

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**Mariana Pereira Silveira**

**DESEMPENHO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E  
LOURO EM BOLORES DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS**

**Diamantina**

**2019**



**Mariana Pereira Silveira**

**DESEMPENHO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E  
LOURO EM BOLORES DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito para obtenção do título de Mestra.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Schmiele  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Franciele Maria Pelissari  
Molina

**Diamantina**

**2019**



Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S587

Silveira, Mariana Pereira

Desempenho antifúngico de óleos essenciais de canela, cravo e louro em bolores de pães de forma integrais / Mariana Pereira Silveira, 2019. 143 p. : il.

Orientador: Marcio Schmiele

Coorientadora: Franciele Maria Pelissari Molina

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Eugenol. 2. Cineol. 3. Linalol. 4. Bolores. 5. Panificação. I. Schmiele, Marcio. II. Molina, Franciele Maria Pelissari. III. Título. IV. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 664**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468



MARIANA PEREIRA SILVEIRA

**DESEMPENHO ANTIFÚNGICO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA,  
CRAVO E LOURO EM BOLORES DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS**

Dissertação apresentada ao  
MESTRADO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, nível  
de MESTRADO como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
MESTRIA EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Orientador (a): Prof. Dr. Marcio  
Schmiele

Co-orientadora: Prof. Dr. Franciele  
Márcia Pelissari Molina

Data da aprovação : 17/07/2019

  
Prof. Dr. MARCIO SCHMIELE - UFVJM

  
Prof. Dr.ª FRANCIELE MÁRCIA PELISSARI MOLINA - UFVJM

  
Prof. Dr.ª MARIA TERESA PEDROSA SILVA CLÉRIGHI - UNICAMP

  
Prof. Dr.ª GISELLE PEREIRA CARDOSO - UFVJM

DIAMANTINA





*Aos meus pais, Dalmy e Neusa, e ao meu irmão, Marco Túlio, fonte de inspiração e força  
para minha vida.*

**Dedico.**



## AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me conduzido e dado forças para superar os desafios dessa jornada.

Aos meus pais, Dalmy e Neusa, pelo amor incondicional, apoio, paciência e doação.

Ao meu irmão, Marco Túlio, por cada palavra de incentivo e por sempre vibrar com as minhas conquistas.

À todos os meus familiares pelo carinho, apoio e torcida. Em especial, às minhas avós, Ilda e Josefa, pelo afeto e pelas orações.

Aos meus amigos de Coluna, em especial à Ágda, que apesar da distância está constantemente presente em minha vida.

Ao meu orientador, Marcio, pelos ensinamentos e sobretudo pela amizade. Obrigada por me fazer crescer pessoal e profissionalmente. Não tenho palavras para agradecer o apoio, paciência e confiança em mim depositados.

À minha coorientadora, Franciele, pelo acompanhamento e suporte. Agradeço pela disponibilidade e pelo empenho em contribuir com minha formação acadêmica.

Às colegas do PPGCTA e à equipe do Laboratório de Tecnologia de Cereais, que tornaram meus dias mais leves. Míriam, Paula, Nayara, Amanda Lélis, Bruna, Juliana, Karine e Letícia, agradeço pela convivência e suporte na realização da pesquisa.

Aos membros da banca pela colaboração com a conclusão do trabalho.

Aos professores do Instituto de Ciência e Tecnologia e do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos por contribuírem com o seu conhecimento.

Aos companheiros de jornada e amigos que fiz em Diamantina pela convivência, em especial, Luana, Letícia, Priscila e Amanda, pela amizade e carinho.

Aos técnicos dos Laboratórios do ICT e do Bloco da Engenharia de Alimentos, Tiago, Keyla, Maraísa, Nathália, Ilva e Emanuel pelo apoio, atenção e pela assistência nas análises.

Às minhas grandes amigas e companheiras de casa, Isabela e Ana Laura, que em momentos diferentes representaram minha família em Diamantina.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e pós-graduação.

À CAPES pelo suporte financeiro (código de financiamento 001) e pela concessão da bolsa de estudos.



