

Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta

Diego Alvarenga Botre¹, Nilda de Fatima Ferreira Soares², Paula Judith Perez Espitia¹, Solange de Sousa³, Isis Rodrigues Toledo Renhe⁴

RESUMO

O consumo de pizzas prontas aumentou nos últimos anos dado à praticidade do produto e ao baixo custo, sabor agradável e valor nutritivo. Porém, esse produto sofre intensa manipulação durante o seu processamento, contribuindo para sua contaminação, diminuindo a qualidade e aumentando os riscos de doenças veiculadas por esse alimento. Aliado à necessidade de produtos práticos e convenientes, o consumidor demanda alimentos cada vez mais seguros, despertando o interesse pelo uso de conservantes naturais. Dentre eles, o óleo essencial de orégano apresenta ação antimicrobiana, sendo essa especiaria utilizada na culinária de vários países. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filme de base celulósica, incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta refrigerada. Esse óleo incorporado ao filme nas concentrações de 25 e 50% p/p apresentou efeito inibitório *in vitro* para *Penicillium* spp. e *Staphylococcus aureus*. Quando aplicado em pizza observou-se diminuição dos compostos ρ -cimeno e γ -terpineno e consequente aumento da concentração de timol e carvacrol, mas provavelmente em quantidade insuficiente para o efeito inibitório dos microrganismos. Com relação à resistência mecânica, os filmes incorporados com 25 e 50% de óleo tiveram sua resistência diminuída, tendo a tenacidade do filme de 50% aumentada com relação ao controle (0%). O uso de filme incorporado com o óleo de orégano desperta grande interesse na aplicação em pizzas, uma vez que o orégano já é um ingrediente do produto, portanto não compromete o sabor e odor da pizza.

Palavras-chave: Embalagem ativa, conservante natural, alimentos, efeito antimicrobiano.

ABSTRACT

Evaluation of film incorporated with oregano essential oil for the conservation of ready-to-eat pizza

The consumption of ready-to-eat pizzas has increased in the last years because of the handiness of the product, its low cost, good flavour and nutritional value. However, ready-to-eat pizzas undergo intense manipulation during processing, contributing to spoilage, reducing the quality and increasing the risks of contamination by pathogens. Besides convenient products, consumers also seek for safer foods, with increasing demand for the use of natural compounds as food preservatives. Among them, the oregano essential oil presents antimicrobial activity and it is a spice used in the cookery of several countries.

Recebido para publicação em agosto de 2008 e aprovado em março de 2010

¹Engenheiro de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Av. P.H.Rolfs, s/n, Campus universitário, Centro, 36570000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Autor para correspondência. diegobotrel@yahoo.com.br; brpez.espitia@gmail.com

²Engenheira de Alimentos, Ph. Doctor. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Av. P.H.Rolfs, s/n, Campus universitário, Centro, 36570000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. nsoares@ufv

³Engenheira de Alimentos, Mestre. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Formação de Tecnólogos, Campus IV, Centro, 58220-000 - Bananeiras, Paraíba, Brasil. solange_ufpb@yahoo.com.br

⁴Engenheira de Alimentos, Mestre. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Av. P.H.Rolfs, s/n, Campus universitário, Centro, 36570000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. isisrtrenhe@gmail.com

The objective of this work was to develop a cellulosic film incorporated with oregano essential oil for the conservation of refrigerated ready-to-eat pizza. The oregano essential oil incorporated to the film, in the concentrations of 25% and 50% w/w, showed in vitro inhibitory effect against *Penicillium spp.*, and *Staphylococcus aureus*. When the oil was applied to the pizza, it caused a decrease in the compounds α -cymene and α -terpinene and a consequent increase in tymol and carvacrol concentrations; however, in an amount probably not enough for the inhibitory effect against microorganisms. The mechanical resistance of the films incorporated with 25% and 50% of oregano essential oil was reduced, and film tenacity increased by 50% compared with the control (0%). The use of films incorporated with oregano essential oil for pizza packaging is of great interest, since the oregano is already an ingredient of the product and therefore it does not compromise the flavour and aroma of the product.

Key words: active packaging, antimicrobial effect, foods, natural preservative.

INTRODUÇÃO

Atualmente, apesar de melhorias nas práticas de higiene e produção de alimentos, a segurança alimentar é um assunto de saúde pública de crescente importância (WHO, 2002). Foi calculado que em países industrializados 30% das pessoas sofrem de alguma doença veiculada pelos alimentos a cada ano (WHO, 2002). Assim, existe uma demanda por novos métodos para reduzir ou eliminar microrganismos indesejáveis presentes nos alimentos, possivelmente em combinação com outros já existentes, aplicando o princípio da tecnologia de barreira (Leistner, 1978). Ao mesmo tempo, a sociedade está experimentando tendência ao consumo de produtos mais saudáveis, desejando menos quantidade de aditivos sintéticos nos alimentos e com impacto menor na saúde do consumidor.

Conciliando o desejo de produtos mais práticos, que geralmente necessitam de agentes conservantes para prolongar sua vida de prateleira, e mais saudáveis, uma opção encontrada é o uso de óleos essenciais, esses compostos estão relacionados com propriedades antimicrobianas e antioxidantes.

O regulamento técnico para especiarias, RDC n. 276 da Anvisa, reconhece o uso de duas espécies no Brasil: o orégano chileno (*Origanum vulgare* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth), na forma de folhas e talos. Esses produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor, devendo obedecer à legislação vigente de Boas Práticas de Fabricação (BPF). Além disso, os produtos devem atender aos regulamentos técnicos específicos de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação (Brasil, 2005).

