

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE FILME ATIVO
INCORPORADO COM ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO
(*ORIGANUM VULGARE* L.) NO CRESCIMENTO DE *LISTERIA
INNOCUA* EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

**Development and evaluation of active film incorporated with oregano essential oil
(*Origanum vulgare* L.) on *Listeria innocua* growth in "Minas frescal" cheese**

Nilda de Fátima F. Soares¹
Paula Santiago-Silva²
Washington Azevedo da Silva²

RESUMO

Queijo Minas frescal constitui um alimento susceptível ao crescimento de muitos patógenos e tem sido freqüentemente associado a doenças de origem alimentar em vários países. Filmes antimicrobianos constituem uma maneira eficaz de controlar microrganismos deterioradores e patógenos de origem alimentar, aumentando a segurança alimentar e reduzindo a deterioração do produto. No presente estudo, filmes antimicrobianos incorporados com óleo essencial (OE) de orégano (objeto de patente) foram avaliados quanto à sua capacidade de controlar o crescimento de *Listeria innocua* "in vitro" e em contato com o queijo Minas frescal. Filmes incorporados com diferentes concentrações do OE de orégano ocasionaram uma redução variando de 0,5 a 1,0 ciclo log em relação ao tratamento com filme controle (sem adição do antimicrobiano), indicando a sua eficiência em inibir o crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal. Quanto maior a concentração de OE incorporada no filme na faixa testada, maior foi a ação antimicrobiana contra a *Listeria innocua*.

Palavras-chave: orégano, filme antimicrobiano, conservação de alimentos, queijo Minas frescal, *Listeria innocua*

1 INTRODUÇÃO

O queijo Minas frescal é um dos produtos lácteos mais apreciados no Brasil. É um queijo branco, fresco e macio, que não sofre processo de maturação, produzido por coagulação do leite pasteurizado, com alto pH e conteúdo de umidade (>55%) e baixa porcentagem de sal (1,4-1,6%) (CARVALHO et al., 2007). Constitui um queijo para o consumo imediato, de curta vida de prateleira, mesmo sob refrigeração, e muito susceptível a contaminações microbianas (ROCHA et al., 2006).

Devido à simplicidade da tecnologia empregada em sua manufatura, o queijo Minas frescal é largamente produzido de forma artesanal e muitas vezes exposto a condições adversas durante a comercialização, comprometendo a sua qualidade (SOUZA et al., 2007). Assim, constitui

um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e a contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças veiculadas por alimentos (FEITOSA et al., 2003).

Por constituir um meio favorável ao crescimento de muitos patógenos, o queijo Minas frescal tem sido freqüentemente associado a doenças de origem alimentar e a contaminação por *Listeria monocytogenes* tem recebido atenção especial (CARVALHO et al., 2007). Surtos de listeriose resultantes do consumo de queijos contaminados têm levado a preocupação sobre o perigo que essa bactéria representa. Apesar de a *Listeria* ser inativada sob condições normais de pasteurização, problemas podem surgir a partir de contaminação pós-pasteurização e por ser um microrganismo psicotrófico, que pode crescer a

1 Professora Associada, Laboratório de Embalagens, DTA/UFV. nfsoares@ufv.br
2 Doutorandos, Laboratório de Embalagens, DTA/UFV.

baixas temperaturas, o seu crescimento em queijos contaminados pode ocorrer (SILVA et al., 2003).

Produtos perecíveis, como o queijo Minas frescal, requerem proteção contra o crescimento microbiano durante a sua vida de prateleira. Técnicas alternativas de preservação vêm sendo estudadas a fim de assegurar a qualidade e segurança dos alimentos. Uma nova tendência em alimentos consiste em usar as embalagens com o intuito de ampliar esta margem de segurança (APPENDINI & HOTCHKISS, 2002). Embalagens antimicrobianas constituem uma forma de embalagens ativas que atuam de forma a reduzir, inibir ou retardar o crescimento de microrganismos que possam estar presentes no alimento embalado. Algumas formas de embalagens antimicrobianas incluem a adição de sachês contendo agentes antimicrobianos voláteis nas embalagens, aplicação de revestimentos comestíveis contendo a substância antimicrobiana e a incorporação de agentes antimicrobianos diretamente ao material da embalagem.