## RESUMO

A exigência do mercado consumidor atual pela substituição de aditivos químicos por biopreservadores alternativos tem impulsionado os estudos envolvendo a utilização de conservantes naturais. Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de plantas que podem atuar como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, antioxidantes, anti-inflamatórios e inseticidas. Os produtos de panificação, especialmente pães integrais, são altamente susceptíveis a deterioração por fungos, o que exige a utilização de algum tipo de conservante para extensão da vida-de-prateleira. Além disso, existe uma crescente demanda de embalagens ativas antimicrobianas que podem ser utilizadas neste tipo de alimento. Diante disso, este estudo objetivou: (i) isolar e identificar bolores de pães de forma integrais; (ii) determinar a melhor proporção de OEs de canela (*Cinamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e louro (*Laurus nobilis*) para inibição destes micro-organismos, através de avaliação da atividade antifúngica in vitro; (iii) aplicar uma mistura otimizada dos 3 OEs em pães de forma integrais pelos métodos de adição à massa e aspersão na superfície, com o objetivo de retardar o desenvolvimento de bolores deteriorantes; (iv) produzir e caracterizar um filme antimicrobiano otimizado de amido de mandioca, gelatina e amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado, adicionado de OEs de canela, cravo e louro. Os resultados indicaram a presença de fungos dos gêneros *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, e *Rhizopus spp.* O volume otimizado de OEs para inibição do crescimento fúngico foi de 11,77  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  de inóculo, contendo 34,2 % de OE de canela, 42,5 % de OE de cravo e 23,3 % de OE de louro. Com a adição direta de OEs à massa dos pães (0 a 1,42  $\mu\text{L}$  OEs/g massa) a vida-de-prateleira foi insatisfatória, com apenas 7 dias de durabilidade. Entretanto, a aplicação da mistura de OEs na superfície dos pães na concentração de 3,0  $\mu\text{L}$  OEs/g massa resultou em pães integrais com vida útil de 22 dias, mantidas as propriedades de conservação, textura instrumental e umidade adequadas, quando comparadas aos tratamentos controle. As melhores propriedades físicas foram obtidas para um filme otimizado contendo 65,8 % de amido de mandioca e 34,2 % de gelatina. Os resultados mostraram ainda que o filme contendo 0,97 % de OE de canela e 0,01 % de OE de cravo (com base na solução filmogênica) apresentou maior inibição no desenvolvimento de bolores isolados dos pães, mantendo-se viáveis as propriedades físicas e mecânicas dos filmes.

**Palavras-chave:** eugenol, cineol, linalol, bolores, panificação, antimicrobianos naturais, rótulo limpo, halo de inibição.



## ABSTRACT

The current consumer market's demand for replacement of chemical additives by alternative biopreservatives has been driving studies involving the use of natural preservatives. Essential oils (EOs) are secondary metabolites produced by certain plant species that can act as antibacterial, antiviral, antifungal, antioxidant, anti-inflammatory and insecticide agents. Bakery products, especially whole-grain breads, are highly susceptible to fungal spoilage, which requires the use of some kind of preservative for shelf-life extension. In addition, there is an increasing demand for active antimicrobial packaging which can be used in this type of food. Therefore, this study aimed to: (i) isolate and identify whole-grain bread molds; (ii) determine the best proportion of EOs of cinnamon (*Cinamomum cassia*), clove (*Eugenia caryophyllus*) and laurel (*Laurus nobilis*) through evaluation of in vitro antifungal activity; (iii) applying an optimized blend of 3 EOs in whole-grain breads by direct addition to the dough and surface spraying methods, in order to delay the development of spoilage molds; (iv) produce and characterize an optimized cassava starch, gelatin and crosslinked hydroxypropylated cassava starch film with antimicrobial properties, added with cinnamon, clove and laurel OEs. The results indicated the presence of *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, and *Rhizopus spp* fungi genus. The optimum volume of EOs for inhibition of fungal growth was 11.77  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  of inoculum, containing 34.2 % EO of cinnamon, 42.5 % of EO clove and 23.3 % of EO of laurel. With the direct addition of EOs to the bread dough (0 to 1.42  $\mu\text{L}$  EOs / g of dough) the shelf-life was unsatisfactory, with only 7 days of durability. However, the application of EO mixture on the surface of the loaves in the concentration of 3.0  $\mu\text{L}$  EO / g of dough resulted in wholemeal loaves with a 22-days of shelf life, maintaining adequate conservation, texture and moisture properties when compared to control treatments. The best physical properties were obtained for an optimized film containing 65.8 % cassava starch and 34.2 % gelatin. The results also showed that the film containing 0.97 % EO of cinnamon and 0.01 % of EO of clove (on the film-forming solution basis) presented greater inhibition on the development of molds, keeping the viability of the physical and mechanical properties of the films.

