

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
DE ALIMENTOS**

Letícia Ungaretti Haberbeck

**MODELAGEM DA INATIVAÇÃO ISOTÉRMICA E NÃO
ISOTÉRMICA DE *Bacillus coagulans* POR TRATAMENTO
TERMOQUÍMICO UTILIZANDO ÓLEO ESSENCIAL DE
ORÉGANO**

Dissertação submetida ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof^a Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Co-orientador: Prof^a Dr^a Beatriz de Cássia Martins Salomão

Florianópolis
2011

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

H114m Haberbeck, Leticia Ungaretti

Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano [dissertação] / Leticia Ungaretti Haberbeck ; orientadora, Gláucia Maria Falcão de Aragão. - Florianópolis, SC, 2011.
93 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. *Bacillus* (Bactéria). 3. Coagulantes. 4. Orégano. 5. Termoquímica. I. Aragão, Gláucia Maria Falcão de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663

“Modelagem da inativação isotérmica e não isotérmica de *Bacillus coagulans* por tratamento termoquímico utilizando óleo essencial de orégano.”

Por

Leticia Ungaretti Haberbeck

Dissertação julgada para obtenção do título de **Mestre em Engenharia de Alimentos**, área de Concentração de **Desenvolvimento de Processos da Indústria de Alimentos**, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof^a Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão
Orientadora

Prof^a Dr^a Alcilene Rodrigues Monteiro Fritz
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Gláucia Maria Falcão de Aragão

Prof^a Dr^a Pilar Rodriguez de Massaguer

Prof^a Dr^a Sandra Regina Salvador Ferreira

Prof. Dr. Bruno Augusto Mattar Carciofi

Florianópolis, 31 de março de 2011.

Dedico este trabalho às pessoas importantes da minha vida, família,
amigos e mestres.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Gláucia, por todo o ensinamento e dedicação. Por acreditar em novas idéias, permitindo a realização deste trabalho. Sua presença e confiança foram fundamentais para a conclusão deste trabalho. Obrigada por sempre prezar pelo bem estar de seus alunos.

À minha co-orientadora Beatriz, sempre disposta a ajudar, escutar minhas dúvidas e resolve-las de maneira prática. Seu sorriso e bom-humor são contagiantes e animadores. Obrigada por estar ao meu lado e por todo o conhecimento passado.

Aos professores Bruno, Pilar e Sandra por participarem da banca de defesa desta dissertação. Especialmente ao professor Bruno, que contribuiu anteriormente no enriquecimento deste trabalho ao participar da banca de qualificação.

Ao professor Carlos Riehl, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por ter gentilmente realizado a análise das moléculas do óleo essencial de orégano.

Ao professor João e a todos os alunos do PROFI, que gentilmente cederam equipamentos para a realização da parte prática deste trabalho. Obrigada pela confiança ao emprestá-los.

Ao professor Pedro e aos alunos do LCP, Fernanda e Joel, pela orientação na elaboração da emulsão e por permitir a utilização de equipamentos do laboratório. Obrigada pela ajuda e paciência.

À Givaudan Brasil pelo envio das amostras de óleo essencial de orégano, sem as quais a execução deste trabalho seria impossível.

Ao Cristiano, sempre pronto a me auxiliar, seu conhecimento ajudou na elaboração da modelagem matemática desse trabalho. Obrigada pela paciência.

Aos meus pais, Alzira e Marcos, por sempre me apoiarem nas minhas escolhas, mesmo que elas impliquem em quilômetros de distância. Meu agradecimento eterno por proporcionarem oportunidades únicas na minha vida. A certeza de que posso contar com vocês para tudo foi e sempre será imprescindível na minha formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão Jorge por sua paciência sem fim e por sempre estar disposto a ajudar. Ao meu irmão caçula Pedro, que mesmo sem saber, me ajudou a sorrir quando eu mais precisava. Ao João e à Vanessa por fazerem parte importante desta família “dos meus, dos teus e dos nossos”.

Às minhas avós, Zoemar e Ida, obrigada por todo o carinho e

mimos. Aos meus tios e tias. Às minhas “pliumas”, Monique, Manuela, Mariah e Daniela, que sempre estão presentes mesmo longe, além de primas são grandes amigas.

Ao Rodrigo por todo o carinho e companhia. Suas idéias cheias de criatividade e seu conhecimento sempre me incentivam a buscar mais. Obrigada por tornar esses últimos meses muito mais tranquilos do que eu imaginava.

Aos amigos do ENGEBIO por enfrentarem todos os desafios. Obrigada por sempre terem me ajudado com muita paciência. O clima agradável e alegre do EGEBIO é devido às pessoas que fazem parte dele. Obrigada especialmente às alunas da professora Gláucia: Jaci, Kelin, Kellen, Mélodi, Déia, Ana e Morgana. Todas têm o mesmo espírito batalhador.

Ao Felipe, que muito me ajudou ao longo de todo o trabalho, mesmo tendo que repetir à exaustão os experimentos. À Helô com sua breve, mas importante passagem pelo projeto.

Às minhas amigas queridas Morgana e Ana, que muito me aconselharam e incentivaram ao longo deste trabalho. À Déia pelo seu humor nas alturas e companhia mesmo sem ar condicionado no calor.

Às minhas eternas amigas, fonte de boas risadas, Ana, Lívia, Paulinha, Fê, Caca, Maily, Ani, e Cris. Em especial a Gaia e a Carol, grandes companheiras e confidentes.

À minha amiga de graduação Pam, que mesmo distante, não me larga. À turma 03.1 por tornar os anos de faculdade maravilhosos.

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos pela oportunidade do desenvolvimento desta pesquisa. À coordenadora do programa Alcilene e à secretária do programa Raquel por sempre me ajudarem.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Este trabalho pode ser realizado somente com a contribuição direta ou indireta de vocês. Muito obrigada por esta oportunidade.

RESUMO

Aumentar a vida útil dos produtos, sem afetar sua qualidade, funcionalidade e propriedades físico-químicas, modificando e desenvolvendo novos tipos de processos para a preservação microbiológica dos alimentos, é um desafio constante para a indústria. A aplicação de conservantes naturais, como óleos essenciais de plantas e especiarias, é percebida como uma nova tendência na preservação dos alimentos nos últimos anos. A bactéria *Bacillus coagulans* é um micro-organismo relevante no processamento de alimentos devido à sua capacidade deteriorante e à sua termorresistência. Além disso, *B. coagulans* causa o fenômeno *flat-sour* caracterizado pela acidificação do alimento sem a produção de gás. O tratamento térmico necessário para garantir a inativação deste microrganismo pode levar à perda de nutrientes e/ou à alterações organolépticas nos alimentos processados. Assim sendo, o objetivo geral deste trabalho foi estudar o efeito da ação conjunta do óleo essencial (OE) de orégano e do calor sobre a resistência dos esporos de *B. coagulans*, em caldo nutriente ajustado em condições que simulam um produto ácido como, por exemplo, a polpa de tomate (4 °Brix e pH 4,2). O OE de orégano estudado apresentou como principais moléculas constituintes carvacrol (58%), seguido de seu precursor ρ -cimeno, γ -terpineno, linalool, timol, entre outras. Essas moléculas têm sua atividade microbiana estudada e comprovada pela literatura, sendo o carvacrol e o timol, apontadas como umas das mais eficazes na inibição de micro-organismos. O teste inicial para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) do OE resultou na concentração de 300 ppm, que foi capaz de inibir o crescimento visual do *B. coagulans* por 7 dias. Em seguida, na avaliação da resistência termoquímica, a ação conjunta do calor e do óleo essencial de orégano sobre os esporos foi iniciada com a CMI de 300 ppm e posteriormente, as concentrações de 0, 250, 400, 500 e 1000 ppm foram testadas, todas à temperatura de 100 °C. Entre as diferentes concentrações de OE, a de 400 ppm foi a menor concentração onde o tempo necessário para se obter 6 reduções decimais foi significativamente ($P < 0,01$) diferente da resistência térmica sem o óleo essencial de orégano. Assim, a segunda etapa do estudo da resistência termo química foi realizada fixando-se a concentração de OE em 400 ppm e variando a temperatura entre 90 e 100 °C. Para todas as curvas experimentais de inativação termoquímica de *B. coagulans*, o modelo primário de Weibull teve um bom ajuste aos dados. Após o ajuste primário, modelos secundários empíricos, como as equações

exponencial e linear, foram ajustados aos parâmetros do modelo de Weibull para descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros primários $\alpha(T)$, $\beta(T)$ e $b(T)$. Com base no modelo primário e secundário, foi realizada a resistência termoquímica não isotérmica dos esporos de *B. coagulans*. Nesta etapa, o modelo não isotérmico proposto por Peleg (2006) foi utilizado para a predição dos dados não isotérmicos. Assim, o modelo proposto foi validado com dados experimentais de *B. coagulans* em caldo nutriente adicionado de 400 ppm de óleo essencial de orégano sob dois perfis de temperatura diferentes. O efeito antibacteriano do óleo essencial de orégano foi comprovado através de diferentes tipos de análises, mostrando que este conservante natural pode ser utilizado na indústria de alimentos. Deste modo, o OE de orégano pode reduzir o tratamento térmico de produtos, resultando em menor gasto de energia e diminuindo o impacto do calor nas propriedades organolépticas e/ou nutricionais do produto. Além disto, no caso de produtos como polpa e molhos de tomate, o orégano pode ser adicionado como uma alternativa de adição de sabor ao alimento.

ABSTRACT

Increasing shelf-life of products, without affecting their quality, physicochemical properties and functionality, by modifying and developing new preservations steps, is a constant challenge for the food industry. Application of natural preservatives, as essential oils (EO) from plants and herbs, has been increasingly noticed as a new trend in biological preservation of foods in recent years. Bacteria resistant to heat stress, such as *Bacillus coagulans*, are relevant microorganisms in food processing because of its deteriorating ability after surviving the heat treatment. Besides that, *B. coagulans*, causes the flat-sour phenomenon characterized by the acidification of food without gas production. The heat treatment necessary to ensure the inactivation of this microorganism can lead to loss of nutrients and/or organoleptic changes in the processed foods. Thus, the general objective of this work was to study the synergistic effect of oregano essential oil (EO) and heat on the resistance of *Bacillus coagulans* spore in nutrient broth adjusted to conditions simulating an acid product, for instance, tomato pulp (4 ° Brix and pH 4.2). The oregano EO studied showed carvacrol (58%) as main constituent molecules, followed by its precursor ρ -cymene, γ -terpinene, linalool, thymol, among others. These molecules have their antimicrobial activity confirmed by the literature, and carvacrol and thymol are one of the most effective molecules in inhibiting microorganisms. The initial test for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of the OE resulted in a concentration of 300 ppm, which was capable of inhibiting the visual growth of *B. coagulans* for 7 days. Then, the thermochemical resistance, the joint action of heat and essential oil of oregano on the spores was initiated with the MIC of 300 ppm and subsequently the concentrations of 0, 250, 400, 500 and 1000 ppm, at 100 ° C were tested. Among the different concentrations of the EO, 400 ppm was the lowest concentration where the time needed to obtain 6 decimal reduction was significantly ($P < 0.01$) different from the thermal resistance without the essential oil of oregano. The second stage of the study thermochemical resistance was performed by fixing the concentration of EO at 400 ppm and varying the temperature between 90 and 100 °C. For all experimental thermochemical inactivation curves of *B. coagulans*, the primary model of Weibull presented a good fit to the data. After adjusting the primary model, the secondary empirical models, such as exponential and linear equations, were fitted to the Weibull parameters to describe the influence of temperature on the primary parameters α (T), β (T) and b (T). Based on the model primary

and secondary models, it was realized the non-isothermal thermochemical resistance of *B. coagulans* spores. In this step, the non-isothermal model proposed by Peleg (2006) was used to predict non-isothermal data. Thus, the proposed model was validated with experimental data of *B. coagulans* in nutrient broth supplemented with 400 ppm of oregano EO in two different temperature profiles. The antibacterial effects of oregano EO was proved through different types of analysis, showing that this natural preservative can be used in food industry. Thus, the EO of oregano may reduce the thermal treatment of products, resulting in less energy consumption and reducing the impact of heat on organoleptic and/or nutrition properties. Besides that, in the case of products such as pulp and tomato sauce oregano can be added as an alternative to adding flavor to food

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1. Fórmula estrutural de moléculas constituintes dos óleos essenciais 28

Figura 2. Curvas de inativação de micro-organismos usualmente observadas na literatura. No gráfico (a) estão representadas as curvas: (Δ) log-linear; (x) log-linear com cauda; (\square) sigmoidal; (\circ) log-linear precedida de ombro. No gráfico (b): (Δ) bifásica; (x) côncava; (\square) bifásica com ombro; (\circ) convexa..... 32

Figura 3. Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull com diferentes valores para o fator de forma α 33

Capítulo 3

Figura 1. Dados experimentais da resistência química de *B. coagulans* em CN (4 °Brix, pH de 4,2) com (\bullet) 1000 ppm, (\blacksquare) duplicata de 1000 ppm e (Δ) 20000 ppm de óleo essencial de orégano.51

Capítulo 4

Figure 1. Isothermal inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) without oregano EO at (\square) 95 °C, (\blacktriangle) 97 °C, (\bullet) 100 °C and (\blacksquare) 103 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data. 63

Figure 2. Temperature dependence of the parameters (a) α and (b) β and (c) t6D for thermal inactivation of *B. coagulans*..... 65

Figure 3. Isothermal inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 100 °C with 500 ppm of non-emulsified EO (\circ), and emulsified with soy lecithin (\blacktriangle). The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data. 66

Figure 4. Inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 95 °C (Δ) without EO, (\bullet) with 500 ppm of EO, and at 100 °C (\blacksquare) without, (\circ) with 500 ppm of EO. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data. 67

Figure 5. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 100 °C (\blacksquare)without EO, and with (\circ) 250, (\blacktriangle) 300, (\square) 350, (\bullet) 400, (\blacktriangledown) 500 and (x) 1000 ppm of

oregano EO. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data..... 68

Figure 6. EO concentration dependence of t_{6D} for the thermochemical resistance at 100 °C..... 69

Figure 7. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.. 70

Figure 8. Temperature dependence of parameters (a) α and (b) β and (c) t_{6D} of *B. coagulans* with 400 ppm. Figure b and c show the fit of secondary models, Equations 9 and 10, respectively, to the experimental data. 72

Figure 9. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution with a fixed parameter α to the experimental data. 73

Figure 10. The temperature dependence of the parameters (a) β and (b) t_{6D} from the Weibull model with (Δ) fixed and (□) varying α , of *B. coagulans* with 400 ppm described by Equation 2..... 75

Capítulo 5

Figure 1. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull model with a fixed parameter α (2.65) to the experimental data. 89

Figure 2. The temperature dependence of the parameter (a) $b(T)$ of *B. coagulans* with 400 ppm described by Equation 2; (b) re-scaled graphic (a) from temperature 90 to 97 °C..... 91

Figure 3. (a) Experimental data for isothermal inactivation at (□) 90 °C and (○) 95 °C, and for (Δ) non-isothermal inactivation of profile 1 (90-95°C/1 min). The continuous line represents the predictions of Equation 5 to non-isothermal treatment. (b) Temperature profile. The continuous line represents the predictions of Equation 6, and (○) represent the experimental data..... 92

Figure 4. (a) Experimental data for isothermal inactivation at (\square) 90 °C and (\circ) 95 °C, and for (Δ) non-isothermal inactivation of profile 2 (90-95°C/5 min). The continuous line represents the predictions of Equation 5 to non-isothermal treatment. (b) Temperature profile. The continuous line represents the predictions of Equation 6, and (\circ) represent the experimental data. 93

Anexo 1

Figura 1. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 0 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 101

Figura 2. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 250 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 101

Figura 3. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 300 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 102

Figura 4. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 350 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 102

Figura 5. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 103

Figura 6. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 500 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 103

Figura 7. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 1000 ppm de OE de orégano para a duplicata número (\bullet) 1 e (\blacktriangle) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais. 104

Figura 8. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 90 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais..... 104

Figura 9. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 95 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais..... 105

Figura 10. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 97 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais..... 105

LISTA DE TABELA

Capítulo 3

Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias de óleos essenciais de orégano. 43

Tabela 2. Compostos identificados no óleo essencial de orégano com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. 47

Tabela 3. Dia em que ocorreu o crescimento visual do *Bacillus coagulans* nas placas com diferentes concentrações de OE de orégano. 49

Capítulo 4

Table 1. Compounds identified in the essential oil of oregano with retention times and relative concentration (%) detected by gas chromatography / mass spectrometry. 62

Table 2. Estimated parameter values of the Weibull model and the time to reach 6 decimal reductions of *B. coagulans* spore inactivation by temperature. 64

Table 3. Estimated parameter values of the Weibull model, for each duplicate with the respective mean and standard deviation, for the inactivation of *B. coagulans* spores at 100 °C and different EO concentrations. 69

Table 4. Estimated mean values of parameters of the Weibull model and the $t6D$, with the respective standard deviation, for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO and different heat temperatures. 71

Table 5. Estimated mean values of β and $t6D$ from the Weibull model with fixed parameter α (2.65), with the respective standard deviation, for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO and different temperatures. 74

Capítulo 5

Table 1. Mean values and standard deviation of the inactivation parameter b from the Weibull model with fixed α (2.65), for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO at different heat temperatures.90

NOMECLATURA

Símbolo	Descrição	Unidade (SI)
a, c	Constantes empíricas das equações exponencial e linear	
a _i , b _i e c _i	Parâmetros do modelo senoidal que descreve a variação da temperatura	
B	Inverso do parâmetro β elevado a α ($b = 1/\beta^\alpha$)	
CMI	Concentração Mínima Inibitória	
CN / NB	Caldo Nutriente / Nutrient Broth	
D	Tempo para reduzir a população de micro-organismos em 1 log	min
E	Energia de ativação	kJ/mol
K	Inverso do valor D	min ⁻¹
k ₁ e k ₂	Constantes cinéticas de primeira ordem	
MSE	Erro médio quadrático / Mean square error	
N	Número de observações experimentais	
N(t)	População de micro-organismos no instante t	UFC/mL
N ₀	População inicial de micro-organismos	UFC/mL
OE / EO	Óleo essencial / Essential oil	
P	Número de parâmetros do modelo	
R	Constante universal dos gases	J/K.mol
R ²	Coefficiente de correlação	
S(t)	Velocidade de sobrevivência momentânea $S(t)=N(t)/N_0$	
SD	Desvio padrão / Standard deviation	
T	Tempo	min
T	Temperatura	°C
t*	Tempo que corresponde à taxa de sobrevivência	min
TDA	Agar Triptona Dextrosado	
V _{observed}	Valor experimental do dado ou da variável	

Símbolo	Descrição	Unidade (SI)
$V_{\text{predicted}}$	Valor predito, pelo modelo, do dado ou da variável	
y	Parâmetro do modelo primário	
A	Fator de forma	
B	Fator de localização	

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	23
1.1 Referências bibliográficas	24
CAPÍTULO 2 - REVISÃO Bibliográfica	26
2.1 <i>Bacillus coagulans</i>	26
2.2 Óleos essenciais	27
2.2.1 Perfil químico dos óleos essenciais	27
2.2.2 Mecanismo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais	28
2.2.3 Óleo essencial de orégano	29
2.3 Microbiologia Preditiva	30
2.3.1 Modelos primários e secundários	31
2.1.2 Modelos não-isotérmicos	34
2.4 Referências bibliográficas	35
CAPÍTULO 3 - AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO SOBRE OS ESPOROS DE <i>Bacillus coagulans</i>	41
3.1 Introdução	41
3.2 Materiais e métodos	43
3.2.1 Micro-organismo e produção de esporos	43
3.2.2 Óleo essencial de orégano	44
3.2.3 Concentração Mínima Inibitória	45
3.2.4 Resistência química	45
3.3 Resultados e discussão	47
3.3.1 Determinação da composição química do óleo essencial de orégano	47
3.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	48
3.3.3 Resistência química	50
3.4 Conclusão	51
3.5 Referências	52
CAPÍTULO 4 - <i>Bacillus coagulans</i> SPORE INACTIVATION THROUGH THE APPLICATION OF OREGANO ESSENTIAL OIL AND HEAT	55
Abstract	55
4.1 Introduction	56
4.2. Materials and methods	57
4.2.1 Strain and preparation of inocula	57
4.2.2 Oregano essential oil	58

4.2.3 Emulsion procedure.....	58
4.2.4 Heat medium	58
4.2.5 Thermal and thermochemical inactivation	59
4.2.6 Mathematical modeling.....	60
4.2.7 Statistical analyses.....	60
4.3. Results.....	61
4.3.1 Oregano EO components.....	61
4.3.2 Thermal inactivation of <i>B.coagulans</i> spores	62
4.3.3 Thermochemical inactivation of <i>B.coagulans</i> spores.....	66
4.4. Discussion	76
4.5 References	78
CAPÍTULO 5.....	81
Abstract	81
5.1 Introduction	82
5.2 Theoretical background.....	84
5.3 Materials and methods.....	85
5.3.1 Strain and preparation of inocula	85
5.3.2 Oregano essential oil	86
5.3.3 Heat medium	86
5.3.4 Thermochemical inactivation under isothermal and non-isothermal conditions	86
5.3.5 Data processing	87
5.3.6 Statistical analyses.....	88
5.4 Results.....	89
5.5 Discussion	94
5.6 References	95
CAPÍTULO 6 - Conclusão.....	99
ANEXO 1.....	101

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

A exigência dos consumidores por alimentos seguros é, em parte, atribuída ao aumento dos casos de doenças causadas por ingestão de alimentos contaminados, além da maior acessibilidade às informações sobre a qualidade destes. Somado a esses fatores, há a legislação nacional mais rigorosa com a qualidade microbiológica dos alimentos processados. Por sua vez, pesquisadores da área de alimentos buscam alternativas para o uso de conservantes químicos nos alimentos com o objetivo de aumentar a segurança destes. Consequentemente, pesquisas em conservantes naturais vêm recebendo atenção (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

Os óleos essenciais (OE) de especiarias como orégano, manjerição, canela, cravo-da-índia, mostarda, entre outras, têm atividade antimicrobiana comprovada contra micro-organismos deteriorantes de alimentos. O óleo essencial de orégano é considerado na literatura como um dos mais efetivos do ponto de vista antimicrobiano (VELLUTI et al., 2003; OUSSALAH et al., 2006; SOYLU; SOYLU; KURT et al., 2006).