Os óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste

com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (Brasil, 2007).

O óleo essencial de *O. vulgare* possui alto conteúdo de compostos fenólicos, que têm sido considerados como os responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (Souza *et al.*, 2006). O óleo essencial de *O. vulgare* subsp. *hirtum* (orégano grego) e o de *Coridothymus capitatus* L. (orégano espanhol) foram caracterizados pela predominância da ocorrência de carvacrol (74,56 e 81,46% do total de óleo, respectivamente). Já a espécie *Satureja thymbra* L. é caracterizada pela presença de timol (34,72% do total de óleo) e também foi observada quantidade significativa de compostos fenólicos (Karpouhtsis *et al.*, 1998).

Embora a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos tenha sido bastante reportada, o mecanismo de ação contra os microrganismos não é estudado com grande detalhe. Tem sido sugerido que a mistura de carvacrol e timol produz efeito aditivo e que a inibição global do óleo essencial pode ser atribuída principalmente à atividade antimicrobiana desses dois compostos. Tal ação é devida à desestabilização da membrana, com efeitos posteriores no pH homeostático e no equilíbrio de sais inorgânicos (Lambert *et al.*, 2001). Rhayour *et al.* (2003) também reportam a ação antimicrobiana do óleo essencial de orégano ao composto timol, isômero do composto carvacrol, e descrevem danos causados à parede celular como o mecanismo de ação desses compostos. Os danos variam de acordo com o tipo de bactéria, se é Gram positiva ou Gram negativa (Rhayour *et al.*, 2003). A Figura 1 mostra a estrutura dos compostos timol e carvacrol.

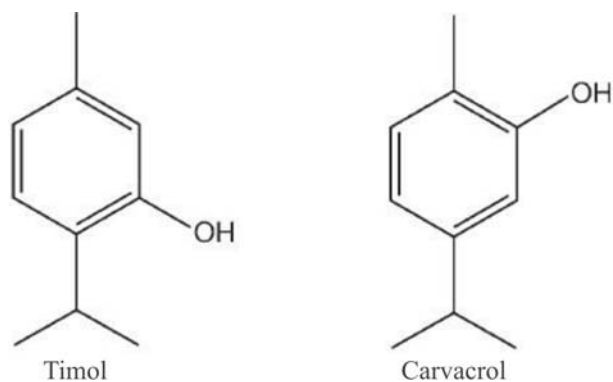


Figura 1. Estrutura de timol e carvacrol.

Karpouhtsis *et al.* (1998) estudaram a atividade genotóxica de óleo essencial de orégano e mostraram que o óleo proveniente de três plantas de orégano (*O. vulgare* subsp. *hirtum*, *C. capitatus* e *S. thymbra* L.) não teve nenhum efeito mutagênico ou atividade recombinante. Com relação aos dois fenóis presentes, o carvacrol mostrou atividade genotóxica negativa e o timol foi considerado um potente mutagênico, mas não indutor recombinagênico. Análise comparativa de mutagênese espontânea ou induzida mostrou que o óleo essencial de *O. vulgare* subsp. *hirtum* foi o único que apresentou mutagenicidade reduzida. O óleo essencial de *Origanum* spp. é geralmente reconhecido como seguro (GRAS) pelo “Food and Drug Administration” (FDA, 2006).

Souza *et al.* (2006) avaliaram a sensibilidade de várias bactérias ao óleo essencial de orégano: *Aeromonas hydrophilla*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enterica*, *Serratia mercencens*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, e *Yersinia enterocolitica*.

Todas as bactérias testadas foram sensíveis à presença do óleo essencial de orégano (20µL/disco), apresentando halos de inibição variando de 30-36 mm. A concentração mínima de inibição (CIM) variou entre 20-40 µL/mL para a maioria das bactérias, sendo as gram-positivas, de modo geral, as mais sensíveis. As maiores concentrações de CIM (80µL/mL) foram encontradas para *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*.

A adição de 0,8% (v/m) de óleo essencial de orégano em carnes resultou, em geral, numa redução inicial de 2-3 ciclos logarítmicos na microbiota, independentemente do filme utilizado na embalagem. *Pseudomonas* sp., gram-negativa, foi a mais resistente ao óleo essencial, enquanto as bactérias ácido-láticas foram as mais sensíveis. Halo de inibição também foi encontrado para *L. monocytogenes*. O uso de filmes com baixa permea-

bilidade ao O₂ para acondicionamento a vácuo ou sob atmosfera modificada melhora o desempenho do óleo essencial de orégano (Tsigarida *et al.*, 2000) devido à maior concentração dos compostos voláteis no espaço livre da embalagem.

As pizzas são consideradas massas alimentícias prontas para o consumo. Esse tipo de produto sofre intensa manipulação durante o seu processamento, o que pode contribuir para a sua contaminação com microrganismos (Freitas *et al.*, 2004a). Embora as massas de pizzas não sejam consideradas frescas, porque são levemente fermentadas e têm sua umidade diminuída de 49% (massa crua) para valores médios de 28% com o forneamento, elas continuam se comportando como um produto que se conservaria melhor sob refrigeração e, possivelmente, com embalagem de atmosfera controlada (Pinho *et al.*, 2001).

A avaliação microbiológica de pizzas é preocupante. Resultados de pesquisas mostraram valores de contagem microbiológica acima do permitido pela legislação brasileira, com altas contagens de fungos filamentosos e leveduras, coliformes fecais, presença de *E. coli* e *Staphylococcus* (Pinho & Furlong, 2000; Pinho *et al.*, 2001; Freitas *et al.*, 2004a; Freitas *et al.*, 2004b).