**Keywords:** eugenol, cineol, linalool, baking, molds, natural antimicrobials, clean label, inhibition zone.





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Referências .....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Objetivo Geral .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO I: ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES NATURAIS EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO - UMA REVISÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Introdução .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Contaminação microbiana em produtos de panificação.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3 Compostos majoritários e mecanismo de ação antifúngica de óleos essenciais .....</b>	<b>27</b>
<b>3.4 Estudos in vitro com óleos essenciais na inibição de fungos deteriorantes de produtos de panificação .....</b>	<b>30</b>
<b>3.5 Óleos essenciais em produtos de panificação avaliados in situ.....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Óleos essenciais em embalagens ativas para produtos de panificação .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6 Conclusões e perspectivas futuras.....</b>	<b>39</b>
<b>3.7 Referências .....</b>	<b>40</b>
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO II: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E LOURO SOBRE BOLORES DE PÃO DE FORMA INTEGRAL.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1 Introdução .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Material e métodos .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.1 Formulação dos pães .....</b>	<b>51</b>
<b>4.2.2 Preparo do inóculo .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.3 Identificação microscópica e macroscópica dos bolores .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2.4 Delineamento experimental .....</b>	<b>52</b>

4.2.5 Método de disco-difusão por poço .....	53
4.2.6 Concentração inibitória mínima e concentração mínima letal a partir do ponto otimizado.....	54
4.2.7 Análise estatística .....	54
4.3. Resultados e discussão .....	54
4.3.1 Identificação microscópica e macroscópica dos fungos.....	54
4.3.2 Avaliação do delineamento experimental .....	56
4.3.3 Validação dos modelos matemáticos .....	66
4.3.4 Concentração inibitória mínima e mínima letal.....	68
4.4 Conclusões.....	68
4.5 Referências.....	69
<b>5 ARTIGO CIENTÍFICO III: ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E LOURO COMO CONSERVANTES DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS - APLICAÇÃO IN SITU.....</b>	<b>73</b>
5.1 Introdução.....	75
5.2 Material e métodos .....	76
5.2.1 Matérias-primas e formulação.....	76
5.2.2 Composição centesimal e propriedades reológicas da farinha de trigo integral reconstituída .....	77
5.2.3 Adição de óleos essenciais à massa .....	77
5.2.4 Aplicação de óleos essenciais na superfície .....	78
5.2.5 Caracterização dos pães .....	79
5.3 Resultados e discussão.....	81
5.3.1 Composição centesimal e propriedades reológicas da farinha de trigo integral reconstituída .....	81
5.3.2 Aplicação na massa .....	82
5.3.3 Aplicação na superfície.....	87
5.4 Conclusões.....	97

5.5	Referências .....	98
6	<b>ARTIGO CIENTÍFICO IV: EMBALAGEM ATIVA BIODEGRADÁVEL DE AMIDO DE MANDIOCA E GELATINA ADICIONADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS EM BOLORES ISOLADOS DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS.....</b>	<b>101</b>
6.1	Introdução .....	103
6.2	Material e métodos.....	105
6.2.1	Planejamento de misturas para os biopolímeros utilizados na elaboração dos filmes .....	105
6.2.2	Produção dos filmes.....	106
6.2.3	Caracterização dos filmes .....	107
6.2.4	Delineamento composto central rotacional para avaliação da atividade antifúngica do filme otimizado adicionado dos óleos essenciais.....	109
6.3	Resultados e discussão.....	111
6.3.1	Planejamento de misturas para os biopolímeros utilizados na elaboração dos filmes .....	111
6.3.2	Delineamento composto central rotacional para avaliação da atividade antifúngica do filme otimizado adicionado dos óleos essenciais.....	120
6.3.3	Características dos filmes otimizados .....	128
6.4	Conclusão .....	131
6.5	Referências .....	131
7	<b>CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>137</b>



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Os produtos de panificação frescos apresentam alta perecibilidade e sensibilidade às práticas de estocagem e distribuição. Entre os pães, destaca-se o pão integral, com perecibilidade ainda maior em função da presença da estrutura morfológica externa do grão de trigo, denominada de pericarpo, o qual apresenta-se como um grande carreador de micro-organismos presentes no grão de trigo (Santos, 2015).