Esporos de *Bacillus coagulans* apresentam elevada termorresistência, podendo sobreviver às temperaturas de processamento de alimentos. Além disso, recebem atenção na indústria de produtos vegetais processados devido à sua habilidade de germinar e crescer em faixas de pH em torno de 4,5. O desenvolvimento de *B. coagulans* em alimentos enlatados causa o *flat-sour*, que se caracteriza pela acidificação acentuada do meio através de fermentação, sem formação de gás (DE CLERCK et al., 2004; LUCAS et al., 2006).

Na microbiologia preditiva, o comportamento dos micro-organismos (inativação, crescimento e sobrevivência) frente a uma condição ambiental, como temperatura ou pressão, pode ser descrito através de modelos matemáticos. Estes modelos matemáticos são classificados em primários e secundários. Os modelos primários descrevem a mudança no número de micro-organismos com o tempo. Por sua vez, os modelos secundários descrevem o comportamento dos parâmetros do modelo primário de acordo com uma condição ambiental. Por exemplo, modelos empíricos, como equações exponenciais, são aplicados como modelos secundários.

Neste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi analisar o efeito da ação conjunta do óleo essencial de orégano e do calor sobre a resistência dos esporos de *Bacillus coagulans*, em caldo nutriente a 4° Brix e pH 4,2.

Os objetivos específicos são:

- (a) Determinar o perfil químico do óleo essencial de orégano.
- (b) Definir a concentração mínima inibitória do óleo essencial de orégano para os esporos de *B. coagulans*.
- (c) Determinar a inativação química dos esporos de *B. coagulans* em caldo nutriente.
- (d) Obter os parâmetros de inativação termoquímica dos esporos de *B. coagulans* em caldo nutriente sob diferentes temperaturas e concentrações de óleo essencial de orégano, através do ajuste do modelo primário de Weibull aos dados experimentais.
- (e) Descrever a influência da temperatura sobre os parâmetros de inativação termoquímica, com a concentração de 400 ppm de OE, obtidos pelo ajuste do modelo de Weibull, através de um modelo secundário apropriado.
- (f) Prever o comportamento do *B. coagulans* sob dois perfis de temperatura, a partir do modelo primário e secundário, obtidos em condições termoquímicas e isotérmicas, utilizando o modelo não isotérmico proposto por Peleg (2006).
- (g) Validar o modelo não isotérmico obtido com a realização de tratamentos termoquímicos dos esporos de *B. coagulans* em caldo nutriente sob os perfis de temperatura utilizados no estabelecimento deste modelo.

Esta dissertação está estruturada em seis capítulos, a introdução é apresentada no capítulo 1, no capítulo 2 a revisão bibliográfica. O capítulo 3 aborda a concentração mínima inibitória do OE de orégano sobre os esporos de *B. coagulans* e a resistência química dos esporos da bactéria em caldo nutriente adicionado de OE de orégano. Os capítulos 4 e 5 estão escritos na forma de artigo científico. No capítulo 4 é descrita a inativação do *B. coagulans* sob diferentes temperaturas e concentrações de óleo essencial de orégano. O capítulo 5 mostra a inativação termoquímica não isotérmica dos esporos da bactéria. Por fim, no capítulo 6 é apresentada a conclusão geral do trabalho

1.1 Referências bibliográficas

DE CLERCK, E. *et al.* Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended

Description of the Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2004.

LUCAS, R. *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

OUSSALAH, M. *et al.* Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* [S.I.], v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

SOYLU, E. M. *et al.* Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* [S.I.], v. 161, n. 2, p. 119-128, 2006.

TAJKARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

VELLUTI, A. *et al.* Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B-1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 89, n. 2-3, p. 145-154, 2003.

CAPITULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans é uma bactéria termorresistente, levemente acidófila e de metabolismo microaerófilo. Essas características a tornam um micro-organismo de grande interesse na indústria de produtos vegetais processados, pois *B. coagulans* pode germinar e crescer na faixa de pH destes produtos, em torno de 4,5 (MALLIDIS et al., 1990; LUCAS, et al., 2006). Além disso, também é responsável por contaminações em produtos derivados do leite (DE CLERCK et al., 2004).

O desenvolvimento de *B. coagulans* em produtos enlatados causa o fenômeno denominado *flat-sour*, que se caracteriza pela acidificação acentuada do alimento através de fermentação, sem formação de gás (OOMES et al., 2007). Esta acidificação ocorre devido à formação de altas concentrações de ácido láctico (DE CLERCK et al., 2004).

Em sua forma vegetativa, as células de *B. coagulans* são gram-positivas, ocorrendo isoladas ou, raramente, em cadeias curtas. A faixa de temperatura que favorece seu crescimento é de 30 a 50 °C, e a temperatura ótima de crescimento é 37 °C. Valores de pH compreendidos entre 5,5 e 6,5 favorecem o crescimento, podendo também crescer em meios que apresentam valores de pH em torno de 4,0 (MALLIDIS et al., 1990; (MALLIDIS et al., 1990; DRAGO; DE VECCHI, 2009). Os esporos de *B. coagulans* são corpos elipsoidais, localizados em uma das extremidades da célula. São bastante resistentes ao calor e às condições adversas do meio, capazes de germinar mesmo na presença de soluções diluídas de ácido clorídrico ou de hidróxido de sódio.

Devido à sua termorresistência, os esporos podem sobreviver às temperaturas utilizadas nos processos térmicos comerciais de alguns alimentos derivados de vegetais (OOMES et al., 2007; DRAGO; DE VECCHI, 2009). Por exemplo, esporos de *B. coagulans* CCT 2467, com inóculo inicial de 10^5 UFC/mL e polpa de tomate como meio de aquecimento, foram inativados após tratamento térmico igual ou maior que 30 segundos a 109 °C (PACHECO; MASSAGUER, 2004). Também em polpa de tomate, foram encontrados, para esporos de *B. coagulans*, valores de $D_{90^{\circ}\text{C}}$ iguais a 3,5 minutos e o valor z igual a 9,5 °C (SANDOVAL; BARREIRO; MENDOZA, 1992).

2.2 Óleos essenciais

Plantas produzem uma variedade de compostos orgânicos denominados metabólitos secundários, cuja maioria não participa diretamente no crescimento e desenvolvimento desses organismos vivos, porém possuem diversas funções, como por exemplo, a influência nas interações ecológicas entre a planta e o ambiente. Esses metabólitos têm mostrado grande importância na proteção contra infecções e como atrativos para polinizadores, entre outras funções (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). A produção de metabólitos secundários pode ser aumentada por diversos fatores ambientais como estresse hídrico, deficiência de nutrientes e temperatura (OLIVEIRA, FERREIRA; BORGHETTI, 2004). Metabólitos secundários podem ser corantes, colas, fibras, óleos essenciais (OE), entre outros (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

De acordo com Burt (2004), os óleos essenciais (OE) são os óleos aromáticos líquidos obtidos de diferentes partes das plantas (flores, brotos, cascas, ervas, frutas, folhas e raízes), resultando em diferentes composições. Os óleos essenciais podem ser produzidos por uma variedade de métodos, sendo a destilação a vapor o mais empregado na indústria.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) (Brasil, 2007) classifica os óleos essenciais como aromas naturais. Sob a Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, a ANVISA os regulamenta como “... produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado)...”.

2.2.1 Perfil químico dos óleos essenciais

A composição molecular dos óleos essenciais varia devido a fatores como localização geográfica do cultivo, clima, solo, parte da planta utilizada e técnica de extração (BURT, 2004). Como a composição molecular do extrato determina o seu poder antimicrobiano, é de grande importância a identificação das suas moléculas. Geralmente, os óleos essenciais contêm entre 20 a 60 componentes sendo duas a quatro moléculas majoritárias (entre 20 a 70%) e traços de outras moléculas (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008). Diversos estudos comparam a atividade antimicrobiana do OE com a das suas principais

moléculas. A maior parte conclui que, o poder antimicrobiano do OE é consequência da sinergia entre todas as moléculas constituintes e não função somente das moléculas predominantes (LAMBERT et al., 2001; BAGAMBOULA; UYTTENDAELE; DEBEVERE, 2004).

As principais moléculas dos OE estão, geralmente, incluídas em dois grupos distintos: (1) compostos terpenos e terpenóides, e (2) compostos aromáticos e alifáticos; todos caracterizados por baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008). Os compostos terpenos e terpenóides constituem até 90 % da composição dos OE. A Figura 1 mostra a estrutura das principais moléculas presentes nos óleos essenciais.

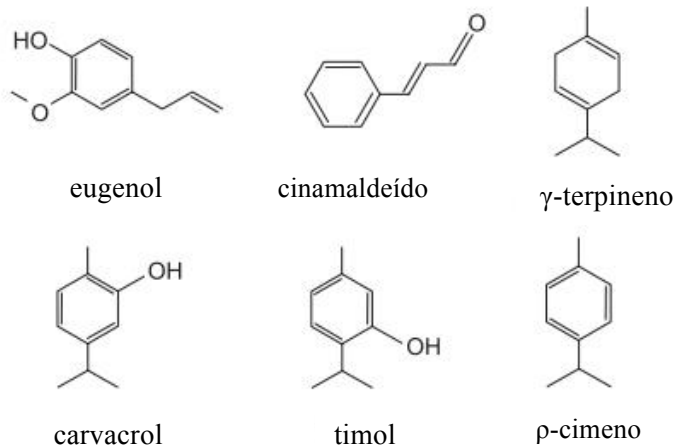


Figura 1. Fórmula estrutural de moléculas constituintes dos óleos essenciais.

2.2.2 Mecanismo da ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Como óleos essenciais possuem uma variedade de moléculas, a ação bactericida ou bacteriostática destes sob os micro-organismos não pode ser atribuído a um mecanismo específico, mas a diversos alvos na célula (BURT, 2004).

O mecanismo de ação antimicrobiana das moléculas constituintes dos OE, como timol, carvacrol, limoneno, eugenol e cinamaldeído, foi estudado em diferentes micro-organismos (DI PASQUA et al., 2006; CRISTANI et al., 2007; DI PASQUA et al., 2007). Segundo

Di Pasqua et al. (2007), as moléculas dos OE agem nos ácidos orgânicos e, principalmente, sobre a membrana das células. O caráter lipofílico dos compostos dos OE permite-lhes partição nos lipídeos da membrana celular bacteriana, tornando-a mais permeável e perturbando sua estrutura (DI PASQUA et al., 2006).

As células bacterianas de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas fluorescense*, *Brochetrix thermosphacta* e *Staphylococcus aureus*, tratadas com as moléculas fenólicas timol, carvacrol e eugenol, apresentaram alteração dos ácidos graxos presentes na membrana celular. Os resultados mostraram uma forte queda nos ácidos graxos insaturados presentes na membrana, especialmente o ácido linoleico C18:2 *trans* e o ácido linolênico C18:3 *cis*. Enquanto que, os ácidos graxos saturados da membrana aumentaram após a ação das moléculas fenólicas (DI PASQUA et al., 2007). O perfil de ácidos graxos está relacionado com a manutenção da membrana celular visto que, uma maior concentração de ácidos graxos saturados na dupla camada lipídica é relacionada à diminuição da fluidez da membrana. A manutenção da fluidez da membrana é essencial para a mobilidade e funcionamento de proteínas e lipídeos, a difusão de proteínas e outras moléculas através da membrana e a adequada divisão da membrana durante a duplicação da célula (CRISTANI et al., 2007).

2.2.3 Óleo essencial de orégano

O orégano pertence à família *Lamiaceae* (Labiatae) da qual também fazem parte o manjeriço (*Ocimum basilicul* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e a sálvia (*Salvia officinalis* L.). O gênero *Origanum* possui mais de 38 espécies destacando-se *Origanum majorana* e *Origanum vulgare* entre as mais importantes (PRELA-PANTANO; TERAMOTO; FABRI, 2009). Nativa de regiões montanhosas do sul da Europa e da Ásia ocidental, a espécie *Origanum vulgare* L. é cultivada no Brasil principalmente nas regiões sul e sudeste. Entretanto, o mercado brasileiro de orégano basicamente importa esta matéria-prima (PRELA-PANTANO; TERAMOTO; FABRI, 2009). A Turquia é o maior produtor mundial de orégano, seguida do México, Grécia e outros países mediterrâneos (GÜNDÜZ; GÖNÜL; KARAPINAR, 2010).

O OE de orégano possui atividade antimicrobiana contra

numerosos micro-organismos como bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos e leveduras (LAMBERT et al., 2001; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; LIOLIOS et al., 2009; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). A alta atividade antimicrobiana do OE de orégano é devida à sua grande concentração de monoterpenos e compostos oxigenados, como carvacrol, timol, ρ -cimeno e γ -terpineno (LIOLIOS et al., 2009).

Diversas tecnologias foram aplicadas em conjunto com óleos essenciais (ASLIM; YUCEL, 2008; ATREA et al., 2009; BARROS et al., 2009; MEXIS; CHOULIARA; KONTOMINAS, 2009a; b) com o objetivo de melhorar a inativação dos micro-organismos. Atrea et al. (2009) empregaram embalagem à vácuo e a adição de OE de orégano no armazenamento de polvos sob refrigeração. O OE de orégano foi aplicado diretamente sobre a carne nas concentrações de 0, 2000 e 4000 ppm e, então, o polvo foi embalado à vácuo. A vida de prateleira do polvo, armazenado sob refrigeração, embalado somente à vácuo foi de 9 dias, enquanto que para aqueles adicionados de 2000 e 4000 ppm, foi de 17 e 23 dias, respectivamente.

2.3 Microbiologia Preditiva

Estima-se que até 1920, na microbiologia de alimentos, aproximações qualitativas na descrição do crescimento microbiológico eram predominantes até o advento da microbiologia preditiva (MCMEEKIN et al., 2008). A microbiologia preditiva está baseada na hipótese de que o efeito de propriedades, intrínsecas ou extrínsecas, pode ser previsto por meio de modelos matemáticos derivados de estudos quantitativos dos microrganismos (NAKASHIMA; ANDRÉ; FRANCO, 2000). São exemplos de fatores intrínsecos o pH e a atividade de água; e de fatores extrínsecos temperatura, pressão e concentração de uma determinada substância.

Os modelos matemáticos que descrevem o comportamento microbiano de inativação e crescimento isotérmico podem ser classificados como modelos primários e secundários (WHITING; BUCHANAN, 1993). Os modelos primários descrevem a variação do número de micro-organismos ou outra resposta microbiana com o tempo. Os modelos secundários descrevem os parâmetros obtidos no modelo primário variam com as condições ambientais como temperatura, pressão e concentração de determinado antimicrobiano, por

exemplo.

Os modelos primários e secundários, como descrito anteriormente, são baseados em dados experimentais a condições constantes. No entanto, condições como temperatura e pH, por exemplo, nem sempre se mantêm constantes durante o processamento e armazenamento. Por isso, nos últimos anos, tem aumentado o interesse por modelos dinâmicos, ou seja, modelos que permitam prever o comportamento dos micro-organismos sob condições que variam como o tempo, principalmente sob condições não isotérmicas (MCMEEKIN et al., 2008).

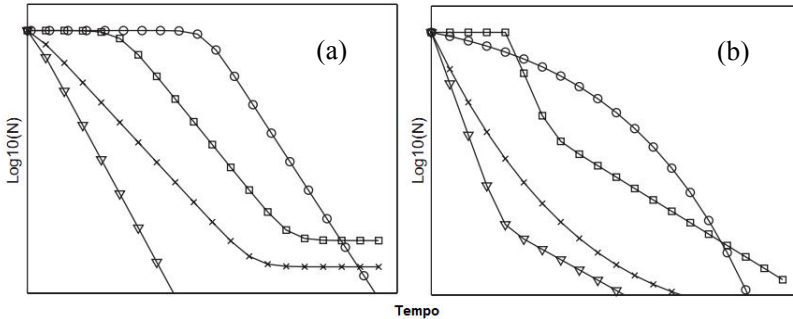
2.3.1 Modelos primários e secundários

Durante muito tempo, considerava-se que a inativação de micro-organismos era um processo que seguia o modelo cinético de primeira ordem ou modelo de Bigelow (Equação 1) (MCMKELLAR; LU, 2004). Contudo, hoje, acredita-se que esse modelo trata-se de uma exceção, e que a inativação de muitos micro-organismos não ocorre de maneira log-linear. Uma das falhas deste modelo consiste em assumir que todos os micro-organismos são completamente idênticos e que, quando expostos às altas temperaturas, todos morreriam ou seriam inativados exatamente ao mesmo tempo (PELEG, 2006).

$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -k.t \quad (1)$$

onde N_0 é a população inicial de micro-organismos em UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia por mililitro), $N(t)$ é a população no instante t (UFC/mL) e k é conhecida como o inverso do valor D , que corresponde ao tempo para reduzir a população de micro-organismos em um ciclo logarítmico.

Existem várias curvas que podem descrever a inativação de micro-organismos, conforme ilustrado na Figura 2. Estas são ajustadas aos dados experimentais de acordo com o comportamento de inativação de cada micro-organismo (GEERAERD; VALDRAMIDIS; VAN IMPE, 2005).



Fonte: Geeraerd, Valdramidis et al. (2005)

Figura 2. Curvas de inativação de micro-organismos usualmente observadas na literatura. No gráfico (a) estão representadas as curvas: (Δ) log-linear; (x) log-linear com cauda; (□) sigmoidal; (○) log-linear precedida de ombro. No gráfico (b): (Δ) bifásica; (x) côncava; (□) bifásica com ombro; (○) convexa.

Entre os modelos comumente utilizados na literatura para descrever a inativação de micro-organismos, está o modelo de Weibull (Equação 2). A grande vantagem do modelo de Weibull, proposto por Waloddi Weibull em 1936, é a simplicidade matemática e ótima flexibilidade. Esta função foi inicialmente formulada em 1933 para a modelagem de redução do tamanho de formas, conhecida como distribuição de Rosin-Rammler (PELEG, 2006).

$$\log\left(\frac{N(t)}{N_0}\right) = -\left(\frac{t}{\beta}\right)^\alpha \quad (2)$$

onde $N(t)$ é a população de micro-organismos (UFC/mL) no instante t ; N_0 a população inicial do micro-organismo (UFC/mL); t é o tempo (min); α é o fator de forma e β o fator de localização.

No modelo de Weibull, a direção da concavidade da curva de sobreviventes é uma manifestação das diferentes vias de inativação dos micro-organismos (Figura 3). Curvas com concavidades voltadas para baixo ($\alpha > 1$) retratam uma população que progressivamente diminui, e o tempo necessário para destruir a mesma fração de micro-organismos diminui com o passar do tempo. Concavidades voltadas para cima ($\alpha < 1$), formando uma cauda indicam que a população de micro-organismos contém membros que morrem rapidamente. Porém, à

medida que o processo de destruição ocorre, os sobreviventes são os mais resistentes, levando a um tempo maior de inativação (PELEG, 2006; ARAGAO et al., 2007). Uma curva linear de sobreviventes, considerada como cinética de primeira ordem, é um caso especial da equação de Weibull onde $\alpha = 1$ (MCMKELLAR; LU, 2004).