Compostos antimicrobianos vêm sendo incorporados em materiais de embalagens a fim de se controlar o crescimento microbiano durante a estocagem de alimentos (OUSSALAH et al., 2004). A aplicação de antimicrobianos em filmes plásticos tem se revelado uma tecnologia promissora, uma vez que a maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos apresenta crescimento microbiano em sua superfície. Desta forma, a substância antimicrobiana, ao estabelecer um intenso contato com o alimento, inibe o crescimento dos microrganismos aí presentes (SILVEIRA, 2005).

Os óleos essenciais (OE) de produtos vegetais, por constituírem fontes de compostos biologicamente ativos, vem sendo bastante estudados e o uso destas substâncias como agentes antimicrobianos tem despertado o interesse de pesquisadores em diversos países (LOPEZ et al., 2005).

Diversos relatos na literatura sobre o potencial antimicrobiano de especiarias apresentam o orégano como sendo um potente agente inibidor de bactérias e fungos contaminantes de alimentos. MARINO et al. (2001), citado por SOUZA et al. (2005), ao analisarem o efeito antimicrobiano de várias especiarias encontraram que o OE de orégano foi o mais efetivo na inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, causando um alongamento da fase lag. Ainda, entre as cepas Gram-positivas, *L. monocytogenes* foi a mais sensível. SAHIN et al. (2003), citado por SOUZA et al. (2005), conduziram um estudo pra avaliar a efetividade antibacteriana do OE de orégano sobre uma série de bactérias de interesse em alimentos e observaram que este foi efetivo

na inibição da grande maioria das bactérias ensaiadas.

Algumas frações do OE de orégano têm se revelado eficientes contra uma série de bactérias de interesse em alimentos (OUSSALAH et al., 2004). O OE de orégano é rico em compostos fenólicos, responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana devido à sua capacidade de penetrarem o interior da célula e interagirem com os mecanismos do metabolismo microbiano. Carvacrol e timol são os compostos fenólicos presentes em maior quantidade no OE de orégano e os principais responsáveis pela sua intensa atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2005).

Não existem na literatura relatos sobre a atuação de filmes antimicrobianos sobre a microbiota contaminante de queijo Minas frescal. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a eficiência antimicrobiana de filmes incorporados com OE de orégano no crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção dos filmes:

Os filmes antimicrobianos (patente requerida) foram produzidos pela incorporação do OE de orégano em duas concentrações: filme 1- menor concentração; filme 2- maior concentração. Os filmes controle foram produzidos sem a adição do OE de orégano.

2.2 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos filmes

A avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes foi realizada pelo método do halo, segundo metodologia descrita por PIRES (2006), e sua eficiência testada contra *Listeria innocua*.

Uma cultura pura de *Listeria innocua* (ATCC 33090) (Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi ativada até atingir um número aproximado de 10^8 células viáveis/mL, diluída em solução peptonada 0,1% até a concentração de 10^6 células/mL e inoculada em placas de Petri (duplicata) contendo meio de cultura seletivo, ágar Oxford Modificado (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA). Em seguida, os filmes antimicrobianos, medindo 1 cm de diâmetro e previamente esterilizados em câmara com lâmpada ultravioleta (UV), foram colocados sobre as placas inoculadas, as quais foram incubadas a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 horas. Após o período de incubação, verificou-se a atuação dos filmes sobre o crescimento de *Listeria innocua*. O mesmo procedimento foi realizado com o filme controle (sem a adição do OE de orégano).

2.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em queijo Minas frescal

Queijos Minas frescal foram produzidos industrialmente, no laticínio da Universidade Federal de Viçosa, pelo processo tradicional de adição de cultura lática. As bactérias ácido-láticas são adicionadas para produzir ácido lático, o qual oferece proteção microbiana, melhora a coagulação ácida e facilita a remoção do soro do coalho (CARVALHO et al., 2007).

A avaliação da atividade antimicrobiana de filmes contendo OE orégano sobre queijos foi feita mediante um teste de desafio. Para isto, os queijos foram mergulhados em solução peptonada 0,1% contendo, aproximadamente, 10^3 células/mL de *Listeria innocua* durante 10 minutos.