Dentre os métodos de conservação, na área de panificação, o mais usado é a adição de conservantes químicos à massa ou aspergidos à superfície dos pães como o propionato de cálcio e o sorbato de potássio, respectivamente. Apesar de serem os mais indicados e permitidos por legislação, os inibidores possuem efeitos colaterais eventualmente tóxicos (Pereira et al., 2002).

Garantir a segurança e atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade têm resultado na crescente busca por conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos, que possam ser utilizados de forma isolada ou em combinação com outra tecnologia de conservação (Settanni; Corsetti, 2008).

O interesse das indústrias de alimentos por matérias-primas de origem natural vem impulsionando a pesquisa por produtos como os óleos essenciais (OEs), objetivando o seu isolamento, caracterização e o estudo das suas propriedades tecnológicas, nutricionais, sensoriais e bioativas (Burt, 2004).

Os OEs são derivados de plantas utilizadas como condimentos e representam complexas misturas de substâncias naturais voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas principalmente através de destilação por arraste com vapor d'água. Os componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres e ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações, em que um composto ativo é majoritário (Simões; Spitzer, 2000). propriedades terapêuticas e aromáticas dos OEs, em geral, se devem à presença de monoterpênicos, sesquiterpenos e de fenilpropanóides entre outros compostos voláteis que estão relacionados à ação antibacteriana, atividades antifúngica e inseticida (Bakkali et al., 2008).

O cravo (*Eugenia caryophyllus*) é uma planta arbórea de odor fortemente aromático e sabor característico, que contém óleo essencial constituído majoritariamente por eugenol, que possui ação antifúngica e antioxidante. O óleo essencial de canela

(*Cinnamomum cassia*), cujos compostos principais são linalol e cinamaldeído, também é conhecido por apresentar efeito antimicrobiano e antioxidante, o que justifica seu uso em diversas aplicações farmacológicas e alimentícias (Amara et al., 2008). O louro (*Laurus nobilis*), por sua vez, é um condimento bastante apreciado em pratos típicos brasileiros, que contém aproximadamente 1,5 % a 2 % de óleo volátil nas folhas. O principal componente é o 1,8-cineol, composto que apresenta atividade antisséptica e antifúngica (Santoyo et al., 2006).

Muitos testes *in vitro* mostraram boa eficiência dos OEs contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Contudo, pesquisas com a aplicação direta na matriz alimentícia ainda são escassas e em alguns casos têm mostrado impactos sensoriais indesejáveis (Císarová et al., 2018). Dessa forma, deve-se avaliar a forma de aplicação, a complexidade do alimento e as interações dos OEs com o mesmo para viabilizar o uso destes biopreservadores.

Os OEs são considerados ingredientes interessantes para embalagens de alimentos biodegradáveis, principalmente devido a sua origem natural e suas propriedades funcionais (antioxidante/antimicrobiano), podendo prolongar o prazo de validade dos produtos. No entanto, a inclusão em filmes e revestimentos pode implicar algum impacto em várias propriedades (físicas, ópticas e mecânicas) do sistema afetando a aceitabilidade do consumidor (Atares; Chiralt, 2016).

Dessa forma, a utilização de OEs pode ser uma alternativa viável tanto para alterar as características sensoriais dos alimentos, quanto na ação sobre o prolongamento da vida útil dos mesmos. Sendo assim, diferentes proporções e formas de aplicação podem ser utilizadas para retardar e/ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes, atendendo aos requisitos tecnológicos e nutricionais, promovendo a segurança alimentar e aceitação dos consumidores.