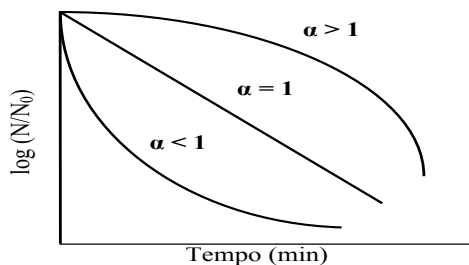


Figura 3. Curvas de sobrevivência descritas pelo modelo de Weibull com diferentes valores para o fator de forma α .

Dentre os modelos secundários de inativação, a equação de Arrhenius (Equação 3) é um dos mais utilizados para descrever o comportamento dos parâmetros de acordo com a temperatura (MCMEEKIN; ROSS, 2002). Contudo, Corradini e Peleg (2005) demonstraram que modelos empíricos, como equações exponenciais (Equação 4), podem ser utilizados para descrever a variação dos parâmetros dos modelos primários com as condições ambientais.

$$\log_e \left(\frac{k_1}{k_2} \right) = \frac{E}{R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right) \quad (3)$$

onde k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de primeira ordem nas temperaturas absolutas T_1 e T_2 (K), respectivamente; E é a energia de ativação (kJ/mol) e R a constante universal dos gases (8,314 J/K.mol) (PELEG, 2006).

$$y = a \cdot \exp(c \cdot T) \quad (4)$$

onde y é o parâmetro do modelo primário, a e c as constantes empíricas da equação e T a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

2.1.2 Modelos não-isotérmicos

Processamentos térmicos comerciais para inativação de micro-organismos e o armazenamento de alimentos raramente são isotérmicos. Os modelos isotérmicos primários e secundários podem ser utilizados para prever padrões de inativação microbiana sobre uma variedade de condições não isotérmicas (CORRADINI; PELEG, 2005). Assim, muitos pesquisadores têm desenvolvido modelos matemáticos que levam em consideração a variação da temperatura, ou de outros fatores ambientais (KOUTSOUMANIS, 2001; VALDRAMIDIS et al., 2006).

Peleg (2006) propôs um modelo não isotérmico de inativação baseado no modelo primário de inativação isotérmica de Weibull (Equação 2). Considerando uma população de micro-organismos cuja inativação isotérmica é adequadamente descrita pelo modelo de Weibull a construção do modelo não isotérmico segue os passos das equações 5 a 8. Inicialmente, a Equação 2 é reescrita como apresentada na Equação 5.

$$\text{Log}S(t) = -b(T)t^{\alpha(T)} \quad (5)$$

onde $S(t)$, a razão de sobrevivência momentânea, é igual a $N(t)/N_0$; $b(T)$, um parâmetro do modelo, igual a $1/\beta(T)^\alpha$; α é o fator de forma; β é o fator de localização, t é o tempo (min), e T é a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).

Considerando a Equação 5 como modelo primário, a taxa de inativação logarítmica isotérmica tempo-dependente é dada pela derivação desta equação, resultando na Equação 6.

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b(T)\alpha(T)t^{\alpha(T)-1} \quad (6)$$

De acordo com este modelo proposto por Peleg (2006), o tempo que corresponde a qualquer dada taxa de sobrevivência é chamado de t^* , o qual foi isolado da Equação 5, expresso pela Equação 7.

$$t^* = \left(\frac{-\text{Log}S(t)}{b(T)} \right)^{\frac{1}{\alpha(T)}} \quad (7)$$

Ao substituir a Equação 7 na Equação 6, a equação diferencial ordinária (ODE) não isotérmica é obtida, representada pela Equação 8.

Os modelos empíricos que descrevem $b(T)$ e $\alpha(T)$, são combinados com o perfil de temperatura não isotérmico $T(t)$ para produzir os termos $b(T(t))$ e $\alpha(T(t))$.

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)]\alpha[T(t)] \left\{ \frac{-\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{\alpha[T(t)]-1}{\alpha[T(t)]}} \quad (8)$$

A Equação 8 pode ser numericamente resolvida. Para tanto, deve-se fornecer ao *software* o perfil de temperaturas $T(t)$ e as equações do modelo secundário, que representam as variações de $b[T]$ e $\alpha[T]$. Como resultado, é possível prever a inativação microbiana com o tempo ($\log S(t)$ vs t), considerando variável a temperatura de processo.

Os perfis de temperatura utilizados podem, por exemplo, reproduzir processamentos térmicos aplicados na indústria. A utilização destes perfis não é apenas útil para planejar processos, mas também para assegurar a correção de falhas ocorridas nos equipamentos ou falhas humanas de onde os perfis descontínuos podem ser resultantes (PELEG, 2003). Exemplos mais comuns de sistema não isotérmico no processamento de alimentos seriam o rompimento do fornecimento de energia (Corradini e Peleg, 2005) e a variação de temperatura que ocorre dentro do tubo de retenção de trocadores de calor. Levando em consideração estas variações de temperatura ocorridas no processamento de alimentos é de extrema importância, principalmente quando se trata de determinação da vida útil dos alimentos, ou seja, variações que parecem sutis no processamento podem causar importantes alterações no que diz respeito à vida útil dos alimentos, comprometendo a segurança dos mesmos.

2.4 Referências bibliográficas

ARAGAO, G. M. F. *et al.* Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007.

ASLIM, B.; YUCEL, N. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant

- Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 602-606, 2008.
- ATREA, I. *et al.* Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 degrees C. *Food Microbiology* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 166-172, 2009.
- BAGAMBOULA, C. F. *et al.* Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S-flexneri*. *Food Microbiology* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 33-42, 2004.
- BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada N°2, de 15 de janeiro de 2007. Regulamento técnico sobre aditivos e aromatizantes. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.htm. Acesso em: 20 fev. 2011.
- BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell L. . **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. 1367p. ISBN 0943088399
- BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BARROS, J. *et al.* Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Lwt-Food Science and Technology*, v. 42, n. 6, p. 1139-1143, 2009.
- CORRADINI, M. G.; PELEG, M. Estimating non-isothermal bacterial growth in foods from isothermal experimental data. *Journal of Applied Microbiology* [S.I.], v. 99, n. 1, p. 187-200, 2005.
- CRISTANI, M. *et al.* Interaction of Four Monoterpenes Contained in Essential Oils with Model Membranes: Implications for Their Antibacterial Activity. *Journal of Food Process Engineering*, v. 55, n. 15, p. 6300-6308, 2007.

DE CLERCK, E. *et al.* Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2004.

DI PASQUA, R. *et al.* Membrane Toxicity of Antimicrobial Compounds from Essential Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.

_____. Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addition of Thymol, Carvacrol, Limonene, Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DRAGO, L.; DE VECCHI, E. Should *Lactobacillus sporogenes* and *Bacillus coagulans* Have a Future? *Journal of Chemotherapy* [S.I.], v. 21, n. 4, p. 371-377, 2009.

GEERAERD, A. H. *et al.* GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 95-105, 2005.

GUTIERREZ, J. *et al.* The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

GÜNDÜZ, G. T. *et al.* Efficacy of sumac and oregano in the inactivation of *Salmonella typhimurium* on tomatoes. *International Journal of Food Microbiology*, v. 141, n. 1-2, p. 39-44, 2010.

KOUTSOUMANIS, K. Predictive modeling of the shelf life of fish under nonisothermal conditions. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 67, n. 4, p. 1821-1829, 2001.

LAMBERT, R. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEIMANN, F. V. *et al.* Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on

microcapsules size and morphology. *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems* [S.I.], v. 29, n. 2, p. 430-436, 2009.

LIOLIOS, C. C. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 112, n. 1, p. 77-83, 2009.

LUCAS, R. *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

MALLIDIS, C. G. *et al.* Thermal treatment of aseptically processed tomato paste. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 25, n. 4, p. 442-448, 1990.

MCMEEKIN, T. *et al.* The future of predictive microbiology: Strategic research, innovative applications and great expectations. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 2-9, 2008.

MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 78, n. 1-2, p. 133-153, 2002.

MCMKELLAR, R. C.; LU, X. *Modeling Microbial Responses in Food*. 1. ed. Boca Raton: McMKellar, Robin C. Lu, Xuewen, 2004.

MEXIS, S. F. *et al.* Combined effect of an O-2 absorber and oregano essential oil on shelf-life extension of Greek cod roe paste (tarama salad) stored at 4 degrees C. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* [S.I.], v. 10, n. 4, p. 572-579, 2009a.

_____. Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 degrees C. *Food Microbiology* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 598-605, 2009b.

NAKASHIMA, S. M. K. *et al.* Revisão: Aspectos Básicos da Microbiologia Preditiva. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 3, p.41-51, 2000.

OLIVEIRA, S. C. C. *et al.* Efeito alelopático de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (Solanaceae) na germinação e crescimento de *Sesamum indicum* L. (Pedaliaceae) sob diferentes temperaturas. *Acta bot. bras.*, v. 3, n. 18, p.401-406, 2004.

OOMES, S. J. C. M. *et al.* The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *20th International ICFMH Symposium on FOOD MICRO 2006* [S.I.], v. 120, n. 1-2, p. 85-94, 2007.

OUSSALAH, M. *et al.* Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* [S.I.], v. 73, n. 2, p. 236-244, 2006.

PACHECO, C. D. P.; MASSAGUER, P. R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *Journal of Food Process Engineering*, v. 27, n. 6, p. 449-463, 2004.

PELEG, M. Calculation of the non-isothermal inactivation patterns of microbes having sigmoidal isothermal semi-logarithmic survival curves. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [S.I.], v. 43, n. 6, p. 645-658, 2003.

PELEG, Micha. . **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems** and inactivation. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 417p. ISBN 0849336457

PRELA-PANTANO, A. *et al.* O cultivo e a comercialização de orégano. 2010. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2009_2/Oregano/index.htm. Acesso em: 18 março 2011.

SANDOVAL, A. J. *et al.* Thermal-resistance of *Bacillus coagulans* in double concentrated tomato paste. *Journal of Food Science* [S.I.], v. 57, n. 6, p. 1369-1370, 1992.

SILVA, J. P. L. *et al.* Oregano essential oil: influence of the chemical composition on the inhibitory activity against *Salmonella enteritidis*. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* [S.I.], v. 30, p. 136-141, 2010.

SOYLU, E. M. *et al.* Antimicrobial activities of the essential oils of

various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* [S.I.], v. 161, n. 2, p. 119-128, 2006.

TAJKARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

VALDRAMIDIS, V. P. *et al.* Quantitative description of *Listeria monocytogenes* inactivation kinetics with temperature and water activity as the influencing factors; model prediction and methodological validation on dynamic data. *Bugdeath* [S.I.], v. 76, n. 1, p. 79-88, 2006.

VELLUTI, A. *et al.* Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B-1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 89, n. 2-3, p. 145-154, 2003.

WHITING, R. C.; BUCHANAN, R. L. A classification of models in predictive microbiology - reply. *Food Microbiology* [S.I.], v. 10, n. 2, p. 175-177, 1993.

CAPITULO 3

ACÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO SOBRE OS ESPOROS DE *BACILLUS COAGULANS*

3.1 Introdução

Esporos de *Bacillus coagulans* estão, normalmente, relacionados à deterioração de produtos vegetais processados devido à sua habilidade de germinar e crescer na faixa de pH destes produtos, de aproximadamente 4,5 (MALLIDIS et al., 1990). Os esporos deste micro-organismo apresentam elevada termorresistência, podendo sobreviver às temperaturas de processo geralmente aplicadas na indústria de alimentos. Além disso, o crescimento de *B. coagulans* em produtos vegetais enlatados causa o fenômeno *flat-sour*, uma acentuada acidificação do produto através de fermentação, sem formação de gás (LUCAS et al., 2006).

Os extratos naturais de plantas, como os óleos essenciais (OE), mostram efeito bactericida e bacteriostático contra vários micro-organismos contaminantes de alimentos (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010). Estudos sobre os efeitos antimicrobianos abordam, geralmente, a determinação da concentração mínima inibitória dos OE (KNIGHT; MCKELLAR, 2007; WECKESSER et al., 2007; ASLIM; YUCEL, 2008), a análise da ação exclusiva dos OE contra determinado micro-organismo (BARROS et al., 2009), como também o estudo da sinergia dos OE com outras tecnologias como atmosfera modificada (GOULAS; KONTOMINAS, 2007), resfriamento (MEXIS, CHOULIARA, KONTOMINAS, 2009), tratamento térmico (BELLETTI et al., 2007; BELLETTI et al., 2010), entre de outras.

Segundo Burt (2004), diferentes definições da concentração mínima inibitória (CMI) são encontradas na literatura. A CMI pode ser apontada, por exemplo, como a menor concentração resultante da manutenção ou redução da viabilidade do inóculo, ou como a menor concentração requerida para a completa inibição do micro-organismo em questão, após 48 horas de incubação (BURT, 2004). Além disso, existem outros termos que são relacionados à atividade antimicrobiana como concentração mínima bactericida (*Minimum bactericidal concentration* – MBC), concentração bactericida e concentração

bacteriostática.

A literatura aponta diferentes CMI para os óleos essenciais já explorados, visto que esta varia de acordo com o micro-organismo estudado, a análise empregada (difusão em ágar, contagem de células viáveis, análise visual, entre outras), as moléculas do OE, as propriedades extrínsecas como o pH do meio a temperatura de incubação, o tipo de meio, entre outros fatores. A Tabela 1 mostra alguns estudos referentes às CMI de óleos essenciais de orégano. A comparação entre os resultados da CMI é difícil, uma vez que o perfil químico do óleo essencial é, normalmente, diferente, e além disso, as técnicas empregadas para a determinação da CMI não são padronizadas, como pode ser observada na Tabela 1.

O objetivo deste capítulo foi determinar as moléculas majoritárias do óleo essencial de orégano, além da concentração mínima inibitória do OE contra os esporos de *B. coagulans* em meio sólido através de análise visual de crescimento. E, por fim, observar a resistência dos esporos pela ação isolada do OE em caldo nutriente (resistência química).

Tabela 1. Concentrações mínimas inibitórias de óleos essenciais de orégano.

Moléculas majoritárias	Micro-organismo / Inóculo	Metodologia	Resultados da CMI	Referência
carvacrol (73,9%), p-cimeno (7,20%), λ-terpineno (3,99%)	<i>Campylobacter</i> spp.	Diluição em meio Mueller–Hinton	<i>C.jejuni</i> = 700 ppm <i>C.lari</i> = 800 ppm <i>C.coli</i> = 800 ppm	(ASLIM; YUCEL, 2008)
não determinada	<i>E.coli</i> O157:H7 / 10 ⁶ UFC/mL	Difusão em ágar Diluição em meio Mueller–Hinton	Zona de inibição = 24,3 mm 625 ppm	(BURT; REINDERS, 2003)
não determinada	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Turbidimetria	<i>S. aureus</i> = 575 ppm <i>P. aeruginosa</i> = 1648 ppm	(LAMBERT et al., 2001)
não determinada	<i>E.coli</i> 1 mL da suspensão	Difusão em ágar	Zona de inibição = 29,5 mm	(DORMAN; DEANS, 2000)
carvacrol (67,5%), p-cimeno (9,43%), tymoquinone (3,8%)	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i> 10 ⁶ UFC/mL	Difusão em ágar	<i>S. aureus</i> = 56,0 mm <i>P. aeruginosa</i> = 7,0 mm <i>E. coli</i> = 13,50 mm	(COSGE et al., 2009)

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Micro-organismo e produção de esporos

A cepa de *Bacillus coagulans* ATCC7050 foi adquirida na

Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas/SP. Para a produção da suspensão de esporos de *B. coagulans*, um pré-inóculo foi preparado com a cultura cultivada por 24 horas a 37 °C em Caldo Nutriente (CN) (Himedia, Mumbai, Índia). A esporulação foi conduzida em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (Biolife, Milão, Itália) acrescido de 5 ppm de sulfato de manganês (Vetec, Brasil) (PACHECO; MASSAGUER, 2004), durante 10 dias a 37 °C.

Decorrido o tempo, verificou-se a obtenção de 80-90 % de esporulação através da técnica para coloração de esporos Wirtz-Conklin. Esta técnica consiste em fixar a suspensão de esporos em uma lâmina de vidro com a ajuda da chama do bico de Bunsen. Em seguida, a lâmina foi coberta com uma solução de verde de malaquita 5 % (v/v), e imediatamente levada à chama de Bunsen por aproximadamente 5 minutos. Em seguida a lâmina foi lavada com água destilada e corada com 0,5 % de Safranina por 1 minuto. Após a secagem, a lâmina foi examinada no microscópio para verificar a porcentagem de esporulação (HAMOUDA; SHIH; BAKER, 2002).

Os esporos foram coletados inundando-se a superfície das placas com água destilada estéril, seguido de raspagem com uma espátula de borracha estéril (*rubber policeman*). Os esporos coletados foram lavados cinco vezes por centrifugação (2000 x g por 15 minutos) (centrífuga QUIMIS, Q22T) e ressuspensos em água destilada estéril. A suspensão final foi estocada sob refrigeração até sua utilização.

A determinação da concentração da suspensão final foi realizada através de diluições decimais em água peptonada 0,1% estéril (Biolife, Milão, Itália). As diluições foram plaqueadas em profundidade em meio Agar Triptona Dextrosado (TDA) (Biolog, Espanha). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Marca TECNAL, TE390), a 37 °C, por dois dias. Decorrido o tempo, realizou-se a contagem dos sobreviventes, expressa em UFC/ml.

3.2.2 Óleo essencial de orégano

O óleo essencial de orégano utilizado nas análises foi gentilmente cedido por Givaudan do Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). O OE de orégano foi armazenado sob refrigeração (4 °C) ao abrigo da luz. A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada no Departamento de Química Analítica, Instituto de Química da

Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A análise foi realizada em cromatógrafo GC-MS (GC-Varian 3800, MS/MS-Varian 1200L), coluna VF5-MS (30m x 0.25mm, 0.25µm) (Varian), usando modo de injeção com divisão de fluxo a uma taxa de 1:10. A temperatura do injetor foi de 300°C. O gás de arraste foi o Hélio (He) usado a um fluxo de 1mL/min. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C (mantida por cinco minutos), aquecendo a uma taxa de 5°C por minuto até 250 °C (mantida por cinco minutos). O detector de espectrometria de massas foi utilizado em modo de varredura na faixa de 40-400 m/z (unidade de relação massa/carga). Os compostos majoritários foram identificados através de uma base de dados para produtos naturais (*Standard Reference Data Series of the National Institute of Standard and Technology -NIST - Mass-Spectral Library with Windows search program – Version 2*), onde os espectros de massa foram comparados.

3.2.3 Concentração Mínima Inibitória

Para a determinação da concentração mínima inibitória, soluções de TDA com volumes adequados do OE de orégano foram preparadas. As concentrações de óleo essencial testadas foram de 200, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 1000 e 1200 ppm. As soluções foram agitadas em agitador magnético por dez minutos e então plaqueadas em triplicata. Após a solidificação do meio nas placas, a suspensão de esporos de *B. coagulans* (10^8 UFC/mL) foi inoculada na superfície através de alças de poliestireno estéreis (PINTORE et al., 2002). Placas controle com meio de cultura, sem o OE, inoculadas e não inoculada com *B. coagulans* também foram analisadas. As placas foram incubadas a 30 °C em estufa bacteriológica (Marca TECNAL, TE390) e as análises visuais realizadas periodicamente. A CMI adotada foi a menor concentração que após o terceiro dia de incubação, dia em que o *B. coagulans* cresceu na placa controle, não apresentou crescimento visual do micro-organismo.

3.2.4 Resistência química

O meio utilizado para a resistência química foi caldo nutriente (CN), preparado com água destilada, e ajustado para a concentração de 4 °Brix com adição de glicose (Nuclear, São Paulo, Brasil), padronizado

através de refratômetro digital (Marca Reichert, AR200). O pH do caldo foi padronizado em 4,2 através da adição de solução de ácido cítrico 18 % (v/v) e mensurado com pHmetro (Marca Analion, AN2000). Os valores de pH e concentração de sólidos solúveis escolhidos visam simular uma polpa de tomate, produto em que o OE de orégano seria facilmente empregado. O CN foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos, não havendo alteração do teor de sólidos solúveis e pH após o tratamento.

Inicialmente, em um erlenmeyer o CN foi adicionado de concentrações pré-determinadas de óleo essencial de orégano, e da suspensão de esporos de *B. coagulans* e, então agitados através de um agitador magnético. Em seguida, o erlenmeyer contendo CN + OE de orégano + suspensão de esporos foi armazenado em estufa bacteriológica (Marca TECNAL, TE390) a 20 °C (BARROS et al., 2009). As concentrações de OE de orégano estudadas foram de 1000 e 20000 ppm. Não foram examinadas concentrações menores, como as estudadas na concentração mínima inibitória, pois para análises em caldos e alimentos as concentrações de óleos requeridas para a inativação de micro-organismos são maiores (BURT, 2004).