O experimento foi montado cobrindo-se os queijos previamente contaminados, em suas superfícies superior e inferior, com os filmes antimicrobianos e o controle, recortados nas mesmas dimensões da superfície do queijo (10 cm de diâmetro) e submetidos à luz UV. Esses sistemas foram acondicionados em sacos de polietileno de baixa densidade (PEBD), selados (Figura 1) e estocados a $7 \pm 1^\circ\text{C}$, simulando condições de temperaturas em refrigeradores, até o momento das análises.

Os queijos inoculados e em contato com os

filmes foram submetidos a análises microbiológicas, tendo sido efetuadas as contagens de *Listeria innocua* nos tempos 0, 4, 8 e 12 dias de estocagem. As análises foram realizadas conforme metodologia recomendada pela APHA (2004). Ao final do experimento foi feita uma análise descritiva dos resultados obtidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana dos filmes

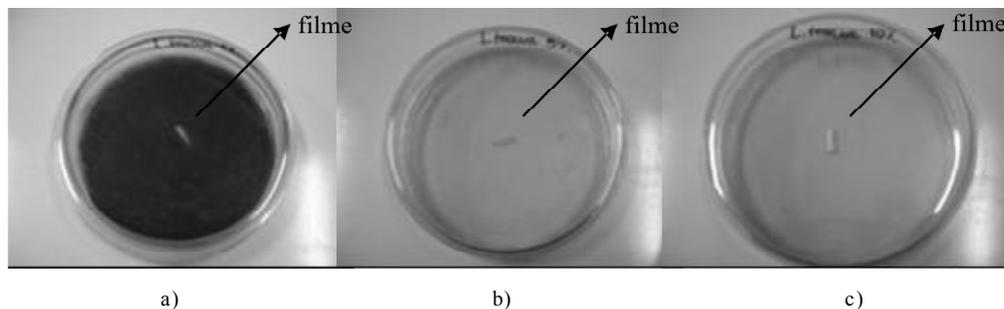
Verificou-se total inibição da *Listeria innocua* para os filmes antimicrobianos incorporados com OE de orégano em relação ao filme controle. A ação do OE de orégano, por conter compostos antimicrobianos voláteis, possibilitou a formação de uma atmosfera gasosa deste componente no interior das placas (Figura 2).

LÓPEZ et al. (2005), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de alguns tipos de OE sobre microrganismos de origem alimentar, mediante dois tipos de contato, sólido e difusão do vapor, encontraram que os óleos na fase vapor apresentaram maior atividade antimicrobiana, constituindo uma alternativa promissora no controle do crescimento de microrganismos em alimentos embalados.

Figura 1 - Aplicação dos filmes produzidos sobre queijos Minas frescal embalados em sacos de PEBD.



Figura 2 – Atividade dos filmes controle (a), filme 1 (b) e filme 2 (c) sobre o crescimento de *Listeria innocua*.



3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes em queijo Minas frescal

Os resultados referentes à ação do filme controle e dos filmes 1 e 2 (com OE de orégano) sobre a microbiota inoculada no queijo Minas frescal encontram-se ilustrados na Figura 3.

Verificou-se um aumento nas contagens de *Listeria innocua* ao longo do período de estocagem para os três tratamentos (controle, filme 1 e filme 2). Estes incrementos na população microbiana devem-se, provavelmente, à capacidade destes microrganismos psicrotróficos desenvolverem-se à temperatura de armazenamento empregada no presente estudo (7°C).

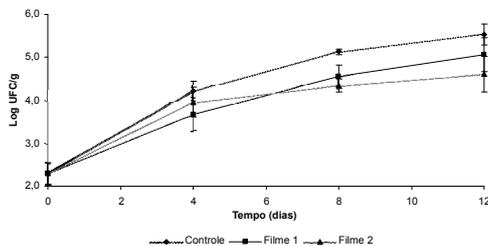


Figura 3 - Efeito da concentração do OE de orégano sobre a contagem de *Listeria innocua* em queijo Minas frescal estocado durante 12 dias à temperatura de 7°C.