## 1.1 Referências

AMARA, A. A.; EL-MASRY, M. H.; BOGDADY, H. H. Plant crude extracts could be the solution: Extracts showing *in vivo* antitumorigenic activity. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.21, p.159-171, 2008.

ATARES, L.; CHIRALT, A. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. **Trends in Food Science & Technology**, v.48, p.51-62, 2016.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446–75, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223– 253, 2004.

CÍSAROVÁ, M.; HLEBA, L.; TANČINOVÁ, D.; FLORKOVÁ, M.; FOLTINOVÁ, D.; CHAROUSOVÁ, I.; VRBOVÁ, K.; BOŽIK, M.; KLOUČEK, P. Inhibitory effect of essential oils from some Lamiaceae species on growth of *Eurotium spp.* isolated from bread. **Journal Microbiology Biotechnology Food Science**, v.8, n.2, p.857-862, 2018.

PEREIRA, M.C.; SOUZA, S.M.C.; CUNHA, R.L.; ANGÉLICO, C. Conservação de produtos de panificação pela adição de condimentos em pó. **Ciência e Agrotecnologia**, ed. especial, p.1514-1520, 2002.

SANTOS, J. L. P. **Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SANTOYO, S. R.; LLORIA, L.; JAIME, E.; IBANEZ, F. J.; SENOR, G. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis*: Chemical and functional characterization. **European Food Research Technology**, v.222, p.565-571, 2006.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.121, p.123-138, 2008.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. **Óleos voláteis**. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, Cap.18, 2000.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Este trabalho visou avaliar o efeito antifúngico de óleos essenciais de cravo, canela e louro sobre os bolores de pães de forma integrais através de testes in vitro, in situ e em embalagem ativa biodegradável.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar fungos deteriorantes de pães de forma integrais;
- Analisar a viabilidade da utilização dos óleos essenciais como antifúngicos através de um Delineamento Composto Central Rotacional com 3 variáveis independentes;
- Otimizar as concentrações de óleos essenciais;
- Quantificar as proporções de óleos essenciais necessárias para melhor desempenho inibitório e/ou letal dos fungos;
- Realizar aplicação direta da mistura otimizada de óleos essenciais à massa de pães integrais, caracterizá-los e avaliar a vida de prateleira;
- Adicionar a mistura otimizada de óleos essenciais na superfície de pães integrais através de aspersão e avaliar a vida de prateleira;
- Produzir e caracterizar um filme biodegradável de amido de mandioca, gelatina e amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado com propriedades físicas adequadas, através de um Planejamento de Misturas Simplex Centroide;
- Otimizar as proporções de óleos essenciais com melhor efeito antifúngico no filme otimizado, através de um Delineamento Composto Central Rotacional;
- Avaliar os dados estatisticamente.



### **3 ARTIGO CIENTÍFICO I: ÓLEOS ESSENCIAIS COMO CONSERVANTES NATURAIS EM PRODUTOS DE PANIFICAÇÃO - UMA REVISÃO**

Mariana Pereira Silveira e Marcio Schmiele

#### **RESUMO**

*Histórico:* Garantir a segurança e atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade têm resultado na crescente busca por conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos. Associado a esta exigência do consumidor, há ainda os possíveis efeitos tóxicos de conservantes químicos utilizados para a extensão da vida de prateleira dos produtos, principalmente em relação à proteção contra a deterioração microbiana. Além disso, o apelo dos rótulos limpos tem ganhado destaque na manufatura e no desenvolvimento de produtos alimentícios, mesmo que o efeito tecnológico e sensorial destes bioconservadores ainda seja um desafio. Por estas razões, há estudos atuais sobre a aplicação de óleos essenciais (OEs), extratos e componentes de especiarias e outras plantas aromáticas como biopreservadores alternativos.

*Escopo e abordagem:* Em função das propriedades antifúngicas, a aplicação de OEs em produtos de panificação tem despertado interesse comercial, tendo em vista que os pães e as massas frescas são altamente perecíveis devido à alta atividade de água destes produtos, apresentando-se muito sensíveis e dependentes das práticas e dos métodos de conservação, estocagem e distribuição. Os principais micro-organismos deteriorantes encontrados em produtos de panificação são os bolores. O presente trabalho teve como objetivo fornecer uma revisão sistemática da literatura científica relacionada à estudos recentes sobre a aplicação de OEs para limitação ou prevenção do desenvolvimento de fungos deteriorantes e de micotoxinas em produtos de panificação. A aplicação abordada refere-se ao uso dos OEs como aditivos na formulação dos produtos, como proteção de superfície ou em embalagens ativas.