Amostras periódicas foram retiradas e diluídas em água peptonada 0,1 % estéril (Biolife, Milão, Itália) para a determinação da concentração do micro-organismo. Anteriormente à etapa de diluição, os esporos devem ser termicamente ativados como é apontado na literatura como parte do procedimento para contagem de esporos de micro-organismos (SALOMÃO, 2009). Entretanto, foi observado, em trabalhos anteriores (dados não mostrados) realizados no laboratório, que a contagem dos esporos de *B. coagulans* não alterava com a sua ativação pelo calor. Além disso, os tratamentos químicos são normalmente cessados através de algum agente neutralizante antes de ser realizada a etapa da diluição. Porém, como o óleo essencial de orégano é um agente antimicrobiano mais fraco que os demais agentes químicos, como, por exemplo, sanitizantes clorados (SALOMÃO, 2009), foi determinado que a ação antimicrobiana do OE era interrompida na diluição. Assim, as diluições foram plaqueadas em profundidade em TDA (Biolog, Espanha). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (Marca TECNAL, TE390), na temperatura de 37 °C, por dois dias. Decorrido o tempo, realizou-se a contagem dos sobreviventes, expressa em UFC/ml.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Determinação da composição química do óleo essencial de orégano

A análise do óleo essencial de orégano utilizado mostrou as concentrações relativas das moléculas apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2. Compostos identificados no óleo essencial de orégano com os tempos de retenção e concentração relativa (%) detectados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

Tempo de retenção (min)	Componente	Concentração relativa (%)
7,40	α -pineno	1,59
7,97	canfeno	0,29
8,92	β -pineno	0,36
9,30	β -mirceno	2,74
9,83	γ -limonene	0,15
9,91	α -felandreno	0,19
10,27	α -terpineno	1,01
10,65	ρ -cimeno	12,27
10,73	D-limoneno	0,27
10,84	eucaliptol	0,16
11,76	γ -terpineno	8,63
12,60	terpinoleno	0,21
13,13	linalol	3,43
15,21	isoborneol	0,32
15,47	borneol	0,62
15,71	4- terpineol	0,47
18,99	timol	2,91
19,56	carvacrol	59,44
22,50	cariofileno	2,07
23,44	α -cariofileno	0,26
26,58	oxido de cariofileno	1,04

A análise das moléculas do OE de orégano identificou 20 componentes, totalizando 98,44% dos componentes totais do óleo. Carvacrol (59,44%) foi o componente majoritário, seguido do ρ -cimeno (12,27%), γ -terpineno (8,63%), linalol (3,43%), timol (2,91%) e β -mirceno (2,74%).

O OE de orégano analisado por Barros et al. (2009) também apresentou o carvacrol como componente majoritário, como concentração relativa de aproximadamente 58%, seguido de ρ -cimeno (11%). Assim como a caracterização de OE de orégano investigado por Aslim e Yucel (2008) encontrou 74% de carvacrol, 7,20% de ρ -cimeno e 4% de γ -terpineno. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os reportados na literatura para este OE.

3.3.2 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)

A Tabela 3 mostra o dia em que ocorreu o crescimento visual para as diferentes concentrações de óleo essencial de orégano. A concentração mínima inibitória do OE de orégano foi de 300 ppm, visto que foi a menor concentração que, após o terceiro dia de incubação das placas a 30 °C, não apresentou crescimento visual do micro-organismo.

Tabela 3. Dia em que ocorreu o crescimento visual do *Bacillus coagulans* nas placas com diferentes concentrações de OE de orégano.

Óleo essencial (ppm)	Crescimento visual (dias)
0	3
200	3
300	7
350	7
400	9
450	13
500	13
600	13
1000	22
1200	22

Poucos estudos são encontrados na literatura referentes à ação de óleos essenciais sobre *B. coagulans*. O OE cítrico, que tem como principais moléculas limoneno, linalool e citral, resultou na total inibição do crescimento de *B. coagulans* na concentração de 20 ppm. Neste mesmo estudo, a fase lag da bactéria foi de 8,83 horas, sem a adição do conservante, para 30,72 e 63 horas, com a adição de 5, 15 e 20 ppm do OE, respectivamente (BEVILACQUA; CORBO; SINIGAGLIA, 2010).

A CMI do OE de *Origanum vulgare* L., também tendo como moléculas majoritárias carvacrol (68,06 %) e p-cimeno (15,91 %), para *Bacillus cereus* ATCC11778, *Escherichia coli* ATCC8739 e *Staphylococcus aureus* ATCC6538 foi, respectivamente, de 20000, 40000 e 20000 ppm (SOUZA et al., 2008).

Para as bactérias, também contaminantes de alimentos, *Campylobacter jejuni*, *C. lari* e *C. coli*, a CMI do óleo essencial de *Origanum minutiflorum* foi de 700, 800 e 800 ppm respectivamente. Este OE apresentava igualmente como moléculas majoritárias carvacrol (73,9%), p-cimeno (7,20%), γ -terpineno (3,99%) e borneol (2,41%) (ASLIM; YUCEL, 2008).

3.3.3 Resistência química

O efeito do OE de orégano nas concentrações de 1000 e 20000 ppm na viabilidade celular dos esporos de *B. coagulans* são mostrados na Figura 1.

As duplicatas de 1000 ppm apresentaram resultado semelhante nas 100 primeiras horas de armazenamento, onde os esporos tiveram uma redução de 1 ciclo logarítmico. Entretanto, nas horas subsequentes, o comportamento do micro-organismo foi divergente. Após 600 horas (25 dias) de exposição a 1000 ppm de OE, os esporos da bactéria reduziram em aproximadamente 1,5 ciclos logarítmicos. Enquanto que, para a duplicata de 1000 ppm, a concentração do micro-organismo oscilou e não apresentou a mesma inativação que a primeira réplica.

Em 300 horas, na concentração de 20000 ppm, ocorreu a inativação máxima da bactéria, por volta de 1 ciclo. Decorrido esse tempo, o comportamento da bactéria também foi oscilatório. Durante o experimento com a concentração de 20000 ppm, foi observada visualmente a separação das fases (caldo nutriente e OE). Entretanto, esse fenômeno não pode ser visualmente percebido na concentração mais baixa. A separação de fases na concentração mais elevada pode explicar a semelhança entre os resultados obtidos a 1000 e 20000 ppm. O OE não entrou em contato com o micro-organismo, pois não estava corretamente solubilizado na mesma fase em que este se encontrava. Possivelmente, se o erlenmeyer estivesse sob agitação, o contato seria efetivo. Entretanto, o objetivo era simular um alimento, adicionado de OE de orégano como conservante, que estivesse armazenado à temperatura ambiente.

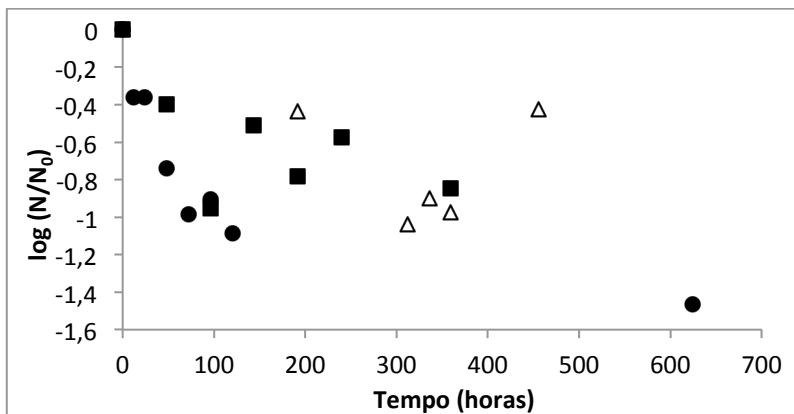


Figura 4. Dados experimentais da resistência química de *B. coagulans* em CN (4 °Brix, pH de 4,2) com (●) 1000 ppm, (■) duplicata de 1000 ppm e (Δ) 20000 ppm de óleo essencial de orégano.

Os resultados da resistência química não foram, portanto, conclusivos, visto que os dados experimentais foram incoerentes, e, além disso, o contato entre o *B. coagulans* e o OE não pôde ser comprovado. Assim, foi decidido não dar continuidade a esta etapa do trabalho, e, além disso, as futuras análises, mostradas no capítulo 4, foram realizadas com o OE emulsionado com o objetivo de assegurar o contato efetivo do OE com o micro-organismo.

3.4 Conclusão

A ação do OE de orégano contra os esporos da bactéria termoresistente *B. coagulans* foi comprovada através dos resultados obtidos para a CMI e resistência química. O OE de orégano apresentou o perfil de moléculas esperado, estando de acordo com a literatura. Entre as moléculas majoritárias estão os terpenos carvacrol e timol que são apontados na literatura como moléculas de alto poder antimicrobiano.

Os resultados obtidos mostram que os esporos da bactéria são sensíveis à ação do OE e que a concentração mínima inibitória é de 300 ppm. Além disso, os experimentos para a CMI mostram que a germinação e o crescimento dos esporos pode ser inibido por até 22 dias na concentração de 1200 ppm, à temperatura de 30 °C. Estudos futuros podem ser realizados em temperaturas mais baixas, com o objetivo de

verificar a ação do OE em produtos que, por exemplo, são mantidos sob refrigeração.

A resistência química, mesmo não apresentando resultados conclusivos, teve importância, pois mostrou a necessidade de se homogeneizar o óleo essencial em futuras análises. Além disso, foi possível confirmar, mesmo que quantitativamente, que o OE de orégano exerce uma ação antibacteriana nos esporos de *B. coagulans*. A partir destes resultados, será estudada a ação conjunta do OE de orégano e de outra tecnologia de conservação de alimentos, como a aplicação de calor, e a ação do óleo essencial de orégano contra *B. coagulans*.

3.5 Referências

ASLIM, B.; YUCEL, N. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 602-606, 2008.

BARROS, J. C. *et al.* Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Lwt-Food Science and Technology* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 1139-1143, 2009.

BELLETTI, N. *et al.* Antimicrobial activity of aroma compounds against *Saccharomyces cerevisiae* and improvement of microbiological stability of soft drinks as assessed by logistic regression. *Applied and Environmental Microbiology* [S.I.], v. 73, n. 17, p. 5580-5586, Sep 2007.

_____. Modeling of combined effects of citral, linalool and beta-pinene used against *Saccharomyces cerevisiae* in citrus-based beverages subjected to a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 136, n. 3, p. 283-289, Jan 2010.

BEVILACQUA, A.; CORBO, M. R.; SINIGAGLIA, M. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Eugenol, Limonene, and Citrus Extract against Bacteria and Yeasts, Representative of the Spoiling Microflora of Fruit Juices. *Journal of Food Protection* [S.I.], v. 73, n. 5, p. 888-894, May 2010.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BURT, S. A.; REINDERS, R. D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157 : H7. *Letters in Applied Microbiology* [S.I.], v. 36, n. 3, p. 162-167, 2003.

COSGE, B. *et al.* Chemical Compositions and Antibacterial Activities of the Essential Oils from Aerial Parts and Corollas of *Origanum acutidens* (Hand.-Mazz.) Ietswaart, an Endemic Species to Turkey. *Molecules* [S.I.], v. 14, n. 5, p. 1702-1712, 2009.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* [S.I.], v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

GOULAS, A. E.; KONTOMINAS, M. G. Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry* [S.I.], v. 100, n. 1, p. 287-296, 2007.

HAMOUDA, T.; SHIH, A. Y. ; BAKER, J. R. A rapid staining technique for the detection of the initiation of germination of bacterial spores. *Letters in Applied Microbiology* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 86-90, 2002.

KNIGHT, K. P.; MCKELLAR, R. C. Influence of cinnamon and clove essential oils on the D- and z-values of *Escherichia coli* O157 : H7 in apple cider. *Journal of Food Protection* [S.I.], v. 70, n. 9, p. 2089-2094, 2007.

LAMBERT, R. *et al.* A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LUCAS, R. *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

MALLIDIS, C. G. *et al.* Thermal treatment of aseptically processed

tomato paste. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 25, n. 4, p. 442-448, 1990.

MEXIS, S. F. *et al.* Combined effect of an oxygen absorber and oregano essential oil on shelf life extension of rainbow trout fillets stored at 4 degrees C. *Food Microbiology* [S.I.], v. 26, n. 6, p. 598-605, 2009.

PACHECO, C. D. P.; MASSAGUER, P. R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *Journal of Food Process Engineering*, v. 27, n. 6, p. 449-463, 2004.

PINTORE, G. *et al.* Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, n. 1, p. 15-19, 2002.

SOUZA, E. L. *et al.* Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 28, n. 2, p.418-422, 2008.

TAJKARIMI, M. M. *et al.* Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

WECKESSER, S. *et al.* Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine* [S.I.], v. 14, n. 7-8, p. 508-516, 2007.

CAPÍTULO 4

Os resultados, obtidos para a concentração mínima inibitória e resistência química, mostrados no Capítulo 3, basearam a metodologia utilizada para a determinação da resistência termoquímica explanada neste capítulo. Devido aos resultados da resistência química, para as análises termoquímica o óleo essencial de orégano foi emulsionado. Além disso, a resistência termoquímica foi iniciada com a concentração mínima inibitória encontrada anteriormente, igual a 300 ppm, e posteriormente estendida à concentrações próximas.

Este capítulo foi organizado na forma de artigo científico, cujo título é: “*Bacillus coagulans* spores inactivation through the application of oregano essential oil and heat”. As curvas de inativação apresentadas nos gráficos são aquelas que apresentaram comportamento mais termoresistente, as demais curvas estão no Anexo 1.

***Bacillus coagulans* SPORE INACTIVATION THROUGH THE APPLICATION OF OREGANO ESSENTIAL OIL AND HEAT**

Abstract

The present study evaluated the effect of thermal and thermochemical inactivation of *Bacillus coagulans* spores in nutrient broth (NB) adjusted at 4 °Brix and pH of 4.2. Thermal treatments included temperatures of 95, 97, 100 and 103 °C. At the highest temperature, 0.77 minute was needed to reduce the population of spores in 6 log. Thermochemical treatment consisted of heat application in NB added with oregano essential oil (EO). First, temperature was fixed at 100 °C and EO concentration varied among 250, 300, 350, 400, 500 and 1000 ppm. Thermochemical treatment with oregano EO at 100 °C and 400 ppm was the lowest concentration to reach 6 decimal reductions, taking about 1.6 minutes, significantly ($P < 0.01$) different from thermal treatment at 100 °C, about 3 minutes. Hence, EO concentration was fixed at 400 ppm and temperature varied among 90, 95, 97 and 100 °C. Only at 90 °C was the time to reach 6 decimal reductions, about 16.3 minutes, significantly ($P < 0.01$) different from the other temperatures. These findings indicate that oregano EO may be used to render *B. coagulans* spores more susceptible to the lethal effect of heat.

Keywords: *Bacillus coagulans*, oregano essential oil, isothermal inactivation, Weibull model.

4.1 Introduction

Bacillus coagulans, a non-pathogenic, facultative anaerobic, thermotolerant and acidophilic bacteria, is an important food spoilage microorganism. Particularly in industries such as canned vegetables acidified to pH values between 4 and 4.5, as tomato products (pH of 4.1-5.0), this bacterium is frequently found, since spores of *B. coagulans* are able to grow and germinate at pH values as low as 4 (DE CLERCK et al., 2004; LUCAS et al., 2006). Moreover, this bacterium is capable of increasing the pH to values that may allow for germination of surviving *Clostridium botulinum* spores (VIEDMA et al., 2010). Besides, *B. coagulans* has been causing considerable economic loss for the food industry because of the “flat sour spoilage,” which is a drastic acidification of media due to the production of lactic acid without gas formation (LUCAS, et al., 2006). For official protocols to validate low acidity foods heat sterilization, *C. botulinum* spores is the target microorganism and the temperature reference is 121.1 °C. Nevertheless, heat resistant mesophilic spore formers such as *Bacillus sporothermodurans* (PERIAGO et al., 2004) and *B. coagulans* may often determine the stability of foods and safety of industrial processes.

Lately, the food industry has been concerned about the consequences of chemical preservatives in consumers' health, and also consumer demand for safe and high-quality foods is increasing. Therefore, the research for natural preservatives is facing an increase of new approaches and technologies. Particularly, essential oils (EO) from herbs and spices have demonstrated antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms (BURT, 2004; TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010), principally oregano essential oil. The addition of 2000 and 4000 ppm of oregano EO in fresh octopus stored under vacuum packaging and at 4 °C, increased the shelf life in 8 and 14 days, respectively (ATREA et al., 2009).

Mathematical models are developed and analyzed in predictive microbiology in order to describe microbial behavior (inactivation,

growth and survival) as a function of environmental factors (JANSSEN et al., 2008) such as temperature, pH and preservative concentrations, among others. The mathematical model based on the Weibull distribution has attracted attention due to its simplicity and flexibility (FERNANDEZ et al., 2007). Different shapes of inactivation curves can be described through the Weibull model: log-linear, convex and concave (PELEG, 2006).

The aim of this study was to determine the thermal (temperature) and thermochemical (temperature + EO) inactivation of *Bacillus coagulans* spores in nutrient broth (4 °Brix and pH of 4.2) under isothermal conditions.

4.2. Materials and methods

4.2.1 Strain and preparation of inocula

Bacillus coagulans ATCC7050 was pre-cultivated in Nutrient Broth (Himedia, India) at 37 °C for 24 hours. The microorganism sporulation was performed in Petri dishes containing Nutrient Agar (Biolife, Italy) supplemented with 5 ppm of manganese sulfate (Vetec, Brazil) (PACHECO; MASSAGUER, 2004). Then, plates were incubated over 10 days at 37 °C; previous studies, carried out in our laboratory, showed that these conditions resulted in the most resistant *B. coagulans* spores. After incubation, spores were collected by flooding the dish surfaces with sterile distilled water, followed by scratching them with a rubber policeman. The collected spores were sedimented by centrifugation (2000x g, 15 min) and washed with sterile distilled water. The centrifugation and washing steps were accomplished five times. The final spore suspension was stored under refrigeration until used. The population density was determined by serial dilutions in 0.1 % peptone water, then dilutions were pour plated in Tryptone Dextrose Agar (TDA) (Biolife, Italy). The plates were incubated at 37 °C for 48 hours to determine the initial number of bacterial spores expressed in CFU/mL.

4.2.2 Oregano essential oil

The EO was provided by Givaudan Brazil Ltda. (Sao Paulo, Brazil). EO main compounds were identified by GC-MS analysis. The analysis was performed on GC-MS chromatograph (Varian GC-3800, MS/MS Varian 1200L), VF5-MS column (30 m x 0.25 mm, 0.25 μ m) (Varian) using split injection mode with a flow ratio of 1:10. The operating conditions: injector temperature was 300 °C, carrier gas was helium (He) at a flow rate of 1 mL/min, initial column temperature was 60 °C (maintained for five minutes), warming at a rate of 5 °C/min up to 250 °C (maintained for five minutes). The detector and mass spectrometry in scan mode was in the range of 40-400 m/z. The compounds were identified through a database for natural products (Standard Reference Data Series of the National Institute of Standards and Technology-NIST - Mass-Spectral Library with Windows search program - Version 2), where the mass spectra were compared. Quantification of the relative amount of the individual components was performed according to the area percentage method.

4.2.3 Emulsion procedure

Oregano EO was emulsified in order to improve its solubility. Soy lecithin (Alfa Aesar) was used as surfactant. Initially, the organic phase (EO + soy lecithin) was stirred magnetically for 50 minutes, at a ratio of 4% (m/m) of soy lecithin/OE. Then, the aqueous phase (NB + distilled water) was added to the organic phase, at a rate of 4 g of aqueous phase per gram of organic phase. Then they were agitated for 20 minutes on a magnetic stirrer. After that, the solution underwent sonification by using an ultrasound (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, 400 W) for 4 min with 70% amplitude. The emulsion was stored under refrigeration until used.

4.2.4 Heat medium

Nutrient broth (NB) was prepared with distilled water, and adjusted to 4 °Brix by adding glucose (Nuclear, Brazil), standardization was performed with the help of a digital refractometer (AR200, Reichert). The medium pH was standardized at 4.2 by adding citric acid

solution at 18% (v/v) and measured through a pHmeter (AN2000, Analion). Soluble solid concentration and pH values were chosen aiming at simulating tomato pulp, the product in which the oregano EO can be easily employed. The heat medium was autoclaved at 121 °C for 15 minutes. There was no change in soluble solids and pH after this treatment.

4.2.5 Thermal and thermochemical inactivation

Inactivation tests were performed by using sealed TDT tubes (8 x 120 mm glass tubes with wall thickness of 1 mm) (STUMBO, 1978). Contact time between *B. coagulans* and oregano EO before heat treatment was standardized at 15 minutes. NB containing appropriate concentrations of homogenized EO emulsion was inoculated with spores of *B. coagulans* and the contact time started being recorded immediately.