O óleo essencial de orégano desperta grande interesse de aplicação em pizzas, uma vez que o orégano é um ingrediente do produto, portanto não compromete o seu sabor nem odor, além de apresentar atividade antimicrobiana. Sendo assim, este trabalho objetivou desenvolver filme ativo antimicrobiano incorporado com óleo essencial de orégano para a conservação de pizza pronta refrigerada.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Embalagens de Alimentos do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, Brasil. Foram avaliados os seguintes tratamentos: controle (sem filme), filme sem adição de óleo essencial (0%) e filmes adicionados de 25 e 50% de óleo essencial.

Elaboração dos filmes

Os filmes foram produzidos a partir de resina celulósica adicionada de 25 e 50% de óleo essencial de orégano em relação ao peso da resina. O filme controle não foi incorporado com o antimicrobiano. A solução foi espalhada em uma superfície plana para a formação do filme após a evaporação do solvente (acetona) à temperatura ambiente.

Atividade antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos filmes ativos mediante teste de halo sobre *S. aureus* ATCC

6538 e *Penicillium* sp., isolado de pizza, à temperatura de 35 e 25°C, respectivamente. As culturas ativas foram plaqueadas em ágar Baird Parker (Merck) e ágar batata dextrose (BDA - Acumedia) acidificado, respectivamente, nos quais foram colocados discos de cada filme (diâmetro de 1 cm) com as diferentes concentrações do óleo essencial.

A avaliação do desenvolvimento da microbiota presente na pizza pronta refrigerada envolta com o filme antimicrobiano foi baseada na contagem padrão de aeróbios psicrotróficos, em ágar para contagem padrão (PCA - Merck), e de fungos filamentosos e leveduras, em ágar batata dextrose (BDA - Acumedia), segundo método descrito por Vanderzant & Splittstoesser (1992). A contagem foi realizada nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias de estocagem da pizza à temperatura de 7 ± 1 °C. No tempo zero, a pizza refrigerada foi analisada logo após o tratamento. Os resultados foram obtidos com duas repetições em duplicata.

Propriedades mecânicas dos filmes

As propriedades mecânicas das embalagens desenvolvidas foram avaliadas mediante o Aparelho Universal de Testes de Materiais Instron (Série 3366). As amostras apresentaram 5 cm de largura e 15 de comprimento. O aparelho foi operado a uma velocidade de 50 mm/s, usando uma carga de 1 kN (100 kg) e distância entre as garras pneumáticas de 50 mm. Esses ensaios foram realizados a uma umidade relativa de 60% e temperatura de 25°C.

Foram calculados os valores de carga máxima, valor de força máxima suportado pelo filme; resistência à tração, resistência máxima oferecida pelo corpo-de-prova quando submetido à tração; alongamento no ponto de ruptura, deformação sofrida pelo filme até a ruptura; percentagem de alongamento, valor do alongamento relativo à largura do filme; e fator de ruptura, relação entre a força máxima de tração por unidade de largura do corpo de prova (Oliveira *et al.*, 1996). O experimento para os testes mecânicos foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, a análise estatística realizada utilizando-se o software "Statistical Analysis System" (SAS) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

Análise dos compostos voláteis do óleo essencial de orégano nos filmes ativos

Amostras dos filmes ativos (1 x 5 cm) dos três tratamentos foram acondicionadas em frascos de vidro de 20 mL e lacrados, mantidos sob refrigeração, para análise dos compostos voláteis por cromatografia gasosa. Utilizou-se GC-17A (Shimadzu) acoplado ao espectrofotômetro de massa GCMS-QP5050A. A coluna do GC foi DB-WAX (60 metros de comprimento e diâmetro de 0,25 mm). As

temperaturas de injeção e do detector foram mantidas em 170 °C. A temperatura do forno iniciou-se a 60 °C, e se manteve por 4 min. Após, a uma taxa de 5 °C/min, elevou-se até 170 °C onde foi mantida por 5 min. O fluxo utilizado foi de 1 mL/min. A leitura foi realizada em modo scan, onde foram analisados os compostos γ -terpineno e ρ -cimeno nos tempos 3, 6, 9 e 12 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade antimicrobiana

Teste de halo

A atividade antimicrobiana para *Penicillium* spp. após quatro dias em temperatura de 25 °C aumentou com o aumento da concentração do óleo essencial nos filmes, como observado na Figura 2.

Resultado semelhante foi verificado para *S. aureus* após quatro dias (Figura 3) sob temperatura de 35 °C. O aumento na concentração do composto antimicrobiano nos filmes provocou aumento do halo de inibição. Dessa forma, foram observadas alterações na morfologia das colônias de *S. aureus*, que deixaram de apresentar colônias grandes e separadas para formar colônias menores e mais unidas (Figura 4). Tal fato pode ser explicado pela difusão e solubilização do composto antimicrobiano no meio que diminuiu o crescimento e provocou a formação de colônias menores na região.

O óleo essencial de orégano apresentou eficiente inibição do crescimento de *Penicillium* spp. e *S. aureus*, porém em temperaturas de 25 e 35 °C, respectivamente. Tais temperaturas favorecem a volatilização do composto antimicrobiano e sua difusão pelo meio.