*Principais resultados e conclusões:* Os OEs são constituídos por substâncias bioativas com propriedades antifúngicas com aplicabilidade para conservação de produtos de panificação. A alta volatilidade, o preço elevado e o aroma intenso são características que restringem a sua utilização. Nesse sentido, é importante avaliar a dosagem, as formas de aplicação, os

diferentes mecanismos da ação antimicrobiana e efeitos do uso isolado e/ou combinado com outras tecnologias de conservação. Desta forma, torna-se possível o efeito inibitório ou retardante contra micro-organismos deteriorantes, mantendo características tecnológicas e sensoriais adequadas aos produtos de panificação.

**Palavras-chave:** antimicrobianos naturais, bolores, tecnologias de conservação, embalagens ativas

## ABSTRACT

*Background:* Ensuring safety and meeting the demand for the conservation of nutritional and quality attributes have resulted in a growing search for natural preservatives with potential application in foods. Associated with this consumer requirement, there are also some possible toxic effects of chemical preservatives used to extend the shelf life of products, especially in relation to protection against microbiological deterioration. In addition, the clean label claim has gained prominence in the manufacture and development of food products, even if the technological and sensory effect of these biopreservatives remains a deep challenge. For these reasons, there are current studies on the application of essential oils, extracts and components of spices and other aromatic plants as alternative biopreservatives.

*Scope and approach:* Due to the antifungal properties, the application of essential oils in bakery products have aroused commercial interest, considering that the bread and the fresh pasta are highly perishable due to the high water activity of these products, being very sensitive and dependent on practices and methods of preservation, storage and distribution. The main deteriorating micro-organisms found in bakery products are molds. These work aimed to provide a systematic review of the scientific literature related to recent studies on the application of essential oils for limiting or preventing the development of deteriorating fungi and mycotoxins in bakery products. The application addressed refers to the use of essential oils as additives in the formulation of food products, as surface protection or in active packaging.

*Key findings and conclusions:* Essential oils are composed of bioactive substances with antifungal properties that are suitable for the preservation of bakery products. High volatility, high cost and strong odor are characteristics that restrict its applicability. In this sense, it is important to evaluate the dosage, forms of application, different mechanisms of antimicrobial action and the effects of the isolated and/or combined use with other preservation technologies. In this way, it becomes possible the inhibitory or delaying effects against deteriorating micro-organisms, maintaining adequate technological and sensorial characteristics to bakery products.

**Key-words:** natural antimicrobials, molds, preservation technologies, active packaging

### 3.1 Introdução

Produtos de panificação com alta umidade são extremamente susceptíveis à deterioração microbiana em função da alta atividade de água. Entre os pães, destaca-se o pão integral, com perecibilidade ainda maior em função da presença da estrutura morfológica externa do grão de trigo, denominada de pericarpo. Fração esta que contém a maior fonte de contaminação microbiológica nas farinhas de trigo integrais em virtude do contato direto com o ambiente externo nas etapas de colheita, transporte e estocagem dos grãos (Santos, 2015).

Usualmente são adicionados conservantes químicos à massa e/ou aplicados na superfície dos pães, tais como propionato de cálcio e sorbato de potássio, respectivamente (Saranraj & Geetha, 2012). O uso de ácidos orgânicos fracos, como o propiônico, benzóico e sórbico também se aplica no material de embalagem ou em sistemas de atmosfera modificada no sentido de estender o prazo de validade desse tipo de produto (Fernandez et al., 2006).

A conservação dos produtos de panificação, assim como em outros gêneros alimentícios, é necessária quando o alvo é a extensão da vida de prateleira. Todavia, os debates sobre os possíveis efeitos negativos dos conservantes sintéticos e/ou químicos renovaram o interesse do consumidor em relação ao uso de substâncias alternativas (Tanacko & Dimić, 2013). Uma das tendências da indústria de alimentos é a diminuição ou a eliminação do uso de conservantes químicos, com o atrativo de ser um produto com a embalagem *clean label* (Santos & Novales, 2012).