Initial concentration of bacterial spores was, approximately, 10^6 spores/mL. Over the contact time, TDT tubes were filled with 2.0 mL of the solution (NB + EO + spore suspension); afterwards, they were sealed by gas flame (LPG/O₂). After the contact time, TDT tubes were submerged into a thermostatic bath containing silicone oil. The come-up-time for the temperature in the TDT tubes has been estimated to be 2 minutes. Then, TDT tubes were individually removed at predetermined times and immediately cooled in an ice bath. After that, TDT tubes were aseptically opened with the aid of a diamond glass cutter. Population density was determined by serial dilutions in 0.1 % peptone water, and dilutions were pour plated in TDA. The plates were incubated at 37 °C for 48 hours to determine the number of bacterial spores expressed in CFU/mL. The procedure for thermal inactivation was identical to the thermochemical one except for oregano EO addition. In order to test EO emulsion efficiency, a thermochemical resistance with 500 ppm of EO at 100 °C was performed with the non-emulsified OE.

For thermal inactivation, tested temperatures were 95, 97, 100 and 103 °C. In the case of thermochemical treatment, the studied temperatures were 95 and 100 °C, and the EO concentrations were 250, 300, 350, 400, 500 and 1000 ppm. Subsequently, the EO concentration was fixed at 400 ppm and the tested temperatures were 90, 95, 97 and

100 °C.

4.2.6 Mathematical modeling

For primary modeling, the Weibull distribution function (Equation 1) was adjusted to the experimental data through the program Matlab® (The MathWorks Inc, Natick, USA).

$$\log \frac{N(t)}{N_0} = -\left(\frac{t}{\beta}\right)^\alpha \quad (1)$$

where N_0 (CFU/mL) is the initial number of spores in the heat-treated population and $N(t)$ (CFU/mL) is their number after time t (min); β is known as the location factor and α is the shape factor.

A general secondary model was used to describe the influence of factors, such as temperature and EO concentration, on inactivation parameters. The exponential (Equation 2) and the linear equation (Equation 3) were applied as secondary model through Excel software (Microsoft®).

$$y = a.\exp(c.x) \quad (2)$$

$$y = a.x + c \quad (3)$$

where a and b are empirical parameters of the equation; x corresponds to values of temperature (°C) or EO concentration (ppm); and y corresponds to values of β and α .

4.2.7 Statistical analyses

In order to check the quality of the Weibull distribution fit, the following statistical parameters were calculated: correlation coefficient (R^2), root mean square error (MSE) and standard deviation (SD). The correlation coefficient (R^2) measures the fraction of variation over the mean that is explained by a model. The higher the value ($0 < R^2 < 1$), the better the prediction by the model is (JIN et al., 2009). The mean square error (Equation 4) presents the modeling error for data, i.e., how close

the predicted values are to observed values (ZIMMERMANN et al., 2011). The standard deviation (SD) of the estimated parameters was calculated with Equation 5.

$$MSE = \frac{\sum (v_{observed} - v_{predicted})^2}{n - p} \quad (4)$$

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (v_{observed} - \bar{v})^2}{n - 1}} \quad (5)$$

The value of experimental data is given by $v_{observed}$; the value estimated by the model is given by $v_{predicted}$; \bar{v} is the mean value; n is the number of experimental observations and p the number of parameters in the model.

4.3. Results

4.3.1 Oregano EO components

Table 1 shows the 21 identified components for oregano EO by GC-MS analyses. Carvacrol (59.44%) is the major component, followed by ρ -cymene (12.27%), γ -terpinene (8.63%), linalool (3.43%) and thymol (2.91%). These molecules represent 86.67% of the constituents of oregano EO. According to literature, EO can be composed of more than 60 individual components, where the major components represent around 85 % of the EO, and other components exist only as a trace (BURT, 2004).

Oregano EO is characterized mainly by phenolic compounds, such as carvacrol and thymol, and their precursors, γ -terpinene and ρ -cymene (ASLIM; YUCCEL, 2008). Thus, the chemical profile shown in Table 1 is analogous to those established in literature, where carvacrol was found to be the major component of oregano EO (ASLIM; YUCCEL, 2008; BARROS et al., 2009; LIOLIOS et al., 2009). For instance, oregano EO studied by Barros et al. (2009) has carvacrol, ρ -cymene, and γ -terpinene as main components.

Table 1. Compounds identified in the essential oil of oregano with retention times and relative concentration (%) detected by gas chromatography / mass spectrometry.

Compound	Retation time (min)	Concentration (%)
α -Pinene	7,40	1,59
Canphene	7,97	0,29
β -Pinene	8,92	0,36
b-Myrcene	9,30	2,74
γ -Limonene	9,83	0,15
α -Phelandrene	9,91	0,19
α -Terpinene	10,27	1,01
p-Cymene	10,65	12,27
D-Limonene	10,73	0,27
Eucalyptol	10,84	0,16
γ -Terpinene	11,76	8,63
terpinolene	12,60	0,21
Linalool	13,13	3,43
Isoborneol	15,21	0,32
Borneol	15,47	0,62
4- Terpinenol	15,71	0,47
Thymol	18,99	2,91
Carvacrol	19,56	59,44
Caryophyllene	22,50	2,07
α -Caryophyllene	23,44	0,26
Caryophyllene oxide	26,58	1,04

4.3.2 Thermal inactivation of *B.coagulans* spores

Figure 1 displays the fit of the Weibull distribution function to thermal inactivation experimental data ($\log(N/N_0)$ versus time) at 95, 97, 100 and 103 °C. Table 2 shows the parameter values of location factor (β) and shape factor (α), and the time to reach 6 decimal reductions (t6D) with their respective SE, correlation coefficient (R^2) and mean square error (MSE) for thermal inactivation. The Weibull

model showed good fit to experimental data, since MSE was closer to 0, and correlation coefficient was near to 1. Parameters β and α , and t6D decrease when temperature increases. Figure 2 shows the temperature dependence of the Weibull model parameters and the t6D. The parameter α did not show any temperature dependence since it oscillates. The continuous line in Figure 2 (b) and (c) shows the fit of Equations 6 and 7 and 8 (linear equations) to the experimental data for temperature dependence of β and t6D, respectively.

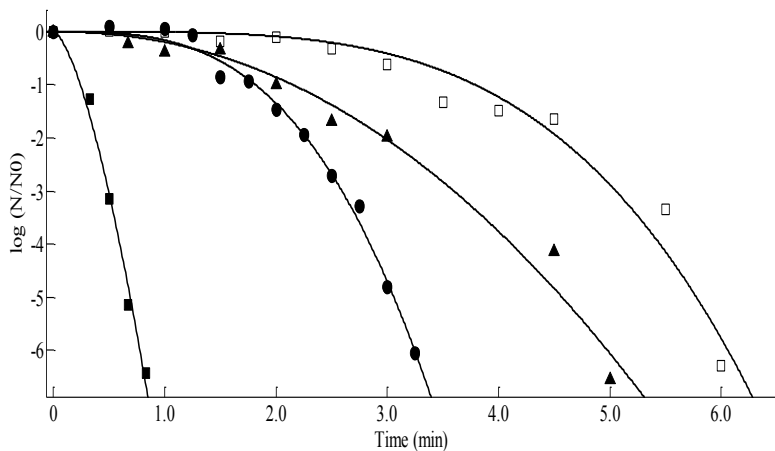


Figure 1. Isothermal inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) without oregano EO at (□) 95 °C, (▲) 97 °C, (●) 100 °C and (■) 103 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.

Table 2. Estimated parameter values of the Weibull model and the time to reach 6 decimal reductions of *B. coagulans* spore inactivation by temperature.

Temperature (°C)	α^a	β^b	t6D ^c	R ² ^d	MSE ^e
95	3.814	3.789	6.061	0.9619	0.146
97	2.136	2.152	4.979	0.9765	0.129
100	3.086	1.816	3.245	0.9928	0.033
103	1.534	0.2417	0.777	0.9892	0.101

^a α , shape factor

^b β , location factor

^c t6D, time to reach 6 decimal reduction

^d R² the correlation coefficient

^e MSE, mean square error

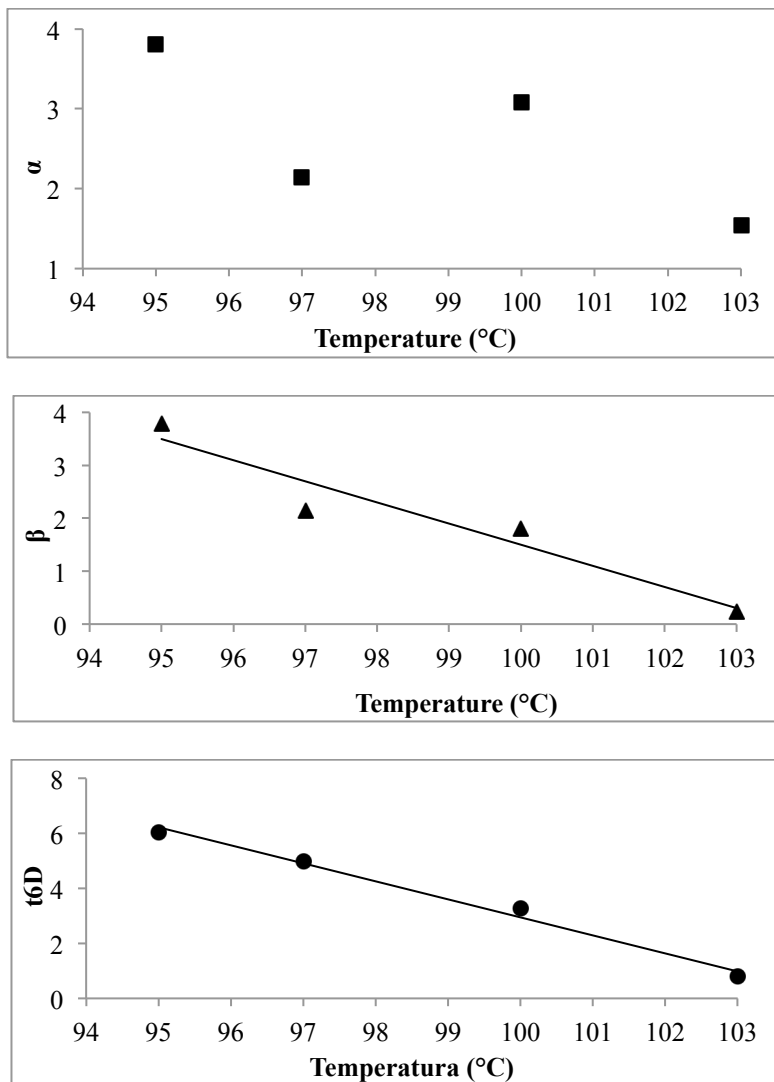


Figure 2. Temperature dependence of the parameters (a) α and (b) β and (c) t_{6D} for thermal inactivation of *B. coagulans*

$$\beta(T) = -0.4T + 41.43 \quad R^2 = 0.92 \quad (7)$$

$$t6D(T) = -0,65T + 68.5 \quad R^2 = 0.99 \quad (8)$$

4.3.3 Thermochemical inactivation of *B.coagulans* spores

First, in order to test the efficiency of EO emulsion, a thermochemical resistance with 500 ppm of EO, concentration chosen randomly, was performed with non-emulsified EO and emulsified with soy lecithin. Soy lecithin was chosen as an emulsifier because it is widely used in the food industry (STEINMACHER, 2010). Also, lecithin is recognized as GRAS (Generally Recognized as Safe) by the FDA (American Food and Drug Administration) (OKE; JACOB; PALIYATH, 2010). In Figure 3, it is possible to compare the inactivation data at 100 °C with non-emulsified EO and emulsified EO. It can be concluded that emulsified EO was more efficient than pure EO. The time to reach 6 decimal reductions with pure EO was 2.8 minutes, whereas with the EO emulsion it was 1.4 minutes. Thus, the next analyses were accomplished with emulsified EO.

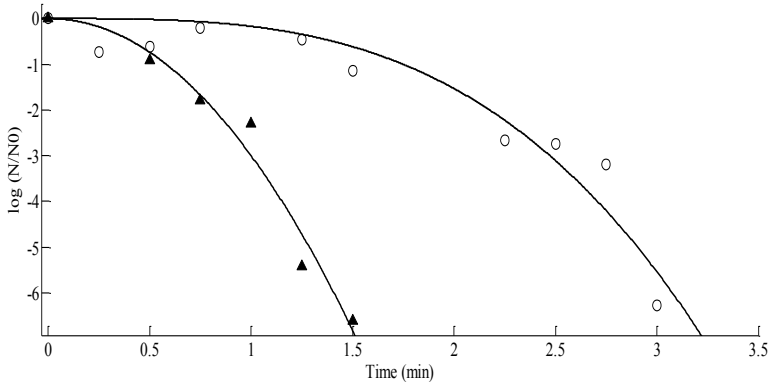


Figure 3. Isothermal inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 100 °C with 500 ppm of non-emulsified EO (○), and emulsified with soy lecithin (▲). The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.

Secondly, a thermochemical resistance with 500 ppm of oregano EO at 95 °C was accomplished in order to define the temperature for the next inactivation tests. Figure 4 compares the inactivation curves of thermal resistance at 95 and 100 °C with the thermochemical resistance at 500 ppm at the same temperatures. It is clear that at 100 °C the EO has a strong antibacterial activity. Some studies have reported a positive relationship between the heat treatment and antimicrobial efficiency of natural preservatives: The temperature increases the bioactivity of the molecules by increasing their vapor pressures and their ability to solubilize in the membranes of microorganisms (BELLETTI et al., 2007; LANCIOTTI et al., 2004). Thus, the temperature of 100°C was chosen for the next inactivation test. The temperature of 103 °C was not chosen because spores died quickly at this temperature without EO addition.

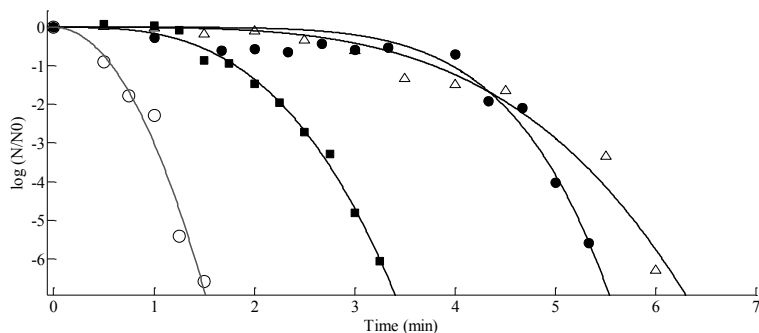


Figure 4. Inactivation of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 95 °C (Δ) without EO, (\bullet) with 500 ppm of EO, and at 100 °C (\blacksquare) without, (\circ) with 500 ppm of EO. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.

Figure 5 displays the fit of the Weibull distribution function to the experimental data of thermochemical inactivation of *B. coagulans* at 100 °C and EO concentration of 0, 250, 300, 350, 400, 500 and 1000 ppm. At any EO concentration, spore inactivation is faster than without oregano EO. Moreover, at intermediate concentrations inactivation follows a logical sequence, the higher the concentration, the faster the death of bacterium spores is. Curves in Figure 5 show the behavior of the most thermo resistant between the curves from duplicate trials for each concentration, other curves are found in Annex 1.

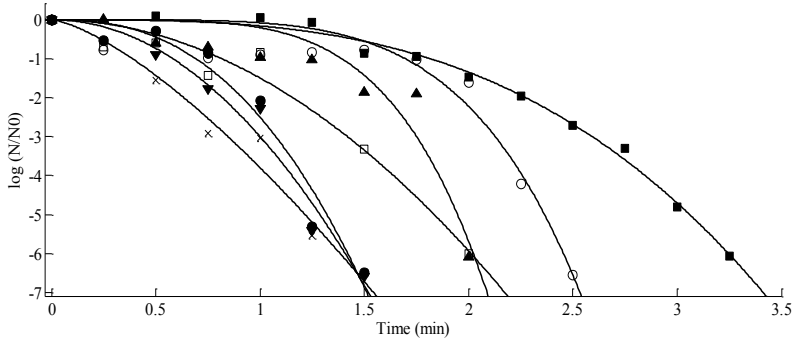


Figure 5. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) at 100 °C (■) without EO, and with (○) 250, (▲) 300, (□) 350, (●) 400, (▼) 500 and (x) 1000 ppm of oregano EO. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.

Table 3 summarizes the mean values of the shape factor (α), the location factor (β), and the time to reach 6 decimal reductions ($t6D$), with their standard deviation, at 100 °C. For the thermochemical resistance at 300 and 350 ppm, the mean value of $t6D$ was the same; these concentrations reduced the $t6D$ in around 1.0 min from the thermal resistance without EO. The concentration of 400 ppm resulted in a reduction of approximately 1.4 min and the concentration of 500 ppm in 1.9 min in the $t6D$ from the thermal resistance without EO. However, the concentration of 400 ppm was chosen to continue the experiment with different temperatures since the organoleptic impact in a food product can be lower than at 500 ppm. Subsequently, the thermochemical resistances were carried out with the fixed EO concentration of 400 ppm and different temperatures. The Figure 6 shows the EO concentration dependence of the $t6D$, it is possible to observe that the $t6D$ decreases with the EO concentration until 500 ppm. Since, at 1000 ppm, spores were inactivated more slowly than at 500 ppm.

Table 3. Estimated parameter values of the Weibull model, for each duplicate with the respective mean and standard deviation, for the inactivation of *B. coagulans* spores at 100 °C and different EO concentrations.

EO (ppm)	$\alpha^a \pm SD^d$	$\beta^b \pm SD^d$	$t6D^c \pm SD^d$ (min)
0	3.05 ± 0.05	1.71 ± 0.15	3.08 ± 0.23
250	5.07 ± 0.32	1.65 ± 0.07	2.35 ± 0.15
300	5.43 ± 0.89	1.43 ± 0.05	2.00 ± 0.04
350	1.77 ± 0.31	0.72 ± 0.14	1.99 ± 0.03
400	2.67 ± 0.25	0.85 ± 0.23	1.66 ± 0.34
500	2.05 ± 0.04	0.50 ± 0.11	1.20 ± 0.29
1000	1.32 ± 0.13	0.35 ± 0.05	1.38 ± 0.00

^a α , shape factor, mean of 2 replicate experiments

^d β , location factor, mean of 2 replicate experiments

^c $t6D$, time to reach 6 decimal reduction (min), mean of 2 replicate experiments

^d SD , standard deviation of the parameters values

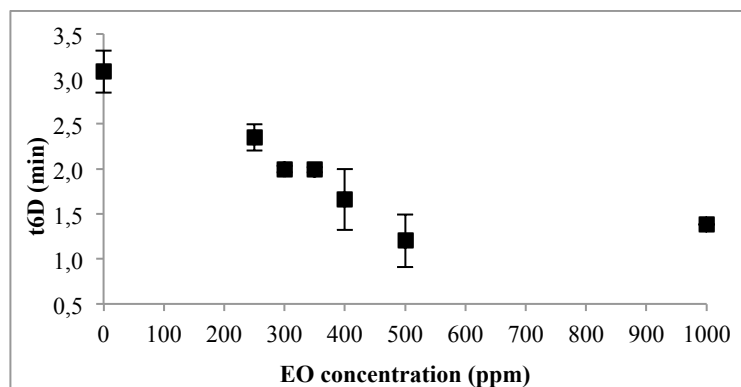


Figure 6. EO concentration dependence of $t6D$ for the thermochemical resistance at 100 °C.

Subsequently, the thermochemical resistances were carried out with the fixed EO concentration of 400 ppm and different temperatures. Fits of the Weibull model to the experimental data of thermochemical inactivation of *B. coagulans* at 400 ppm of oregano EO and at 90, 95, 97 and 100 °C are shown in Figure 7. Data in Figure 7 show the behavior of the most thermo resistant curve between the curves in duplicate trials for each temperature, other results are found in Annex 1.

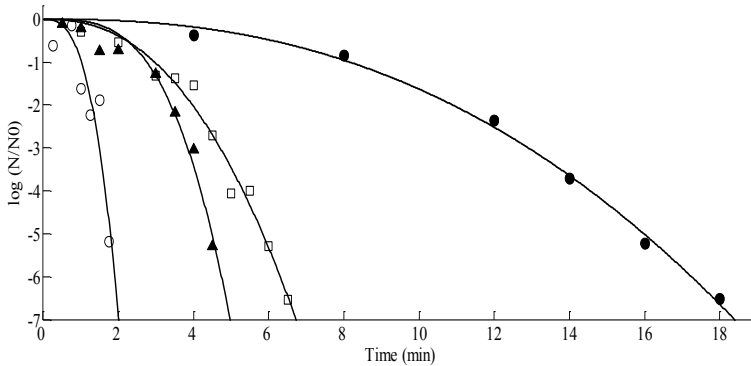


Figure 7. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution to the experimental data.

For the thermochemical resistance at 400 ppm, mean values of shape factor (α), location factor (β), and time to reach 6 decimal reductions ($t6D$), with their standard deviation, are shown in Table 4. Temperature dependence of $\alpha(T)$, $\beta(T)$ and $t6D(T)$ are shown in Figure 8 (a), (b) and (c), respectively.