Seydim & Sarikus (2006) realizaram teste do halo para filmes comestíveis de isolado proteico de soro contendo 1% de óleo essencial de orégano sobre diferentes microrganismos. Esses filmes não apresentaram efeito contra nenhum microrganismo testado. A mínima concentração requerida para inibição foi de 2%. A maior zona de inibição ($p < 0,05$) foi observada em concentração de 4% contra *S. aureus*, *Salmonella enteritidis* e *L. monocytogenes*. Na medida em que a concentração aumentava a zona de inibição também aumentava significativamente para *S. enteritidis*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* e *S. aureus*; no entanto, o aumento na concentração não foi efetivo para *Lactobacillus plantarum* ($p > 0,05$) acima de 2%.

Atividade antimicrobiana no alimento

Os resultados de contagem total de psicrotróficos e fungos filamentosos estão representados nas Figuras 5 e 6, respectivamente. O crescimento de psicrotróficos na pizza pronta não foi inibido pelo óleo essencial de orégano incorporado ao filme de base celulósica nas condições testadas. Os valores de crescimento foram iguais em to-

dos os tratamentos. No entanto, o crescimento de fungos filamentosos e leveduras apresentou pequena inibição depois de 15 dias de estocagem a 7°C, quando submetidos ao tratamento 50% de orégano. Em todos os tratamentos testados, até os 15 dias de estocagem não houve crescimento de fungos filamentosos, apenas leveduras foram observadas.

O fato de a ação antimicrobiana ter ocorrido somente após 15 dias de estocagem a 7°C pode estar relacionado à diminuição da volatilidade do óleo essencial de orégano, quando submetido a baixas temperaturas, o que leva à consequente diminuição na saturação do espaço livre da embalagem da pizza, comprometendo, portanto, a sua ação. A base celulósica pode, também, ter contribuído para aumentar a retenção do óleo na resina, diminuindo a saturação do ambiente da embalagem.

Oussallah *et al.* (2004) mostraram que 1% de óleo essencial de orégano incorporado em um filme de caseinato de cálcio e isolado proteico de soro (WPI)-carboximetil celulose apresentou efeito inibitório contra *E. coli* O157:H7 e *Pseudomonas* spp. na superfície de pedaços de bife de carne bovina. Este estudo sugere que 2% de óleo essencial de orégano em filmes de WPI foi a concentração mínima com efeito inibitório contra *S. aureus*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, *L. plantarum* e *E. coli* O157:H7. Os pesquisadores também concluíram que a fonte e a concentração do composto ativo de plantas e a composição do material do filme têm efeito crucial na atividade biológica em filmes comestíveis.

Apesar da ação comprovada dos óleos essenciais na inibição antimicrobiana *in vitro*, são necessários valores