Os antimicrobianos naturais podem ter origem a partir de plantas, de animais, do metabolismo bacteriano, de cogumelos e de algas (Gyawali & Ibrahim, 2014). Dentre as fontes vegetais, os principais compostos que atuam na inibição ou retardo do crescimento de micro-organismos são os OEs e seus componentes extraídos de especiarias e outras plantas aromáticas (Tanacko & Dimić, 2013). Contudo, a escolha do antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento alvo, na efetividade contra micro-organismos indesejáveis e na segurança alimentar (Settanni & Corsetti, 2008).

Os OEs são fitoquímicos (Callaway et al., 2011), formados por compostos voláteis, de cor límpida, solúveis em lipídeos e solventes orgânicos. Estes podem estar presentes em todos os órgãos de plantas, incluindo botões, flores, folhas, sementes, ramos, caules, colmos, frutos, raízes ou casca (periderme). Geralmente estão armazenados em células secretoras, cavidades, canais, tricomas glandulares ou células epidérmicas. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas,

obtidos geralmente de sementes. Quimicamente, os óleos fixos são compostos predominantemente por triacilgliceróis, que têm ácidos graxos diferentes ou idênticos, esterificados nas três posições hidroxila da molécula de glicerol (Simões & Spitzer, 2000).

A estrutura química dos OEs é composta por elementos básicos como o carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo sua classificação química difícil, visto que, são formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como: hidrocarbonetos, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis entre outras. Nas plantas, os OEs apresentam-se em misturas de diferentes concentrações, tendo, normalmente um composto majoritário. A grande maioria, no entanto, é constituído de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides. Os terpenóides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo esse termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno. Os compostos terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis são os monoterpênicos (90%) e os sesquiterpênicos (Bizzo et al., 2009).

Estes metabólitos estão relacionados a diversas funções necessárias à sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos (Siqui et al., 2000). As plantas que produzem OEs, em geral, são conhecidas por seus efeitos antioxidantes e antimicrobianos, bem como por suas propriedades antissépticas, medicinais e pelo aroma, sendo muitas vezes usadas na preservação de alimentos e como analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, anestésicos locais e espasmolíticos (Nedorostova, 2008).

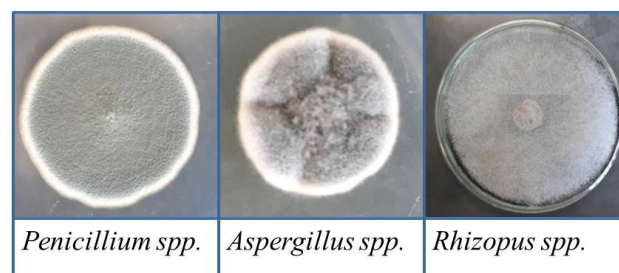
Este artigo analisa o papel dos OEs como inibidores de espécies fúngicas comumente presentes em produtos de panificação. Além disso, apresentamos algumas formas de aplicação direta neste tipo de produto. O principal objetivo é dar uma visão geral da aplicação de OEs, resumindo as principais conclusões dos estudos recentes na área.

As bases de dados científicas utilizadas na busca dos artigos foram ScienceDirect (<https://www.sciencedirect.com>), Scopus (<http://www.scopus.com>), Scielo – Scientific Electronic Library Online (<https://www.scielo.org/>), PubMed (MEDLINE) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e Portal de Periódicos CAPES/MEC (<http://www.periodicos.capes.gov.br>). Os artigos selecionados incluíram pesquisas científicas atemporais, desde que apresentassem conteúdo específico da utilização de óleos essenciais como antifúngicos em produtos de panificação.

### **3.2 Contaminação microbiana em produtos de panificação**

As perdas econômicas associadas à produtos de panificação são decorrentes de sua alta perecibilidade e susceptibilidade à contaminação microbiana por diversas espécies, principalmente fungos (Figura 3.1).