Table 4. Estimated mean values of parameters of the Weibull model and the $t6D$, with the respective standard deviation, for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO and different heat temperatures.

Temperature (°C)	$\alpha^a \pm SD^d$	$\beta^b \pm SD^d$	$t6D^c \pm SD^d$ (min)
90	2.62 ± 0.33	8.10 ± 0.08	16.16 ± 1.54
95	2.56 ± 0.27	2.89 ± 0.10	5.85 ± 0.64
97	2.72 ± 0.81	2.20 ± 0.78	4.28 ± 0.66
100	2.67 ± 0.25	0.85 ± 0.23	1.66 ± 0.34

^a α , shape factor, mean of 2 replicate experiments

^b β , location factor, mean of 2 replicate experiments

^c $t6D$, time to reach 6 decimal reduction (min), mean of 2 replicate experiments

^d SD, standard deviation of the parameters values

The non-dependence of the parameter α with temperature can be visually seen in Figure 8 (a), which shows that its value virtually does not change with temperature. On the other hand, parameter β and $t6D$ decreased with temperature. Figure 8 (b) and (c) show the fit of secondary models, Equation 9 and 10 respectively, to the experimental data for temperature dependence of β and $t6D$.

$$\beta(T) = 3.10^9 \exp(-0.21.T) \quad R^2 = 0.98 \quad (9)$$

$$t6D(T) = 8.10^9 \exp(-0.22.T) \quad R^2 = 0.98 \quad (10)$$

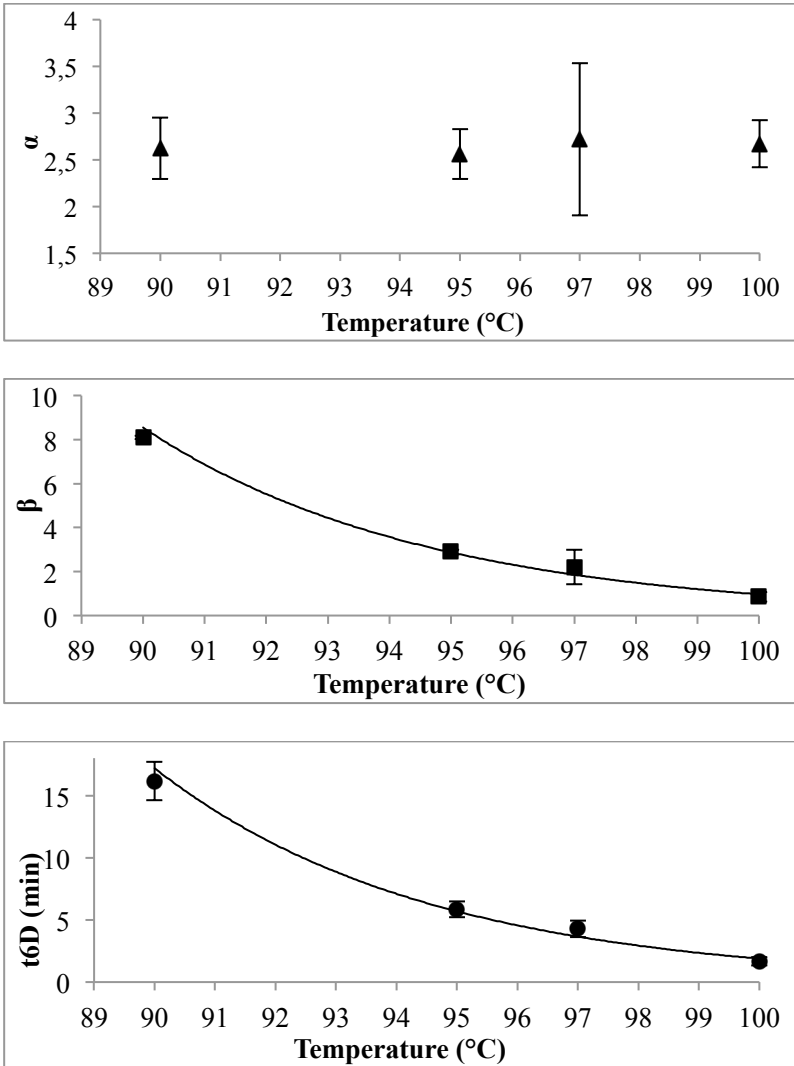


Figure 8. Temperature dependence of parameters (a) α and (b) β and (c) t_{6D} of *B. coagulans* with 400 ppm. Figure b and c show the fit of secondary models, Equations 9 and 10, respectively, to the experimental data.

As α does not vary with temperature, the Weibull model with a fixed α was fitted to the thermochemical experimental data. Some studies had already worked with the Weibull model with a fixed α (PERIAGO et al., 2004; VAN BOEKEL, 2002) achieving good results. The mean value of α shown in Table 4, equal to 2.65, was used to recalculate β and $t6D$. Figure 9 exhibits the inactivation curves generated through the Weibull model with parameter α fixed (2.65) for temperatures of 90, 95, 97 and 100 °C with 400 ppm of EO. The new mean values for parameter β and time to reach 6 decimal reductions ($t6D$), with their standard deviation, with constant α (2.65) and EO concentration (400 ppm) are shown in Table 5.

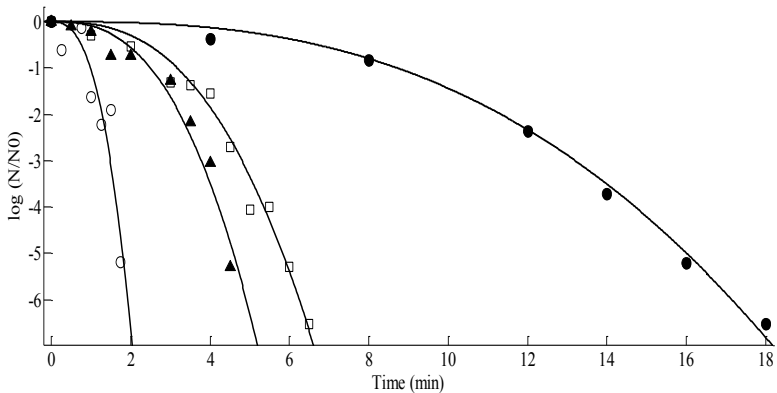


Figure 9. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull distribution with a fixed parameter α to the experimental data.

Table 5. Estimated mean values of β and $t6D$ from the Weibull model with fixed parameter α (2.65), with the respective standard deviation, for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO and different temperatures.

Temperature (°C)	$\beta^a \pm SD^c$	$t6D^b \pm SD^c$ (min)
90	8.22 \pm 0.7	16.17 \pm 1.4
95	2.97 \pm 0.3	5.83 \pm 0.6
97	2.21 \pm 0.4	4.34 \pm 0.8
100	0.85 \pm 0.2	1.67 \pm 0.36

^a β , location factor, mean of 2 replicate experiments

^b $t6D$, time to reach 6 decimal reduction (min), mean of 2 replicate experiments

^c SD, standard deviation of the parameters values

Figure 10 shows the dependence on temperature of the parameter β and the $t6D$ for the Weibull model with fixed and varying α at 400 ppm of oregano EO.

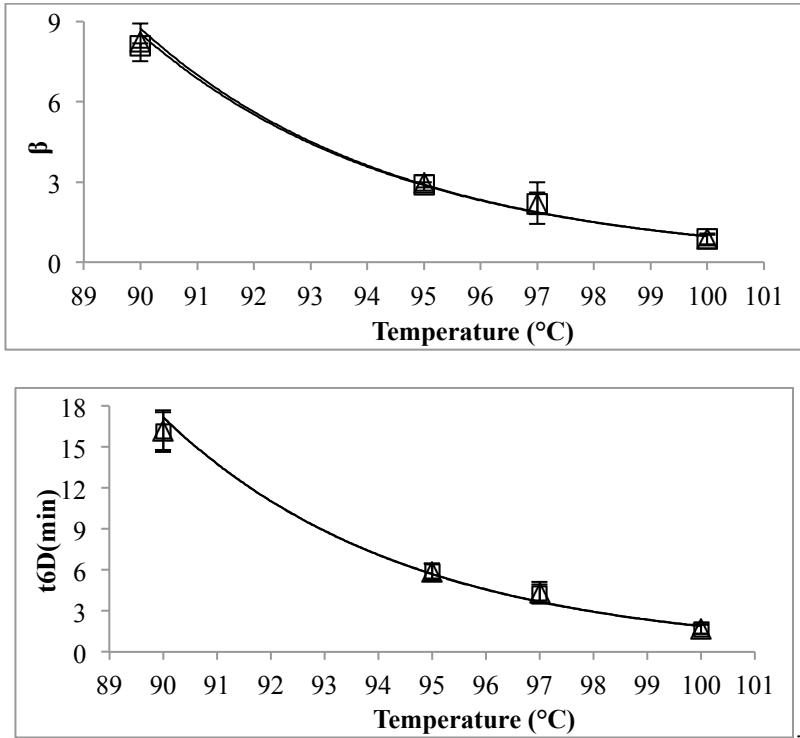


Figure 10. The temperature dependence of the parameters (a) β and (b) $t6D$ from the Weibull model with (Δ) fixed and (\square) varying α , of *B. coagulans* with 400 ppm described by Equation 2.

Modeling with a fixed α did not significantly vary the values of β and $t6D$, as can be seen in Figure 9, between 95 and 100 °C, similar to in the secondary model. Equation 2 showed a good fit to β and $t6D$, as can be visually seen in Figure 10 and also through the R^2 value. Equations 7 and 8 show the secondary model for the temperature dependence of β and $t6D$, respectively.

$$\beta(T) = 4.10^9 \exp(-0.2.T) \quad R^2 = 0.98 \quad (7)$$

$$t6D(T) = 7.10^9 \exp(-0.2.T) \quad R^2 = 0.97 \quad (8)$$

4.4. Discussion

In this study, the relationship between temperature and oregano essential oil concentration in the resistance of *B. coagulans* spores was investigated. These particular variables were explored regarding their influence on the degree of microbial inactivation. Due to quality and sensorial reasons, it is really important to find an optimal time and temperature combination for food heating process. Addition of natural food-compatible additives could decrease optimal time and temperature combinations (JUNEJA; HWANG; FRIEDMAN, et al., 2010; JUNEJA; THIPPAREDDI; FRIEDMAN, 2006).

The literature suggests a positive interaction for thermochemical treatments involving heat and natural preservatives, such as essential oils and their major molecules (KARATZAS et al., 2000; PERIAGO et al., 2006; SOMOLINOS et al., 2010). The mild heat treatment, unable to prevent growth or achieve inactivation, causes damage to microorganisms' cells and thus increase their susceptibility to antimicrobial activity of natural preservatives. For instance, application of mild heat treatment at 55 °C was not enough to prevent the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in non-carbonated fruit juice (BELLETTI et al., 2007; BELLETTI et al., 2010). However, heat treatment at 55 °C for 16 minutes with concentrations above 100 ppm of citral, a molecule present in some essential oils, resulted in a probability of 90 % of bottles not being contaminated with the fungus. Moreover, in juice added with 500 ppm of citron EO, where the citral molecule is present, a heat treatment of just 3 minutes was needed to prevent the growth of this microorganism (BELLETTI et al., 2007; BELLETTI et al., 2010). When carvacrol and thymol were combined at 0.6 mM each with thermal treatment at 90 °C for 25 min, the growth of *Bacillus megaterium* in a culture medium was inhibited for at least seven days, while when only the heat treatment was applied the lag phase was only 5.6 hours (PERIAGO et al., 2006).

As shown in Figures 1, 3-5, 7 and 9, inactivation curves could be adequately fitted by the Weibull model. The time to reach 6 decimal reductions (t_{6D}), a microbial reduction usually considered sufficient for pasteurization, decreases with the increase of temperature and EO concentration. At 103 °C without EO, t_{6D} resulted in the lowest value, followed by the inactivation at 100 °C with 500 ppm, 1000 ppm and 400 ppm. Since at 1000 ppm the death of spores is slower than at 500 ppm, *B. coagulans* may be affected only up to a certain EO

concentration. A possible explanation is that at higher concentrations the broth is already saturated with EO, so the antimicrobial action of oregano EO does not increase with its addition, and probably the surplus EO does not come into contact with the microorganism. Juneja, Hwang and Friedman (2010) found a similar behavior related to *Salmonella* inactivation. The average inactivation rate at 60 or 65°C of this microorganism was not significantly different in ground beef added with 5000 and 10000 ppm.

Even though the Weibull model has an empirical nature, a connection can be made with physiological effects (VAN BOEKEL, 2002). All inactivation curves described in this study by the Weibull model had shown a downward concavity ($\alpha > 1$). The shape factor larger than 1 indicates that remaining spores become increasingly damaged, and probably the continued exposure results in accumulated damage (PELEG, 2006; VAN BOEKEL, 2002). This also means that it takes a progressively shorter time to destroy the same fraction of *B. coagulans* spore survivors as the survival ratio decreases (ARAGAO et al., 2007). The location factor β is usually considered as a measure of microorganism resistance to treatment and decreases with temperature (UNLUTURK et al., 2010).

The Weibull model with a fixed location factor (α) showed a good fit to the thermochemical experimental data. Hence, the Weibull model with a fixed location factor, equal to 2.65, could be used to model the nonlinear inactivation curves shown with 400 ppm at different temperatures. Van Boekel (2002) analyzed the temperature dependence of the two parameters α and β from 55 case studies taken from literature. In the majority of examples, shape factor was larger than 1, and no significant relation with the temperature could be found, whereas the location factor (β) was temperature dependent in all examples.

This study provides experimental evidence that oregano essential oil enhances the sensitivity of *B. coagulans* to heat treatment. These results are in agreement with results reported by literature where the antimicrobial activity of essential oils is well documented for other microorganisms. It is important to note that this study was done in a static method (TDT tubes), which does not take into account factors such as shear stress or temperature variations. Besides that, it has generally been found that a greater concentration of antimicrobials is needed to achieve the same effects in foods (PERIAGO et al., 2006), thus trials would need to be performed prior to drawing any conclusions to be applied directly in the food industry.

4.5 References

ARAGAO, G. M. F. *et al.* Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, v. 119, n. 3, p. 243-257, 2007.

ASLIM, B.; YUCEL, N. In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, v. 107, n. 2, p. 602-606, 2008.

ATREA, I. *et al.* Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 degrees C. *Food Microbiology* [S.I.], v. 26, n. 2, p. 166-172, 2009.

BARROS, J. C. *et al.* Interference of *Origanum vulgare* L. essential oil on the growth and some physiological characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. *Lwt-Food Science and Technology* [S.I.], v. 42, n. 6, p. 1139-1143, 2009.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

DE CLERCK, E. *et al.* Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2004.

FERNANDEZ, A. *et al.* Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* [S.I.], v. 24, n. 4, p. 372-379, 2007.

GEERAERD, A. H.; VALDRAMIDIS, V. P.; VAN IMPE, J. F. GInaFiT, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survivor curves. *International Journal of Food Microbiology*, v. 102, n. 1, p. 95-105, 2005.

JANSSEN, M. *et al.* Inactivation model equations and their associated

parameter values obtained under static acid stress conditions cannot be used directly for predicting inactivation under dynamic conditions. *5th International Conference on Predictive Modelling in Foods* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 136-145, 2008.

JIN, T. *et al.* Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science and Technology* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 367-372, 2009.

LIOLIOS, C. C. *et al.* Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, v. 112, n. 1, p. 77-83, 2009.

LUCAS, R. *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

OKE, M., JACOB, J. K., & PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Research International*, v. 43, n. 1, p. 232-240, 2010.

PACHECO, C. D. P.; MASSAGUER, P. R. Biological Validation Of Tomato Pulp Continuous Heat Process. *Journal of Food Process Engineering*, v. 27, n. 6, p. 449-463, 2004

PELEG, M. . **Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems:** models for predicting growth and inactivation. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006. 417p. ISBN 0849336457

PERIAGO, P. M. *et al.* *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 17-23, 2006.

_____. Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 95, n. 2, p. 205-218, 2004.

SHAN, B. *et al.* The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 117, n. 1, p. 112-119, Jun 2007.

STEINMACHER, Fernanda Regina. **Síntese de nanopartículas de Poli(Acetato de Vinila) via polimerização em miniemulsão.** 1 v. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2010.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing.** Segunda. ed. New York, 1978.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, v. 21, n. 9, p. 1199-1218, 2010.

UNLUTURK, S. *et al.* Modeling inactivation kinetics of liquid egg white exposed to UV-C irradiation. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 142, n. 3, p. 341-347, 2010.

VALDRAMIDIS, V. P. *et al.* Identification of non-linear microbial inactivation kinetics under dynamic conditions. *5th International Conference on Predictive Modelling in Foods* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 146-152, 2008.

VAN BOEKEL, M. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 74, n. 1-2, p. 139-159, 2002.

VIEDMA, P. M. *et al.* Effect of polythene film activated with enterocin EJ97 in combination with EDTA against *Bacillus coagulans*. *Lwt-Food Science and Technology* [S.I.], v. 43, n. 3, p. 514-518, 2010.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *Lwt-Food Science and Technology* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 239-243, 2011.

CAPÍTULO 5

A concentração de 400 ppm, escolhida no capítulo 4 como a melhor opção, entre as concentrações testadas, para a redução da resistência térmica dos esporos, foi utilizada neste capítulo para a resistência termoquímica não isotérmica dos esporos de *B. coagulans*. As resistências termoquímicas isotérmicas com 400 ppm de óleo essencial de orégano na faixa de temperaturas de 90 a 100 °C foram utilizadas para estabelecer o modelo preditivo não-isotérmico. A equação de Weibull utilizada no Capítulo 4 ($\log S(t) = -(t/\beta)^\alpha$), foi utilizada neste capítulo na forma proposta por Peleg (2006) que apresenta a equação de Weibull como apresentada na Equação (a) onde $b = (1/\beta)^\alpha$.

$$\text{Log}S(t) = -b(T)t^{\alpha(T)} \quad (\text{a})$$

Este capítulo foi organizado na forma de artigo científico, cujo título é: “Estimation of the thermochemical non-isothermal inactivation behaviour of *Bacillus coagulans* spores in nutrient broth added with oregano essential oil”. As curvas de inativação apresentadas nos gráficos são aquelas que apresentaram comportamento mais termoresistente, as demais curvas estão no Anexo 1.

ESTIMATION OF THE THERMOCHEMICAL NON-ISOTHERMAL INACTIVATION BEHAVIOR OF *Bacillus coagulans* SPORES IN NUTRIENT BROTH ADDED WITH OREGANO ESSENTIAL OIL

Abstract: *Bacillus coagulans* spores, in nutrient broth with 4 °Brix and pH of 4.2 supplemented with 400 ppm of oregano essential oil (EO), were heat treated at various constant temperatures in the range of 90 and 100 °C. The resulting nonlinear semi-logarithmic survival curves were described by the Weibull model with a fixed parameter α : $\log S(t) = b(T)t^{\alpha}$ where $S(t)$ is the momentary survival ratio $N(t)/N_0$, and $b(T)$ is the parameter for which temperature dependence was described by empirical mathematical models (secondary model). Two non-isothermal temperature profiles were chosen, temperatures ranging from 90 to 95 °C every 1 minute during 13.5 minutes; and from 90 to 95 °C for 5 minutes at each temperature totaling 10 minutes. The non-isothermal temperature profiles $T(t)$ were expressed algebraically with a

sinusoidal equation. Thus $b(T)$ can be transformed into a function of time, i.e., $b[T(t)]$. If the momentary inactivation rate primarily depends on the momentary temperature and survival ratio, then the survival curve under non-isothermal conditions can be constructed by solving a differential equation, as suggested by Peleg (2006). The applicability of the non-isothermal model to *B. coagulans* spore inactivation was compared with experimental data obtained in two temperature profiles. There was a match between predicted and observed survival curves for both experiments. This leads to the conclusion that, in the case of *B. coagulans* spores in the tested media with oregano essential oil, survival during thermochemical non-isothermal inactivation can be predicted through the proposed model.

Keywords: *Bacillus coagulans*, oregano essential oil, non-isothermal inactivation, Weibull model.

5.1 Introduction

Heat treatment is the most common method for food preservation. The main goal of this treatment in the food industry, in order to project a microbiologically safe process, is to promote the microbial inactivation during a thermal treatment. Most of the industrial processes include non-isothermal heating up phases and temperature fluctuations during the process (PELEG, 2006). Microbial responses under isothermal conditions may differ from the ones observed under dynamic conditions, compromising, thus, the process safety (MILLER et al., 2010). Even though the majority of studies related to microbial inactivation were carried out under isothermal conditions, in recent years the literature has reported works on dynamic models, i.e., models that allow predicting microorganism death under variable temperature conditions (CONESA et al., 2003; MILLER et al., 2010; PERIAGO et al., 2006; VALDRAMIDIS et al., 2006).