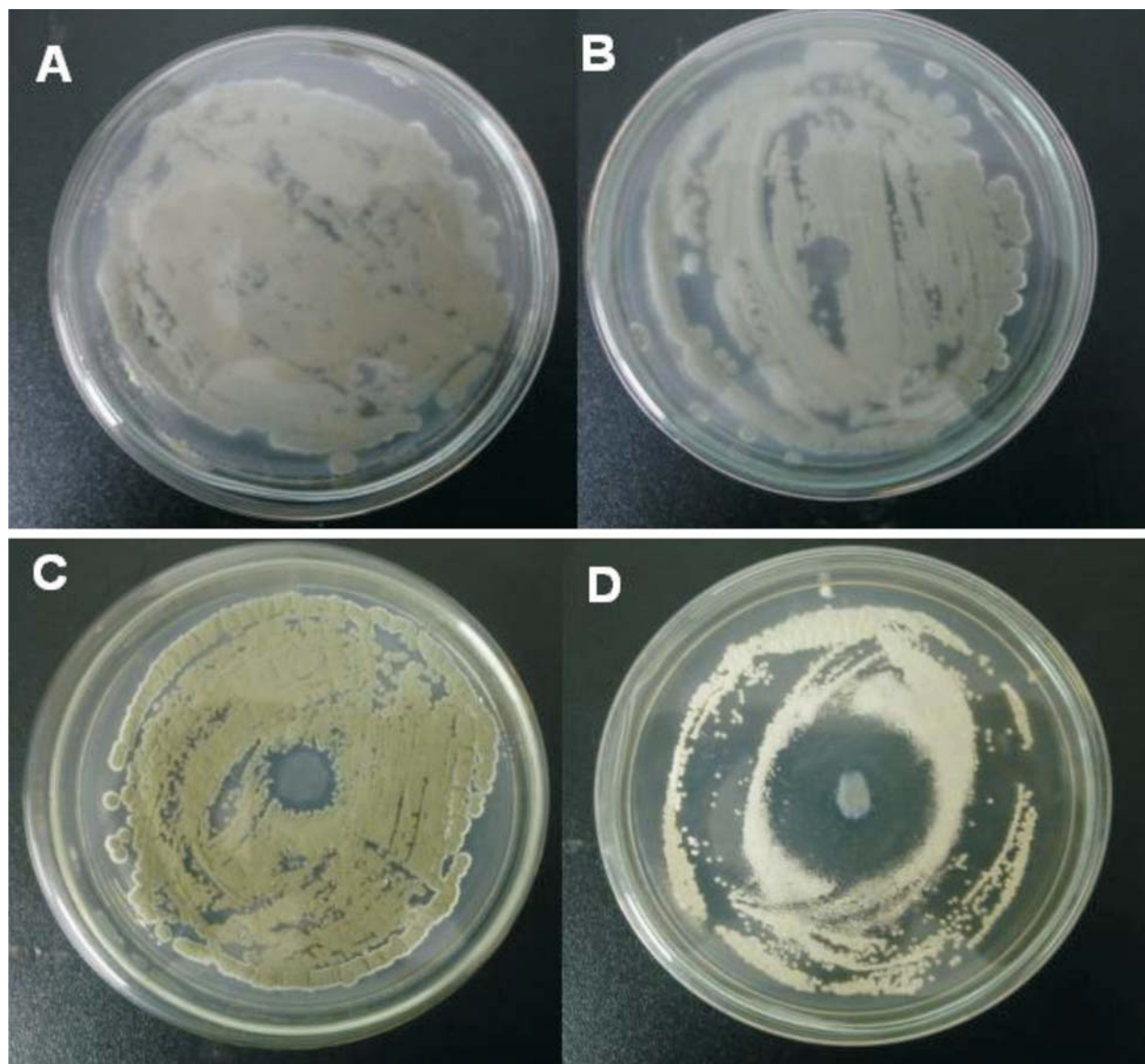


Figura 2. Teste do halo de *Penicillium* sp. Controle sem filme (A); filme com 0% de óleo essencial de orégano (B); filme com 25% de óleo essencial de orégano (C); e filme com 50% de óleo essencial de orégano (D).

muito maiores para alcançar a mesma eficiência quando aplicados em alimentos. A grande disponibilidade de nutrientes em alimentos comparada com os meios de cultura permite às bactérias repararem o dano celular rapidamente. Além dos fatores intrínsecos do alimento (gordura, proteína, água, antioxidantes, pH, conservantes), os fatores extrínsecos (temperatura, embalagem a vácuo, características do microrganismo) também influenciam a sensibilidade das bactérias (Gill *et al.*, 2002; Shelef, 1983; Tassou *et al.*, 1995).

Propriedades mecânicas

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nos testes mecânicos realizados para os filmes contendo 0, 25 e 50% à temperatura de 25 °C. As amostras apresentaram 5 cm de largura e 15 de comprimento, com espessuras de 50, 70 e

70 µm para os filmes controle, 25% de óleo essencial e 50% de óleo essencial, respectivamente.

Segundo Oliveira *et al.* (1996), os materiais plásticos diferem entre si quanto à resposta à deformação por tração, apresentando diferentes comportamentos gráficos. O valor do módulo de elasticidade (Módulo de Young) pode ser utilizado para informar as características dos materiais. Os tratamentos diferiram entre si ($p < 0,05$) em relação ao valor do módulo de elasticidade, tendo os filmes incorporados com 25 e 50% de óleo apresentado valores menores quando comparados com o tratamento controle. Dessa forma, um valor do módulo de elasticidade pequeno caracteriza um filme, de menor rigidez, logo a adição de óleo alterou a estrutura do filme tornando-o menos rígido em relação ao controle (sem adição de óleo).