Entretanto, contagens menores de *Listeria innocua* foram observadas para os tratamentos com filmes antimicrobianos em relação ao com filme controle em todos os tempos de análise, indicando a atividade antimicrobiana dos filmes produzidos com OE de orégano frente ao crescimento do referido microrganismo.

Ao final do período de estocagem (12º dia), verificou-se uma redução de 0,5 e 1,0 ciclo log nos queijos acondicionados em presença dos filmes 1 e 2 (com OE de orégano), respectivamente, em relação ao controle, confirmando o potencial de utilização do OE de orégano como agente antimicrobiano. A maior ação do filme 2 deveu-se a concentração maior de OE de orégano incorporada e, portanto, maior concentração dos componentes voláteis no 'headspace' da embalagem.

SKANDAMIS et al. (2002), citado por SOUZA et al. (2005), observaram que a adição de OE de orégano em filés de carne bovina, conjuntamente com o uso de embalagens com atmosferas modificadas, resultou em uma redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos da população de *Salmonella typhimurium*, partindo-se de um inóculo de 5 log₁₀ UFC/g a uma temperatura de 5°C.

4 CONCLUSÕES

Os filmes incorporados com OE de orégano apresentaram efeito antimicrobiano *in vitro*, tendo ocorrido total inibição do crescimento de *Listeria innocua* na presença desses filmes.

Na avaliação dos filmes antimicrobianos em contato com o queijo Minas frescal, eles foram novamente eficazes na inibição do crescimento de *Listeria innocua*, tendo apresentado uma redução de 0,5 a 1,0 ciclo log em relação à microbiota presente no tratamento controle, ao final dos 12 dias de estocagem a 7°C. Quanto maior a concentração de OE de orégano na faixa incorporada nos filmes, maior foi a ação na inibição da *Listeria innocua*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq, FAPEMIG e FINEP, pelos apoios financeiros recebidos.

ABSTRACT

"Minas frescal" cheese constitute a suitable medium for the growth of many pathogens and have frequently been associated with several food-borne diseases in many countries. Antimicrobial films may provide an effective way to control food-borne pathogens and spoilage microorganisms, thus enhance food safety and decrease product spoilage. In this work, antimicrobial films incorporated with oregano essential oil (EO) (patent required) were analyzed by their efficiency to control the growth of *Listeria innocua* "in vitro" and in contact with "Minas frescal" cheese. Films incorporated with different concentrations of oregano EO occasioned a reduction between 0.5 to 1.0 log cycle in relation to treatment with control film (without addition of the antimicrobial), indicating their efficiency in reducing the growth of *Listeria innocua* in "Minas frescal" cheese. As higher the concentration of EO incorporated in the range tested higher was the antimicrobial efficiency against *Listeria innocua*.

Keywords: oregano, antimicrobial film, food preservation, "Minas frescal" cheese, *Listeria innocua*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPENDINI, P.; HOTCHKISS, J.H. Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 3, p. 113-126, 2002.

CARVALHO, J.D.G.; VIOTTO, W.H.; KUAYE,

- A.Y. The quality of Minas frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, p. 262–267, 2007.
- FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU R.T.; AZEVEDO E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23 (Supl), p. 162-165, dez. 2003.
- LÓPEZ, P.; SANCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERIN, C. Solid- and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 6939-6946, 2005.
- OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIERI, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. 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**, v. 52, p. 5598-5605, 2004.
- PIRES, A.C.S. **Desenvolvimento e avaliação de filmes e sachê antimicrobianos na conservação de queijo mussarela fatiado**. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2006. 73 p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.
- SALMIERI, S.; LACROIX, M. Physicochemical properties of alginate/polycaprolactone-based films containing essential oils. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 54, p. 10205-10214, 2006.
- SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALVES, M.A.O.; ALMEIDA, P.F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241–248, 2003.
- SILVEIRA, M.F.A. **Filme antimicrobiano incorporado com ácido sórbico na conservação de massa de pastel**. Viçosa: Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. 2005. 64 p. (Tese, Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).
- SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA-FILHO, J.M. Orégano (*Origanum vulgare* L. lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.
- SOUZA, T.B. et al., Microscopic quality indicators of Minas frescal cheese. **Food Control** (2007), doi:10.1016/j.foodcont.2007.02.004.