Traditionally, to develop a non-isothermal predictive model, for either inactivation or growth, two steps are required (VALDRAMIDIS et al., 2008). First, kinetic parameters of a model describing the inactivation of microorganisms according to time, the so called primary model, are estimated for at least four isothermal temperatures. Afterwards, the influence of temperature on the inactivation primary parameters is described by secondary models. Finally, primary and

secondary models are used to simulate microorganism inactivation under dynamic temperature conditions. To validate the dynamic model obtained, experimental data are compared to model prediction. If predicted and measured results are close or similar to each other, it can be concluded that the parameters derived from isothermal inactivation are useful to predict the inactivation under non-isothermal conditions (DOLAN, 2003; DOLAN; YANG; TRAMPEL, 2007; VALDRAMIDIS et al., 2008).

Bacillus coagulans is an important food spoilage microorganism. This thermotolerant spore-forming bacteria is able to germinate at pH values as low as 4, so it is often isolated from acid canned vegetables (DE CLERCK et al., 2004; LUCAS et al., 2006). *B. coagulans* is responsible for the flat sour spoilage in canned products, which is a drastic acidification of media due to the production of lactic acid without gas formation (LUCAS et al., 2006).

Oregano essential oil (EO) and other essential oils derived from spices and herbs have had their antimicrobial activities tested against a wide range of microorganisms inoculated in food products or broth. Oregano EO has been tested: (a) in ground beef against *Salmonella* (JUNEJA; HWANG; FRIEDMAN, 2010); (b) in meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere conditions against *Listeria monocytogenes* (TSIGARIDA; SKANDAMIS; NYCHAS, 2000); (c) in chitosan films against *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* (PELISSARI et al., 2009); (d) in an active food packaging against *E. coli* and *S. aureus* (BECERRIL et al., 2007); (e) in carrot broth against *B. cereus* (VALERO; SALMERON, 2003); among many other studies. No studies describing the antimicrobial action of oregano EO against *B. coagulans* was found in the consulted literature.

The objective of this study was to validate the prediction of the thermochemical inactivation of *B. coagulans* spores in nutrient broth with 400 ppm of oregano EO under variable temperature, using the dynamic model proposed by Peleg (2006). The obtained model was compared to experimental data under two temperature profiles. To achieve this goal, the inactivation curves of *B. coagulans* spores in nutrient broth with 400 ppm of oregano EO under four different temperatures (90, 95, 97 and 100 °C) were fitted with the Weibull model and a secondary model was used to represent the temperature dependence of inactivation parameters.

5.2 Theoretical background

The Weibull model (Equation 1) can describe survival curves of many bacterial spores and cells (CORRADINI; NORMAND; PELEG, 2008; FERNANDEZ et al., 2007; VAN BOEKEL, 2002) under isothermal conditions.

$$\text{Log}S(t) = -b(T)t^{\alpha(T)} \quad (1)$$

where $S(t)$, the momentary survival ratio, is equal to $N(t)/N_0$; N_0 (CFU/mL) is the initial number of spores in the heat-treated population, and $N(t)$ (CFU/mL) is the number of spores after time t (min); b is a parameter of the model, α is known as the shape factor, and T is the temperature ($^{\circ}\text{C}$).

Previous research showed that the parameter α does not vary with temperature, as shown in literature (CORRADINI; NORMAND; PELEG, 2008; VAN BOEKEL, 2002). Thus, the fitting of the Weibull model described in this study was done with a fixed value of α . The influence of the temperature or essential oil concentration on parameter b was described by an exponential equation (Equation 2).

$$b(T) = a.\exp(c.T) \quad (2)$$

where a and c are empirical parameters of the equation; T is the temperature ($^{\circ}\text{C}$).

Peleg (2006) has proposed a non-isothermal model for microorganism inactivation that had a good fit with the Weibull primary model. The derivate of the isothermal Weibull model (Equation 1), with respect to time, is shown in Equation 3:

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b(T).\alpha.t^{\alpha-1} \quad (3)$$

The time that corresponds to the survival ratio at any given moment, determined as t^* , is the inverse of Equation 1 and is shown in Equation 4:

$$t^* = \left(\frac{-\text{Log}S(t)}{b(T)} \right)^{\frac{1}{\alpha}} \quad (4)$$

The empirical $b(T)$ model was combined with the temperature profile models of the non-isothermal treatments to produce the corresponding $b(T(t))$. Replacing the time t in Equation 3 by t^* (Equation 4) and the constant temperature T by the treatment's temperature history $T(t)$, provides the non-isothermal inactivation rate equation (Equation 5).

$$\frac{d \log S(t)}{dt} = -b[T(t)] \alpha \left\{ \frac{-\log S(t)}{b[T(t)]} \right\}^{\frac{\alpha-1}{\alpha}} \quad (5)$$

This differential equation can be solved numerically by using any mathematical software.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Strain and preparation of inocula

Bacillus coagulans ATCC7050 was pre-cultivated in Nutrient Broth (Himedia, India) at 37 °C for 24 hours. The microorganism sporulation was performed in Petri dishes containing Nutrient Agar (Biolife, Italy) supplemented with 5 ppm of manganese sulfate (Vetec, Brazil) (PACHECO; MASSAGUER, 2004). Then, plates were incubated over 10 days at 37 °C; previous studies, carried out in our laboratory, showed that these conditions resulted in the most resistant *B. coagulans* spores. After incubation, spores were collected by flooding the dish surfaces with sterile distilled water, followed by scratching them with a rubber policeman. The collected spores were sedimented by centrifugation (2000x g, 15 min) and washed with sterile distilled water. The centrifugation and washing steps were accomplished five times. The final spore suspension was stored under refrigeration until used. The population density was determined by serial dilutions in 0.1 % peptone water, then dilutions were pour plated in Tryptone Dextrose Agar (TDA) (Biolife, Italy). The plates were incubated at 37 °C for

48 hours to determine the initial number of bacterial spores expressed in CFU/mL.

5.3.2 Oregano essential oil

The EO was provided by Givaudan Brazil Ltda. (Sao Paulo, Brazil). Oregano EO was emulsified in order to improve its solubility in the medium of the analyses (nutrient broth). Soy lecithin (Alfa Aesar) was used as surfactant. Initially, the organic phase (EO + soy lecithin) was stirred magnetically for 50 minutes, at a ratio of 4% (m/m) of soy lecithin/OE. Then, the aqueous phase (NB + distilled water) was added to the organic phase, at a rate of 4 g of aqueous phase per gram of organic phase. Then they were agitated for 20 minutes on a magnetic stirrer. After that, the solution underwent sonification by using an ultrasound (Fisher Scientific, Sonic Dismembrator Model 500, 400 W) for 4 min with 70% amplitude. The emulsion was stored under refrigeration until used.

5.3.3 Heat medium

Nutrient broth (NB) was prepared with distilled water, and adjusted to 4 °Brix by adding glucose (Nuclear, Brazil), standardization was performed with the help of a digital refractometer (AR200, Reichert). The medium pH was standardized at 4.2 by adding citric acid solution at 18% (v/v) and measured through a pHmeter (AN2000, Analion). Soluble solid concentration and pH values were chosen aiming at simulating tomato pulp, the product in which the oregano EO can be easily employed. The heat medium was autoclaved at 121 °C for 15 minutes. There was no change in soluble solids and pH after this treatment.

5.3.4 Thermochemical inactivation under isothermal and non-isothermal conditions

Inactivation tests were performed by using sealed TDT tubes (glass tubes of 8 x 120 mm with wall thickness of 1 mm) (STUMBO, 1978). Contact time between *B. coagulans* and oregano EO before heat

treatment was standardized at 15 minutes. The heating medium, containing appropriate concentrations of homogenized EO emulsion, was inoculated with spores of *B. coagulans*, and the contact time started being recorded immediately. The oregano EO concentration was chosen as 400 ppm for all test, according to previous research.

Initial concentration of bacterial spores was, approximately, 10^6 CFU/mL. Over the contact time, TDT tubes were filled with 2.0 mL of the solution (NB + EO + spore suspension), then they were sealed by gas flame (LPG/O₂). After the contact time, TDT tubes were submerged into a thermostatic water bath. The come-up-time for the temperature in the TDT tubes has been estimated to be 2 minutes. Then, TDT tubes were individually removed in predetermined times and immediately cooled in an ice bath.

Two water baths were used; each bath at a temperature of the inactivation condition. The tubes were placed in an iron grid and displaced between the baths according to predetermined times. A thermocouple was placed inside a sealed TDT, and its recovery temperature was the one used to determine the non-isothermal temperature profile.

TDT tubes were aseptically opened with the aid of a diamond glass cutter. Population density was determined by serial dilutions in 0.1% peptone water, and dilutions were pour plated in TDA. The plates were incubated at 37 °C for 48 h to determine the number of bacterial spores expressed in CFU/mL.

The isothermal inactivations, with EO concentration fixed at 400 ppm, were performed at 90, 95, 97 and 100 °C. For the non-isothermal inactivations with 400 ppm of EO, two different temperature profiles were studied. In profile 1 the temperature ranged from 90-95 °C every 1 minute for 13.5 minutes, and in profile 2 from 90-95 °C for 5 minutes at each temperature in a total of 10 minutes. During the experiments, temperatures were recorded every 5 seconds by thermocouples attached to a data acquisition system (Agilent System Acquisition 34970a).

5.3.5 Data processing

Equation 1 was fitted to experimental isothermal inactivation curves at 90, 95, 97 and 100 °C through the program Matlab® (The MathWorks Inc, Natick, USA). Equation 2 was adjusted to the

experimental data of parameter $b(T)$ values related to the temperature, through the software Excel (Microsoft®).

The temperature profiles during non-isothermal inactivation, obtained with the data acquisition system, were described by a sinusoidal equation, as given by Equation 6, through the program Matlab® (The MathWorks Inc, Natick, USA).

$$T(t) = a_1 \cdot \sin(b_1 \cdot t + c_1) + a_2 \cdot \sin(b_2 \cdot t + c_2) + \dots + a_8 \cdot \sin(b_8 \cdot t + c_8) \quad (6)$$

where $T(t)$ is the temperature profile (°C) at time t , and a_i , b_i and c_i are the model parameters.

The expressions $b(T)$ and $T(t)$, then calculated, were combined to produce the $b[T(t)]$ term for each non-isothermal profile. The resulting $b[T(t)]$ was then inserted into Equation 5. The program Matlab® (The MathWorks Inc, Natick, USA) was used to solve the dynamic Weibull-type model (Equation 5) by means of an ode15s solver. The equation was solved numerically and compared to the experimental inactivation curves.

5.3.6 Statistical analyses

In order to check the quality of the fits, the following statistical parameters were calculated: correlation coefficient (R^2) and mean square error (MSE). The correlation coefficient (R^2) measures the fraction of variation over the mean that is explained by a model. The higher the value ($0 < R^2 < 1$), the better the prediction by the model is (Jin, Zhang, Hermawan & Dantzer, 2009). The mean square error (Equation 7) shows the modeling error for data, i.e., how close the predicted values are to observed values (Zimmermann, Miorelli, Massaguer & Aragao, 2011).

$$MSE = \frac{\sum (v_{observed} - v_{predicted})^2}{n - p} \quad (7)$$

The value of experimental data is given by $v_{observed}$; the value estimated by the model is given by $v_{predicted}$; while n is the number of experimental observations and p is the number of parameters in the model.

5.4 Results

Figure 1 shows the isothermal inactivation curves of *Bacillus coagulans* at 90, 95, 97 and 100 °C with 400 ppm of oregano EO, fitted by the Weibull model with a fixed α (2.65). The value of 2.65 is the mean value of α for the Weibull model with varying α , according to previous research. The literature shows in distinct studies (Corradini, Normand & Peleg, 2008; Periago, van Zuijlen, Fernandez, Klapwijk, ter Steeg, Corradini et al., 2004; van Boekel, 2002) that the value of parameter α does not vary considerably with temperature and it can be considered constant. Each survival curve at different temperatures is represented by the most thermoresistant curve. Table 1 shows the mean value and the standard deviation of the inactivation parameter b obtained by the Weibull model with a fixed α .

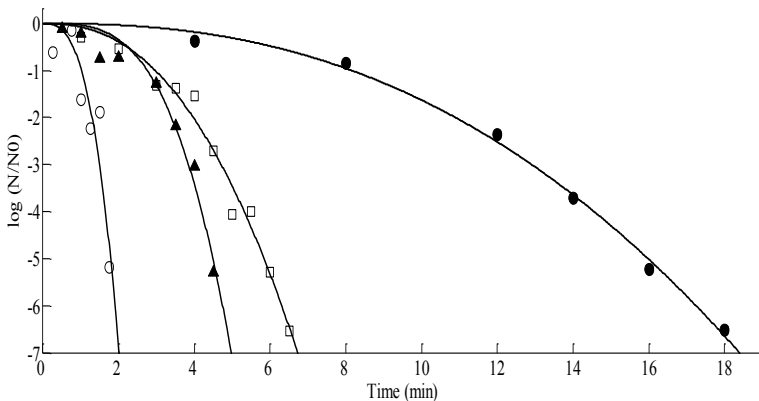


Figure 11. Experimental inactivation isothermal curves of *B. coagulans* in NB (4 °Brix, pH of 4.2) with 400 ppm of oregano EO at (●) 90 °C, (□) 95 °C, (▲) 97 °C, and (○) 100 °C. The continuous line represents the fit of the Weibull model with a fixed parameter α (2.65) to the experimental data.

Table 6. Mean values and standard deviation of the inactivation parameter b from the Weibull model with fixed α (2.65), for inactivation of *B. coagulans* spores with 400 ppm of oregano EO at different heat temperatures.

Temperature (°C)	$b \pm SD$
90	0.004 \pm 0.001
95	0.057 \pm 0.015
97	0.133 \pm 0.063
100	1.71 \pm 0.94

The Weibull model with a fixed location factor (α) showed a good fit to the experimental data as can be visually observed in Figure 1. The temperature dependence of $b(T)$ and the fit of the exponential equation as its model is shown in Figure 2. Equation 7 had a good fit to the experimental values of b as can be seen both visually and through the R^2 value next to 1.

$$b(T) = 2.10^{-26} \exp(-0.6T) \quad R^2 = 0.98 \quad (7)$$

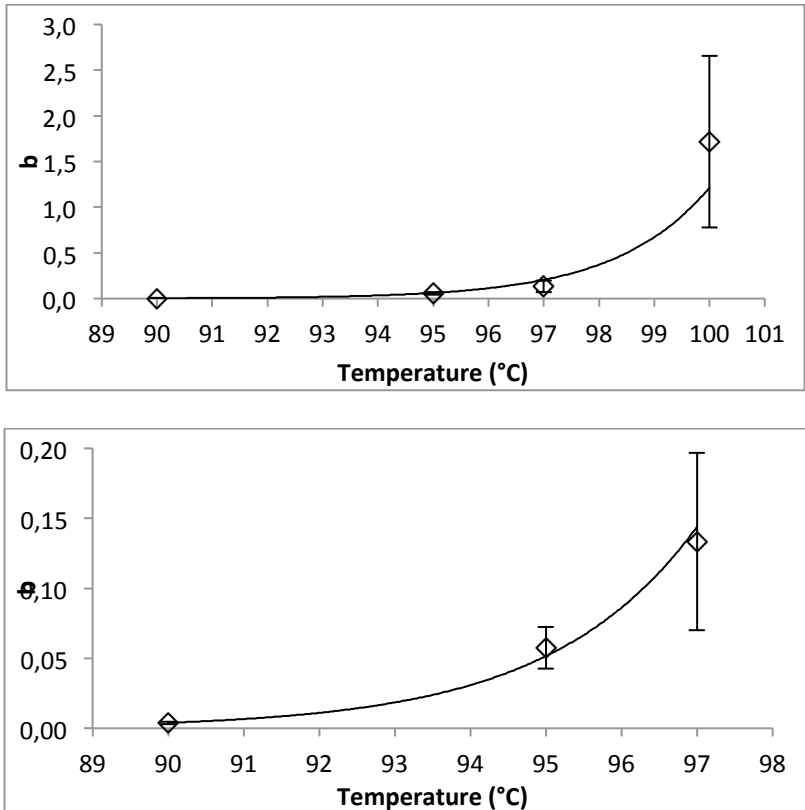


Figure 12. The temperature dependence of the parameter (a) $b(T)$ of *B. coagulans* with 400 ppm described by Equation 2; (b) re-scaled graphic (a) from temperature 90 to 97 °C.

By means of the primary and secondary models, it was possible to establish a non-isothermal model to predict the behavior of *B. coagulans* within the temperature range studied (90-100 °C), under fluctuating temperature conditions. Figure 3 shows results for the non-isothermal profile 1, 90-95 °C for 13.5 minutes with cycles of 1 minute at each temperature; and Figure 4 for profile 2, 95-90°C for 10.5 minutes with cycles of 5 minutes at each temperature. The continuous lines in Figures 3(a) and 4(a) show the simulation of microbial inactivation under a non-isothermal condition, as given by Equation 5, considering the secondary model for b shown by

Equation 7. The temperatures profiles were shown in Figure 3(b) and 4(b), the continuous lines represent the fit of Equation 7 to the experimental temperature profile.

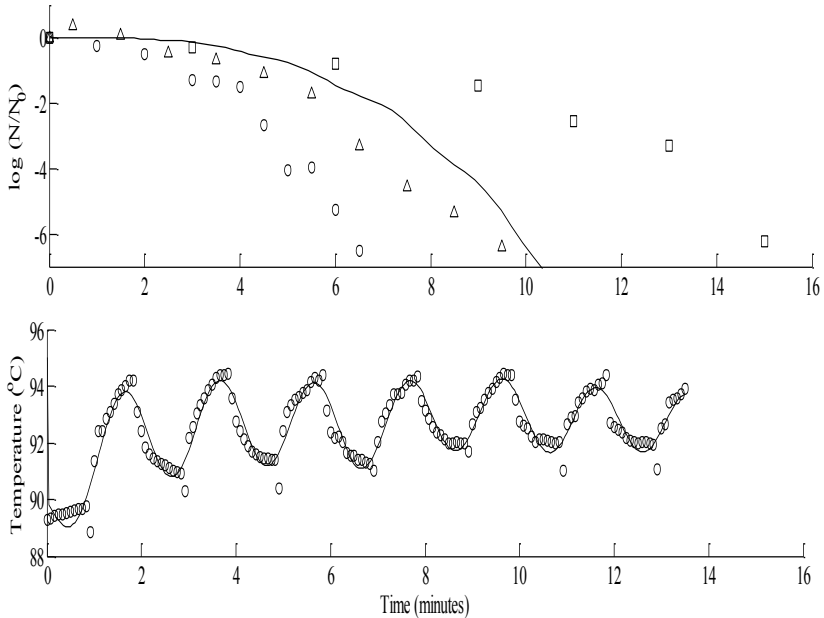


Figure 13. (a) Experimental data for isothermal inactivation at (□) 90 °C and (○) 95 °C, and for (Δ) non-isothermal inactivation of profile 1 (90-95°C/1 min). The continuous line represents the predictions of Equation 5 to non-isothermal treatment. (b) Temperature profile. The continuous line represents the predictions of Equation 6, and (○) represent the experimental data.

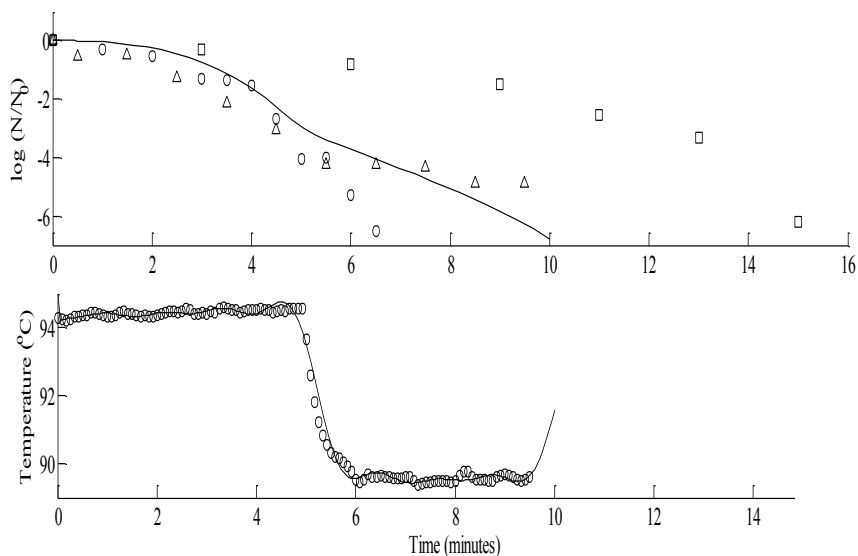


Figure 14. (a) Experimental data for isothermal inactivation at (\square) 90 °C and (\circ) 95 °C, and for (Δ) non-isothermal inactivation of profile 2 (90-95°C/5 min). The continuous line represents the predictions of Equation 5 to non-isothermal treatment. (b) Temperature profile. The continuous line represents the predictions of Equation 6, and (\circ) represent the experimental data.