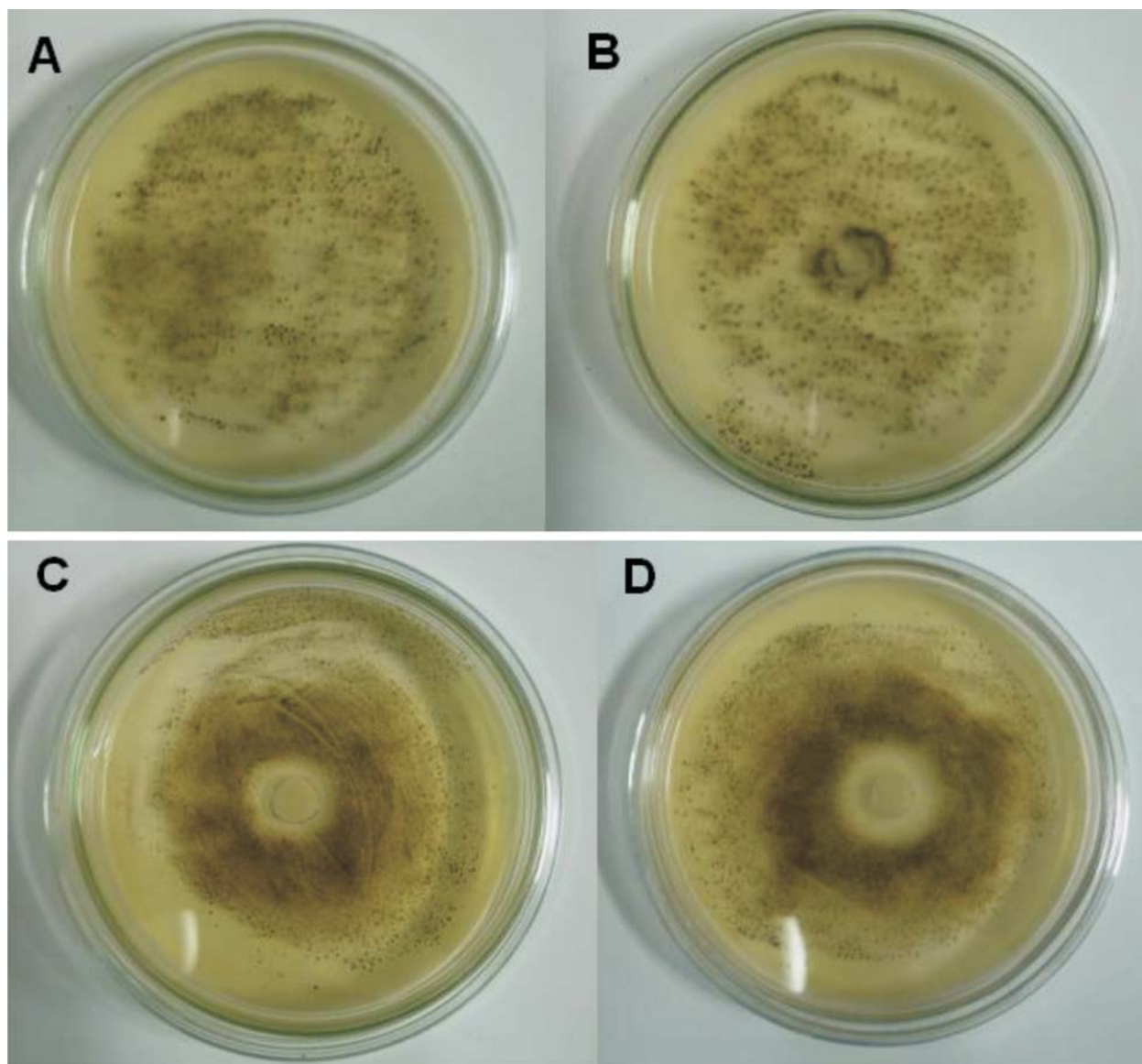


Figura 3. Teste do halo de *S. aureus*. Controle sem filme (A); filme com 0% de óleo essencial de orégano (B); filme com 25% de óleo essencial de orégano (C); e filme com 50% de óleo essencial de orégano (D).

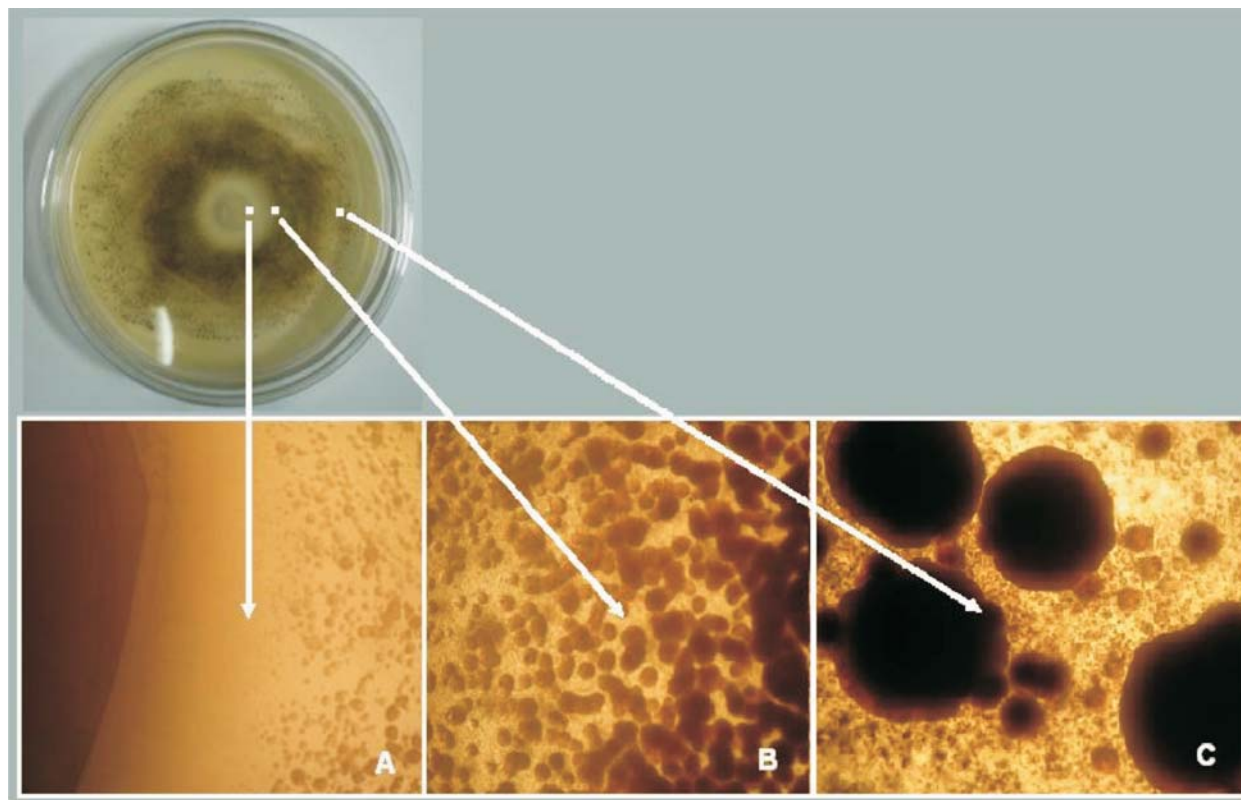


Figura 4. Imagens ao microscópio óptico (aumento de 40x) de crescimento de *S. aureus*, representando o halo de inibição (A), a alteração nas colônias mais próximas ao halo (B) e colônias com crescimento normal, localizadas nos extremos da placa de Petri (C).

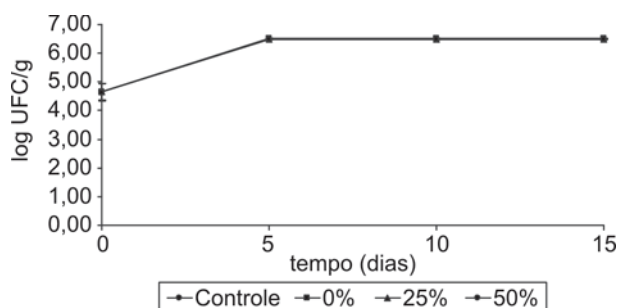


Figura 5. Crescimento de psicrotróficos em pizza pronta submetida aos diferentes tratamentos (controle, 0, 25 e 50%) durante 15 dias de estocagem a 7 °C.

