ é a duração do período de adaptação da bactéria ao novo ambiente a que ela é submetida (h) e m é um parâmetro de forma adimensional sem significado biológico.

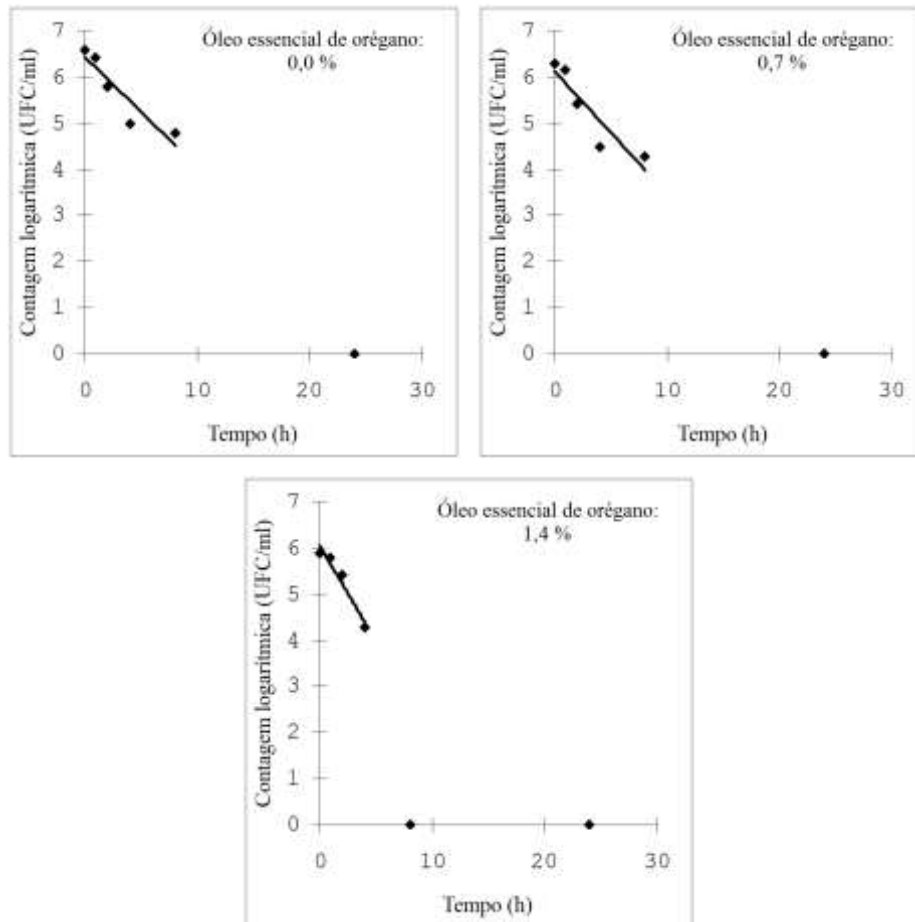


Figura 1: Contagem de *Salmonella Enteritidis* a 36°C para as três concentrações de óleo essencial de orégano usadas neste estudo.

O parâmetro de interesse do ponto de vista da eficiência da ação do óleo essencial de orégano sobre a população microbiana é a taxa de mortalidade, μ_{\max} , a qual é uma medida da ação bactericida do óleo. Os resultados obtidos para esse parâmetro após ajuste dos dados experimentais às Equações 1 e 2 encontram-se expostos na TABELA 1.

Tabela 1 - Taxas de mortalidade bacteriana (log UFC/g h) e respectivos coeficientes de determinação para diferentes temperaturas e concentrações de óleo essencial de orégano.

Concentração de óleo essencial de orégano (%)	Temperatura (°C)		
	8°C	25°C	36°C
0,0	0,1884 (R ² = 0,768)	0,2679 (R ² = 0,832)	0,4856 (R ² = 0,795)
0,7	0,1996 (R ² = 0,803)	0,2831 (R ² = 0,874)	0,5224 (R ² = 0,775)
1,4	0,2112 (R ² = 0,797)	0,3012 (R ² = 0,893)	0,5519 (R ² = 0,921)

A partir dos dados da TABELA 1, foi possível obter-se equações lineares relacionando a taxa de mortalidade bacteriana à concentração de óleo essencial de orégano para cada uma das temperaturas consideradas. Estas equações são denominadas na literatura da área da microbiologia preditiva de modelos secundários [10]. As Equações 3, 4 e 5 apresentam os resultados obtidos:

$$\mu_{\max 8}(OEO) = 0,1883 + 0,0163OEO \quad (3)$$

$$\mu_{\max 25}(OEO) = 0,2674 + 0,0238OEO \quad (4)$$

$$\mu_{\max 36}(OEO) = 0,4868 + 0,0474OEO \quad (5)$$

onde $\mu_{\max j}(OEO)$ é a taxa de mortalidade bacteriana a j°C e OEO é a concentração de óleo essencial de orégano.

A partir dessas equações, observa-se que a ação do óleo é mais eficiente com o aumento da temperatura, sendo aproximadamente 3 vezes superior (0,0474/0,0163) a 36°C em relação a 8°C. Como foi observado um aumento linear de μ_{\max} com relação a OEO para as três temperaturas estudadas, é lógico que quanto maior a concentração de óleo essencial de orégano, maior é a taxa de mortalidade de *Salmonella Enteritidis*. Entretanto, estudos preliminares indicam que valores superiores a 1,0% de óleo resultam em alterações significativas nos atributos sensoriais da maionese, as quais

poderiam gerar uma não aceitação deste produto por parte do consumidor. No momento, novas medidas estão sendo conduzidas para diferentes concentrações de óleo e diferentes temperaturas em conjunto com análises sensoriais realizadas com possíveis consumidores de maionese (não inoculada), para verificar o limite de aceitação do produto com o intuito de se obter a melhor combinação segurança-aceitação sensorial que pode ser obtida.