An overestimation between predictions and experimental data for profile 1 is observed in Figure 3(a). The thermochemical inactivation curve with the non-isothermal profile 1 gave a MSE equal to 0.879. Figure 3(b) shows the good fit of Equation 7 to the experimental values of temperature oscillation as the correlation coefficient (R^2) was equal to 0.92.

The predicted thermochemical non-isothermal curve and the experimental data for temperature profile 2 (Figure 4(a)) during the first 5 minutes was in agreement with the thermochemical isothermal experimental data at 95 °C. After that, when the temperature was changed to 90 °C, the experimental inactivation rate became noticeably lower. The thermochemical inactivation curve with the non-isothermal profile 2 gave a MSE equal to 1.225. The sinusoidal equation (Equation 6) had also fitted well to the experimental temperature for profile 2

(Figures 3(b)), its R^2 was equal to 0.99.

For both non-isothermal temperatures profiles, it is possible to notice that observed and predicted thermochemical non-isothermal curves are located between the thermochemical isothermal inactivation data of 90 and 95 °C. Therefore, the non-isothermal results are in agreement with the isothermal ones. One more remark can be made about the two non-isothermal experiments; temperature reached values slightly above instead of exactly 95 °C. For temperature profile 1 the lowest temperature was between 91 and 92 °C, not exactly at 90 °C. On the other hand, for temperature profile 2 the lowest temperature was slightly below 90 °C.

5.5 Discussion

In order to validate a predictive model for non-isothermal treatment, the model should anticipate the outcome of experiments whose results were not used in its formulation (PELEG, 2006). The majority of data for non-isothermal tests are based in heat treatments at various rates (MATTICK et al., 2001; PERIAGO, et al., 2004; VALDRAMIDIS et al., 2006), while, this study took a different approach, where temperature fluctuated between 90 and 95 °C, in a range of predetermined times. Although most of the heating curves in industrial processes are smooth, a faulty temperature control can cause significant oscillations, as well as sudden temperatures changes, like those produced by an interruption in the steam supply, for example. The study of predictive models for oscillating temperatures is particularly useful in the evaluation of the impact of accidents and unplanned interruptions in the process on the residual survival ratio of the target organism or spore (PELEG, 2006).

In the current study, the non-isothermal inactivation model proposed by Peleg (2006) was validated by comparing the non-isothermal experimental data obtained by two temperature profiles with the non-isothermal data generated by the model. The primary Weibull model showed a good fit to the isothermal inactivation data of *B. coagulans* in NB with 400 ppm of oregano EO at isothermal temperatures (Figure 1). The influence of the temperature on parameter b , resulting from the primary modeling, could be well described through Equation 7 (Figure 2). Likewise, a sinusoidal equation (Equation 6) showed a good fit to both temperature profiles. Thus, from the

secondary and primary models, the non-isothermal model pointed by Peleg (2006) was established and validated to predict the *B. coagulans* spore thermochemical inactivation under variable temperature conditions.

The difference between predicted and observed inactivation values can be attributed to a number of reasons. The experimental data can afford some errors, since they were not in duplicate. The sealed TDT may have had different temperatures from the TDT with thermocouples, since the latter was not sealed by a gas flame. Another cause would be a secondary model that does not properly describe the primary parameter. However, Equation 7 showed a good fit to the experimental values of the parameter b , mainly between the temperatures used for the non-isothermal inactivation, 90 and 95 °C, as can be seen in Figure 2(b).

Mattick et al. (2001) analyzed the non-isothermal inactivation of *Salmonella* cells in two sugar-rich medium heated at various rates to selected temperatures in the range of 65 to 80 °C. The predictive Weibull model proposed by Peleg (2006) was also adequate to describe the non-isothermal survival curves with good accuracy. Periago et al. (2004) observed the non-isothermal curves of *Bacillus sporothermodurans* spores in three soups. Even though they also employed a limited database for the analysis, the survival patterns of the spores under non-isothermal conditions could be well estimated by the non-isothermal Weibull model.

Although only a limited experimental database was employed for the analyses and the predicted values overestimated the observed values, the survival parameters can be used to estimate the inactivation patterns of the spores under non-isothermal heating treatments. Future studies can be performed with another non-isothermal model, as well as with more oscillating temperature profiles and their replicates in order to better understand the behavior of *B. coagulans* spores under thermochemical non-isothermal inactivation.

5.6 References

BECERRIL, R. *et al.* Combination of analytical and microbiological techniques to study the antimicrobial activity of a new active food packaging containing cinnamon or oregano against *E. coli* and *S.*

aureus. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [S.I.], v. 388, n. 5-6, p. 1003-1011, 2007.

CONESA, R. *et al.* Prediction of *Bacillus subtilis* spore survival after a combined non-isothermal-isothermal heat treatment. *European Food Research and Technology* [S.I.], v. 217, n. 4, p. 319-324, 2003.

CORRADINI, M. G. *et al.* Prediction of an organism's inactivation patterns from three single survival ratios determined at the end of three non-isothermal heat treatments. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 126, n. 1-2, p. 98-111, 2008.

DE CLERCK, E. *et al.* Polyphasic Characterization of *Bacillus coagulans* Strains, Illustrating Heterogeneity within this Species, and Emended Description of the Species. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 50-60, 2004.

DOLAN, K. D. Estimation of kinetic parameters for nonisothermal food processes. *Journal of Food Science* [S.I.], v. 68, n. 3, p. 728-741, 2003.

DOLAN, K. D.; YANG, L. ; TRAMPEL, C. P. Nonlinear regression technique to estimate kinetic parameters and confidence intervals in unsteady-state conduction-heated foods. *Journal of Food Engineering* [S.I.], v. 80, n. 2, p. 581-593, 2007.

FERNANDEZ, A. *et al.* Modelling thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in sucrose solutions of various water activities. *Food Microbiology* [S.I.], v. 24, n. 4, p. 372-379, 2007.

JIN, T. *et al.* Effects of pH and temperature on inactivation of *Salmonella typhimurium* DT104 in liquid whole egg by pulsed electric fields. *International Journal of Food Science and Technology* [S.I.], v. 44, n. 2, p. 367-372, 2009.

JUNEJA, V. K. ; HWANG, C. A. ; FRIEDMAN, M. Thermal Inactivation and Postthermal Treatment Growth during Storage of Multiple *Salmonella* Serotypes in Ground Beef as Affected by Sodium Lactate and Oregano Oil. *Journal of Food Science* [S.I.], v. 75, n. 1, p. M1-M6, 2010.

LUCAS, R. *et al.* Application of the broad-spectrum bacteriocin

enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. v. 44, n. 10, p. 1774-1781, 2006.

MATTICK, K. L. *et al.* Calculating *Salmonella* inactivation in nonisothermal heat treatments from isothermal nonlinear survival curves. *Journal of Food Protection* [S.I.], v. 64, n. 5, p. 606-613, May 2001.

MILLER, F. A. *et al.* Comparison of recovery methods for the enumeration of injured *Listeria innocua* cells under isothermal and non-isothermal treatments. *Food Microbiology* [S.I.], v. 27, n. 8, p. 1112-1120, 2010.

PACHECO, C. D. P.; MASSAGUER, P. R. Biological validation of tomato pulp continuous heat process. *Journal of Food Process Engineering*, v. 27, n. 6, p. 449-463, 2004.

PELEG, M. *Advanced quantitative microbiology for foods and biosystems: models for predicting growth and inactivation*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

PELISSARI, F. M. *et al.* Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch–Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. v. 57, n. 16, p. 7499-7504, 2009.

PERIAGO, P. M. *et al.* *Bacillus megaterium* spore germination and growth inhibition by a treatment combining heat with natural antimicrobials. *Food Technology and Biotechnology* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 17-23, 2006.

_____. Estimation of the non-isothermal inactivation patterns of *Bacillus sporothermodurans* IC4 spores in soups from their isothermal survival data. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 95, n. 2, p. 205-218, 2004.

STUMBO, C. R. *Thermobacteriology in Food Processing*. Segunda. ed. New York, 1978.

TSIGARIDA, E.; SKANDAMIS, P. ; NYCHAS , G. J. E. Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or

without the presence of oregano essential oil at 5 degrees C. *Journal of Applied Microbiology* [S.I.], v. 89, n. 6, p. 901-909, 2000.

VALDRAMIDIS, V. P. *et al.* Microbial dynamics versus mathematical model dynamics: The case of microbial heat resistance induction. *Journal of Food Engineering*, v. 7, n. 1-2, p. 80-87, 2006.

_____. Identification of non-linear microbial inactivation kinetics under dynamic conditions. *5th International Conference on Predictive Modelling in Foods* [S.I.], v. 128, n. 1, p. 146-152, 2008.

VALERO, M.; SALMERON, M. C. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 85, n. 1-2, p. 73-81, 2003.

VAN BOEKEL, M. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology* [S.I.], v. 74, n. 1-2, p. 139-159, Mar 2002.

ZIMMERMANN, M. *et al.* Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in pineapple juice. *Lwt-Food Science and Technology* [S.I.], v. 44, n. 1, p. 239-243, Jan 2011.

CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO

O efeito bactericida do óleo essencial de orégano sobre diversos micro-organismos tem sido publicado na literatura. Entretanto, estudos a respeito do efeito deste conservante natural sobre os esporos de *Bacillus coagulans* não foram encontrados na literatura consultada. Através deste estudo, que teve como objetivo geral estudar o efeito da ação conjunta do óleo essencial de orégano e do calor sobre a resistência dos esporos de *B. coagulans*, em caldo nutriente ajustado a 4 °Brix e pH 4,2, foi possível concluir que existe uma ação sinérgica entre os dois agentes de inativação.

Inicialmente, a identificação das moléculas do óleo essencial, como o carvacrol e o timol, corroboram com a literatura, sendo o principal componente o carvacrol com aproximadamente 58 %. Em seguida, durante a determinação da concentração mínima inibitória, a análise visual do crescimento do micro-organismo em meio adicionado de óleo essencial de orégano apontou que, quanto maior a concentração de óleo essencial de orégano, mais prolongado é o início do crescimento da bactéria.

Os resultados da inativação química demonstraram que, o óleo essencial de orégano pode não entrar em contato com o micro-organismo, pois ocorre uma separação de fases entre o caldo nutriente e o óleo essencial em concentrações mais elevadas. Deste modo, o óleo essencial foi emulsionado com o objetivo de aumentar o contato entre este e os esporos de *B. coagulans*. Por sua vez, os resultados da resistência termoquímicas com o óleo essencial de orégano emulsionado foram superiores ao do OE puro, ou seja, a inibição dos esporos foi mais eficaz ao se utilizar a emulsão. Por exemplo, o tempo para alcançar 6 reduções decimais com o óleo essencial emulsionado foi de 1,4 minutos a 100 °C, enquanto que com o óleo essencial puro foi de 2,8 minutos, à mesma temperatura. Logo, as resistências termoquímicas mostraram que o óleo essencial de orégano emulsionado pode ser utilizado para diminuir a resistência dos esporos de *B. coagulans* ao calor.

O modelo primário de Weibull foi capaz de descrever as curvas de inativação térmicas e termoquímicas do *B. coagulans* em caldo nutriente. A influência da temperatura sobre os parâmetros gerados pelo modelo primário foi descrita adequadamente por equações empíricas. Uma vez que o modelo de Weibull teve bom ajuste aos dados experimentais das resistências termoquímicas isotérmica, o modelo de inativação não isotérmico, baseado neste modelo proposto por Peleg (2006), pode descrever o comportamento dos esporos de

B. coagulans sob o efeito termoquímico a temperatura variável.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o óleo essencial de orégano tem ação bactericida contra os esporos de *B. coagulans*. Sua ação conjunta com a temperatura aumenta a susceptibilidade dos esporos ao calor, podendo, portanto, reduzir o tempo de processamento de um alimento. Por exemplo, a 100°C e 0 ppm de óleo essencial de orégano o tempo para alcançar 6 reduções decimais foi próximo a 3 minutos, enquanto que a 100°C e 400 ppm foi de 1,6 minutos. Trabalhos futuros podem analisar a ação do óleo essencial de orégano diretamente em um alimento, como por exemplo, produtos a base de tomate como polpas. Assim como verificar seu efeito sobre outros micro-organismos, visto que o óleo essencial de orégano mostra-se como um excelente conservante natural.

ANEXO 1

1. Duplicatas das curvas da inativação termoquímica dos esporos de *B. coagulans*.

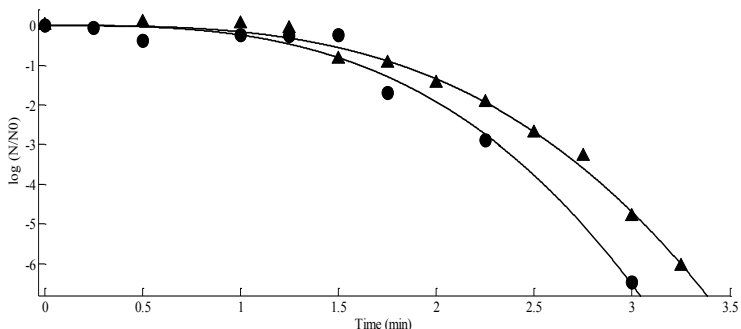


Figura 5. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 0 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

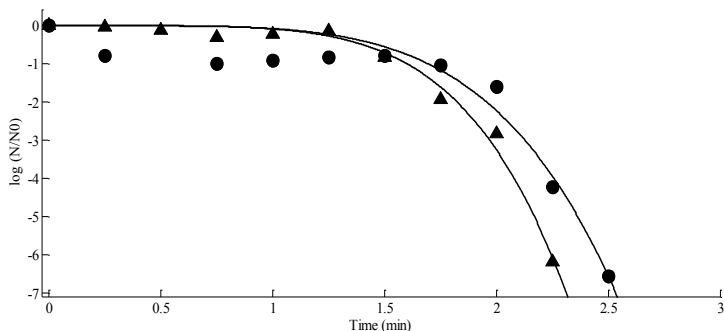


Figura 6. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 250 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

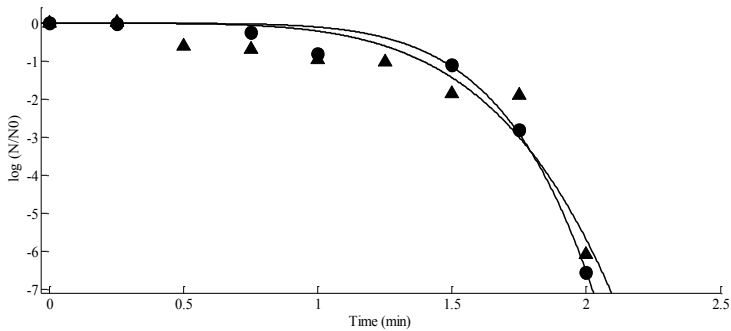


Figura 7. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 300 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

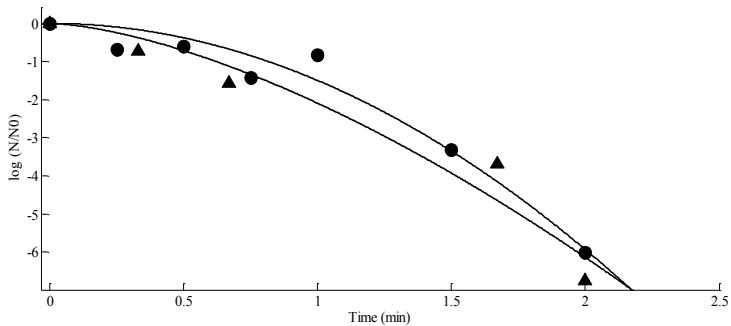


Figura 8. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 350 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

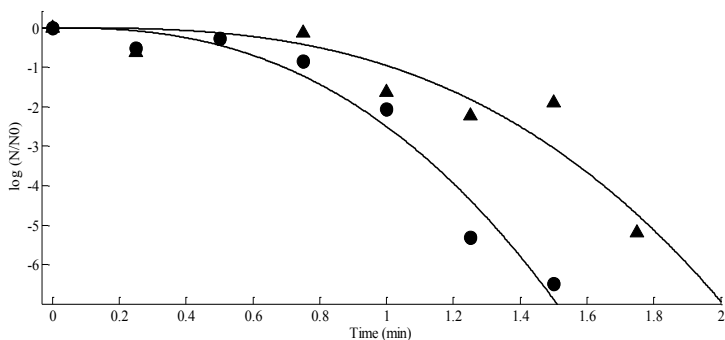


Figura 9. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

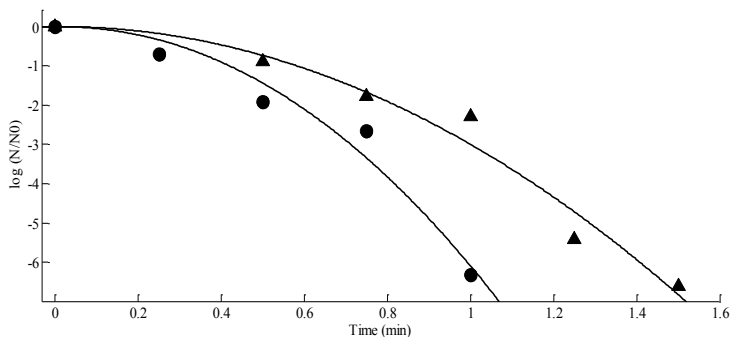


Figura 10. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 500 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

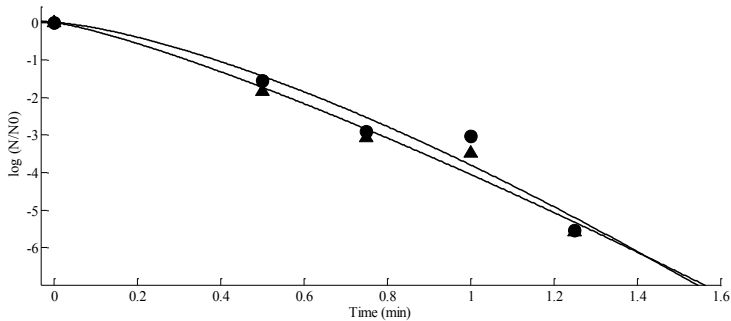


Figura 11. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 100 °C em CN com 1000 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

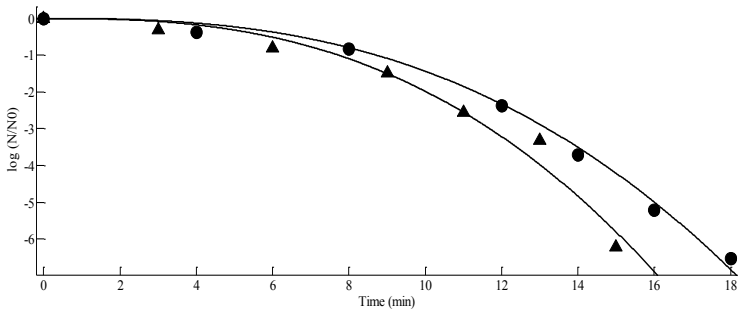


Figura 12. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 90 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

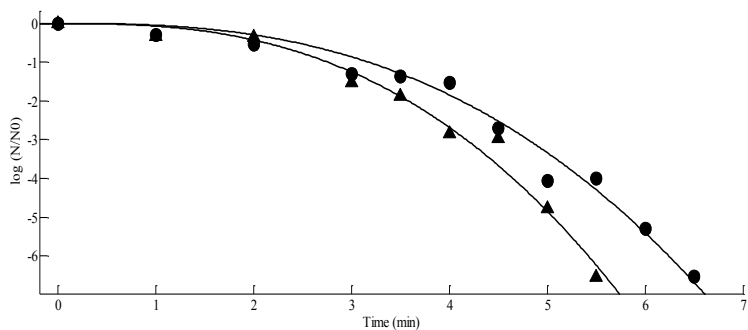


Figura 13. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 95 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.

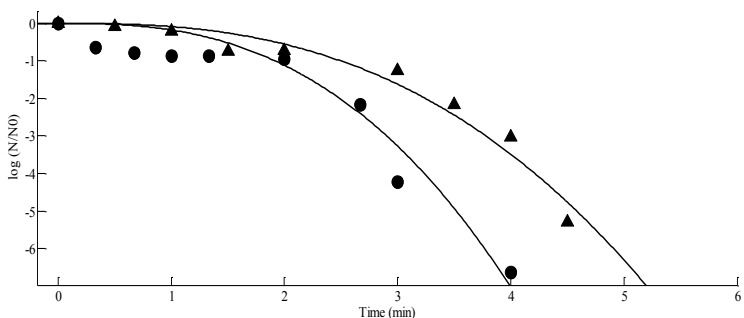


Figura 14. Curvas experimentais de inativação isotérmica a 97 °C em CN com 400 ppm de OE de orégano para a duplicata número (●) 1 e (▲) 2. As linhas contínuas representam o ajuste do modelo de Weibull aos dados experimentais.