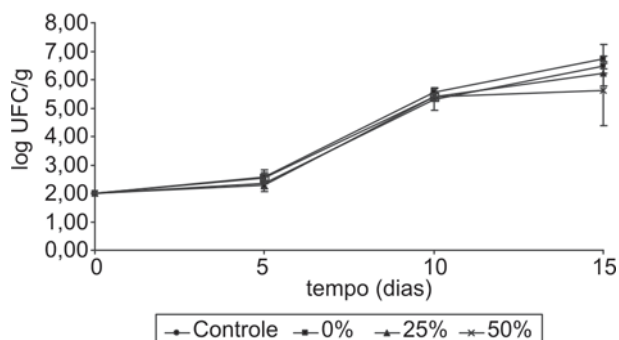


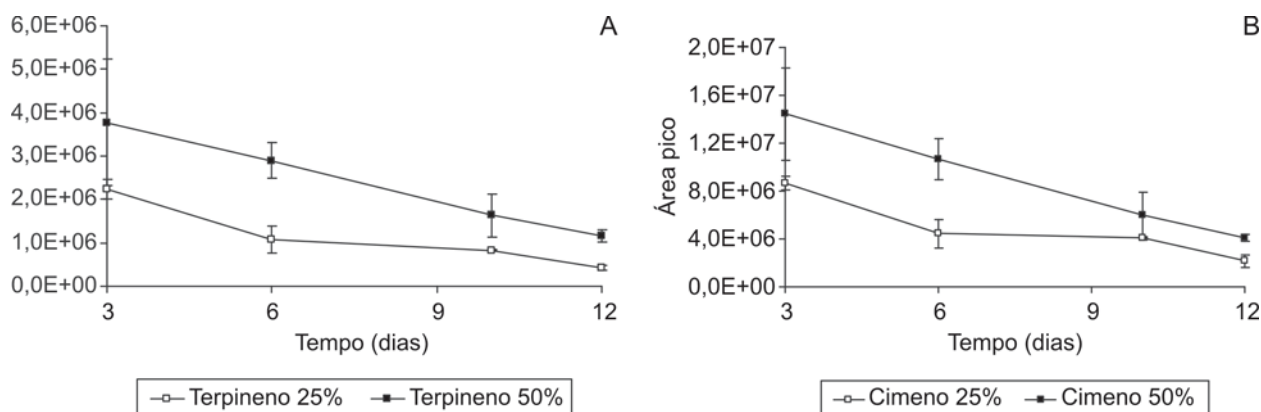
Figura 6. Crescimento de fungos filamentosos e leveduras em pizza pronta submetida aos diferentes tratamentos (controle, 0, 25 e 50%) durante 15 dias de estocagem a 7°C.

Por outra parte, a adição do óleo essencial de orégano não alterou a resistência dos filmes à tração no ponto de ruptura, os quais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle. No entanto, o valor da deformação no ponto de ruptura para o filme incorporado com 50% de óleo essencial de orégano foi significativamente maior ($p < 0,05$) que dos outros tratamentos. No entanto, em contraste com isso, estudos da porcentagem de deformação em filmes de natureza celulósica incorporados com compostos antimicrobianos apresentaram diminuição no valor dessa propriedade com o aumento na concentração do antimicrobiano incorporado. Desta forma, filmes celulósicos incorporados com nisina e nantamicina apresentaram valor de deformação de 0,72% (Pires *et al.*, 2008) e filme celulósico incorporado com 50% de pediocina teve o menor valor de deformação dos tratamentos avaliados, sendo esse de 1,58% (Santiago-Silva *et al.*, 2009). Portanto, sugere-se que o aumento na porcentagem de deformação é resultado da natureza do óleo essencial que age como um plastificante, tendo a penetração deste composto na matriz de resina celulósica, na concentração de 50%, provavelmente alterado a conformação das cadeias poliméricas, fornecendo ao filme maior maleabilidade, possibilitando, portanto, maior estiramento das cadeias.

Tabela 1. Valores médios e desvio-padrão de módulo de elasticidade, resistência no ponto de ruptura e deformação no ponto de ruptura dos filmes controle e incorporados com 25 e 50% de óleo essencial de orégano

Caracterização	Controle (50 μm de espessura)	25% óleo essencial de orégano (70 μm de espessura)	50% óleo essencial de orégano (70 μm de espessura)
Módulo de elasticidade (MPa)	2727,93 \pm 161,72 ^a	1783,84 \pm 206,37 ^b	1236,60 \pm 177,89 ^c
Resistência no ponto de ruptura (MPa)	26,16 \pm 0,86 ^a	25,45 \pm 3,08 ^a	23,90 \pm 1,89 ^a
Deformação no ponto de ruptura (%)	5,15 \pm 0,65 ^b	14,51 \pm 6,83 ^b	43,76 \pm 5,31 ^a

*Médias seguidas pela mesma letra no sentido horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

**Figura 7.** Valores da área do pico de γ -terpineno (A) e ρ -cimeno (B) para os tratamentos 25 e 50%, referente aos 12 dias de estocagem a 7°C.

Quantificação dos compostos voláteis

A Figura 7 mostra os resultados das áreas dos picos observadas nos cromatogramas. As análises no CG-MS mostraram comportamento semelhante para os compostos ρ -cyneme e γ -terpineno, precursores do timol e carvacrol, presentes no óleo de orégano, tendo a concentração de ambos diminuída com o tempo, possivelmente pela conversão desses compostos em timol e carvacrol.