Embora não sejam encontrados na literatura da área, estudos quantitativos onde são avaliados parâmetros cinéticos de crescimento avaliando a eficiência do óleo essencial de orégano no que diz respeito à inativação de *Salmonella Enteritidis* em alimentos, há estudos qualitativos versando sobre este tema. Dentre estes, foi avaliado que a adição de 0,2% de óleo essencial de orégano em maionese com salada de legumes a 8°C reduziu a contagem de *Salmonella Enteritidis* em 0,5 logaritmos após 24 h [11, 16]. Outro estudo realizado com a adição de suco de limão como agente inibidor, apresentou inibições bem inferiores [13].

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através deste estudo permitem inferir-se que a adição de óleo essencial de orégano à maionese pode ser uma alternativa eficaz para o controle de surtos de infecção bacteriana causados por *Salmonella Enteritidis*. Ainda não é possível se estabelecer com segurança qual é o valor ótimo da concentração de óleo essencial de orégano já que uma maior quantidade deste produto gera uma menor aceitação por parte do consumidor apesar de sua eficiência como agente bactericida. Provavelmente, este valor ótimo será dependente da temperatura, sendo necessário obter-se novas equações que descrevam este comportamento. Novos estudos com uma maior quantidade de concentrações de óleo, diferentes temperaturas, além da realização de uma análise sensorial do produto (maionese e orégano) em conjunto com as medidas da taxa de mortalidade podem ajudar a elucidar esta questão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BAJPAI, V. K.; BAEK, K. H.; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 722-734, 2012.
- [2] BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 277-294, 1994.
- [3] BARANYI, J.; ROBERTS, T. A.; MCCLURE, P. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. **Food Microbiology**, v. 10, p. 43-59, 1993.

- [4] BATZ, M. B.; HOFFMANN, S.; MORRIS JR., J. G. **Ranking the Risks: The 10 Pathogen-Food Combinations with the Greatest Burden on Public Health**, 2011.
- [5] BURT, S. A. Essential oils: Their antibacterial properties and potential application in foods – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 24, p. 223-253, 2004.
- [6] FOEGEDING, P. M.; ROBERTS, T.; BENNETT, J. M.; BRYAN, F. L.; CLIVER, D. O.; DOYLE, M. P.; EDEN, R. F.; FLOWERS, R.; FOREMAN, C. T.; LORBER, B.; MADDEN, J. M.; ROSE, J. B.; SMITH, J. L.; TODD, E. C. D.; WEKELL, M. M. **Foodborne pathogens: Risks and consequences, Task Force Report no. 122**. Ames, Iowa, USA, Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 1994.
- [7] GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. **Journal Applied of Bacteriology**, v. 62, p. 479-490, 1987.
- [8] LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.
- [9] MCCLURE, P. J.; BLACKBURN, C. W.; COLE, M. B.; CURTIS, P. S.; JONES, J. E.; LEGAN, J. D.; OGDEN, I. D.; PECK, M. W.; ROBERTS, T. A.; SUTHERLAND, J. P.; WALKER, J. S. Modelling the growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK food micromodel approach. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 265-275, 1994.
- [10] MCMEEKIN, T. A.; OLLEY, J.; ROSS, T.; RATKOWSKY, D. A. **Predictive microbiology: theory and application**. Taunton, U.K., Research Studies Press Ltda., 1993.
- [11] NOGUEIRA, B. T. C. P.; FRANCO, B. D. G. M. Recovery of acid injured salmonellae from artificially contaminated mayonnaise. **Revista de Microbiologia**, v. 26, p. 28-31, 1995.
- [12] OLIVEIRA, C. E. V.; STAMFORD, T. L. M.; GOMES NETO, N. J.; SOUZA, E. L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 308-311, 2010.
- [13] ROLLER, S.; COVILL, N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 202-209, 2000.
- [14] SANTURIO, J. M.; SANTURIO, J. M.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Antimicrobial activity of essential oils from oregano, thyme and cinnamon against *Salmonella enterica* sorovars from avian source. **Ciência Rural**, v. 37, p. 803-808, 2007.
- [15] SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G. M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 136-141, 2010.

- [16] SILVA, J. P. L.; FRANCO, B. D. G. M. Application of oregano essential oil against *Salmonella Enteritidis* in mayonnaise salad. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, v. 2, p. 70-75; 2012.
- [17] SOUZA, E. L.; BARROS, J. C. B.; CONCEIÇÃO, M. L.; GOMES NETO, N. J.; COSTA, A. C. V. Combined application of *Origanum vulgare* L. essential oil and acetic acid for controlling the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. **Braz J Microbiol**, v. 40, p. 387-393, 2009.
- [18] TELEKEN, J. T.; ROBAZZA, W. S.; GOMES, G. A. Mathematical modeling of microbial growth in milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, p. 891-896, 2011.
- [19] TODD, E. C. D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in Canada and costs to reduce salmonellosis. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 586-594, 1989.
- [20] XU, W.; QU, W.; HUANG, K.; GUO, F.; YANG, J.; ZHAO, H. Antibacterial effect of grapefruit seed extract on foodborne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 126-133, 2007.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo suporte financeiro fornecido através de bolsa de iniciação científica e do Edital Universal 14/2013.