Os resultados mostram que as concentrações de ρ -cimeno e γ -terpineno diminuíram de forma lenta como o tempo de estocagem sob refrigeração. Portanto, as concentrações de timol e carvacrol aumentaram, considerando que a diminuição na concentração de seus precursores, ρ -cimeno e γ -terpineno, ocorre em função de sua conversão em timol e carvacrol, os quais apresentam atividade antimicrobiana (Aligiannis *et al.*, 2001). A formação lenta desses compostos associada à sua permeabilidade por meio das embalagens pode estar relacionada à baixa ação antimicrobiana apresentada pelos filmes na temperatura de 7°C, levando, conseqüentemente, à pequena redução na contagem de microrganismos nos últimos dias de estocagem. O óleo essencial só teria ação efetiva depois de atingidas concentrações maiores de timol e carvacrol, o que leva certo tempo devido a necessidade de conversão de um composto em outro, bem

como ao uso de temperaturas de estocagem maiores que 7°C, que facilitaria a formação e volatilização dos compostos antimicrobianos.

CONCLUSÕES

O óleo essencial de orégano tem se apresentado como alternativa potencial na substituição de compostos sintéticos antimicrobianos. Os resultados mostraram ação inibitória *in vitro* do crescimento de *Penicillium spp.* e *S. aureus*, nas respectivas temperaturas ótimas de crescimento desses microrganismos, o que permitiu formação dos compostos responsáveis pela ação antimicrobiana de forma mais rápida e eficiente.

No entanto, são necessárias concentrações muito maiores para alcançar a mesma eficiência quando aplicados na pizza. Desse modo, são imprescindíveis novos testes para definir a capacidade de volatilização do óleo essencial de orégano na matriz alimentícia e conseqüente saturação do *head space* da embalagem original com temperaturas de estocagem, bem como a velocidade de produção dos compostos ativos em diferentes temperaturas. Certamente estudos relacionando o tipo de matriz para incorporação do óleo e produção do filme, bem como a temperatura em que o alimento será exposto, são características importantes para avaliar a eficiência antimicrobiana do composto.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, ao CNPq, à FAPEMIG e FINEP.

REFERÊNCIAS

- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S & Chinou BI (2001) Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49:4168-4170.
- Brasil (2007) Resolução nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acessado em: 23 maio de 2007.
- Brasil (2005) Resolução nº 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 23 de setembro de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acessado em: 16 maio de 2007.
- FDA (2006) Food and Drug Administration. Department Of Health And Human Services. Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates) In.: Substances generally recognized as safe. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=582.20>> Acessado em: 19 junho de 2007.
- Freitas WC, Souza EL, Sousa CP & Travassos AER (2004a) Ocorrência de *Staphylococcus* em massa refrigerada tipo pizza pronta. *Higiene Alimentar*, 122:67-70.
- Freitas WC, Souza EL, Sousa CP & Travassos AER (2004b) Aspectos sanitários de massas de pizza refrigeradas e da utilização de microondas como agente redutor da contaminação microbiana. *Higiene Alimentar*, 123:67-71.
- Gill AO, Delaquis P, Russo P & Holley RA (2002) Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. *International Journal of Food Microbiology*, 73:83-92.
- Karpouhtsis I, Pardali E, Feggou E, Kokkini S, Scouras ZG & Mavragani-Tsipidou P (1998) Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46:1111-1115.
- Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ & Nychas GJE (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91:453-462.
- Leistner L (1978) Hurdle effect and energy saving. In: Downey, W.K. (Eds.) *Food Quality and Nutrition*. London, Applied Science Publishers. p.553.
- Oliveira LM, Alves RMV, Sarantópolis CIGL, Padula M, Garcia EEC & Coltro L (1996) Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Centro de Tecnologia de Embalagem (CETEA). Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). p.120-121.
- Oussallah M, Caillet S, Salmieri S, Saucier L & Lacroix M (2004) Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52:5598-5605.
- Pinho BH & Furlong EB (2000) The occurrence of molds, yeasts and mycotoxins in pre-cooked pizza dough sold in southern Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31:99-102.
- Pinho BH, Machado MIF & Furlong EB (2001) Propriedades físico-químicas das massas de pizza semiprontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60:35-41.
- Pires ACS, Soares NFF, Andrade NJ, Silva LHM, Camilloto GP & Bernardes PC (2008) Development and Evaluation of Active Packaging for Sliced Mozzarella Preservation. *Packaging Technology and Science*, 21:375-383.
- Rhayour K, Bouchikhi T, Tantaoui-Elaraki A, Sendide K & Remmal A (2003) The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Essential Oil Research*, 15:356-362.
- Santiago-Silva P, Soares NFF, Nóbrega JE, Júnior MAW, Barbosa KBF, Volp ACP, Zerdas ERMA & Würlitzer NJ (2009) Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA_ 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20:85-89.
- Seydim AC & Sarikus G (2006) Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39:639-644.
- Shelef LA (1983) Antimicrobial effects of spices. *Journal of Food Safety*, 6:29-44.
- Souza EL, Stamford TLM & Lima EO (2006) Sensitivity of Spoiling and Pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (*Lamiaceae*) essential oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37:527-532.
- Tassou C, Drosinos EH & Nychas GJE (1995) Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 °C and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology*, 78:593-600.
- Tsigarida E, Skandamis P & Nychas GJE (2000) 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 °C. *Journal of Applied Microbiology*, 89:901-909.
- Vanderzant C, & Splittstoesser DF (1992) Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3^a ed. American Public Health Association. p.1219.
- WHO, Food safety and foodborne illness (2002) World Health Organization Fact sheet. Geneva, Revised January 2002. 237p.