**Figura 3.1 – Principais micro-organismos deteriorantes comuns em produtos de panificação**



Fonte: Acervo pessoal.

Os bolores formam colônias de filamentos, que crescem e depois originam esporos. São os esporos que determinam a coloração do mofo visível na superfície de pães, estes se espalham por meio do vento e, quando em lugar apropriado, por exemplo, em outro alimento, desenvolvem-se formando outra colônia. Durante as etapas de resfriamento, fatiamento e embalagem pode haver contaminação cruzada pelo ar, superfícies, equipamentos, matérias-primas e manipuladores. Além disso, a temperatura ambiente e a alta atividade de água durante a estocagem tornam estes produtos mais susceptíveis ao desenvolvimento de fungos, principalmente os bolores. Por esse motivo, a umidade no interior da embalagem deve ser evitada procedendo-se ao acondicionamento após o completo resfriamento do produto (Jarvis, 2001). Entretanto, esta etapa prolongada de resfriamento pode ser responsável pela contaminação cruzada em produtos de panificação, sendo os fungos mais comuns dos gêneros: *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Mucor sp.* e *Eurotium sp.* (Saranraj; Geetha, 2012).

Em ambientes de armazenamento quentes e úmidos pode haver desenvolvimento de *rope*, um tipo de deterioração causada por bactérias do gênero *Bacillus spp.* A presença deste micro-organismo gera uma massa macia, fibrosa, de coloração marrom, com miolo se estendendo em fios. Em vários países, o desenvolvimento de *rope* se tornou incomum com a utilização de conservantes químicos (propionato de cálcio), condições de higiene satisfatórias e métodos de panificação adequados (Cauvain; Young, 2009).



As leveduras fermentativas (*Saccharomyces cerevisiae*) são adicionadas às formulações no processo de panificação, desempenhando importante atividade na obtenção de produtos com maciez e volume adequados. Entretanto, durante o armazenamento pode haver o desenvolvimento de leveduras indesejáveis, que se apresentam como pontos brancos sobre a superfície do pão, conhecidos como bolores de giz. Estas leveduras (*Pichia burtonii*) são facilmente confundidas com fungos filamentosos pela semelhança morfológica entre as colônias (Legan & Voysey, 1991).

A maneira mais comum de prevenir ou controlar o crescimento de fungos nos alimentos é o uso de agentes antifúngicos, constituídos pelos compostos químicos que impedem ou retardam o desenvolvimento dos mesmos. Para evitar a deterioração de produtos de panificação e estender a vida de prateleira são utilizados conservantes de grau alimentício com base em ácidos propiônico, sórbico, acético e seus sais, que são geralmente reconhecidos como compostos seguros (GRAS – Generally Recognized as Safe) (Liewen & Marth, 1985).

O ácido sórbico é constituído por substâncias alifáticas bastante voláteis e corrosivas, por esse motivo os seus sais de sódio, potássio ou cálcio são as formas mais comumente utilizadas devido a sua melhor solubilidade em água, estabilidade e facilidade de manuseio. Propionatos são usados principalmente como sais de potássio ou cálcio, atuando na inibição de bolores e bactérias do gênero *Bacillus (rope)*. Apresentam pouca ou nenhuma eficácia contra leveduras, o que os torna adequados para utilização direta em formulações de produtos fermentados (Magan, 2003).

De maneira geral, os conservantes agem alterando o pH intracelular de fungos filamentosos e bactérias, promovendo um desequilíbrio do metabolismo, resultando em uma alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática (Elgayyar et al., 2001). Ação semelhante deve ocorrer quando se utiliza um biopreservador alternativo. Sendo assim, os OEs têm sido estudados por serem capazes de retardar ou inibir o desenvolvimento de micro-organismos, agindo diretamente no equilíbrio metabólico das células (Costa et al., 2011).

### **3.3 Compostos majoritários e mecanismo de ação antifúngica de óleos essenciais**

Os OEs podem ser definidos como misturas complexas naturais de metabólitos secundários lipofílicos voláteis com cor e aroma característicos. Estes apresentam compostos ativos que podem ser úteis na limitação ou prevenção do desenvolvimento de fungos nocivos e produtores de micotoxinas nos alimentos (Tanacko & Dimić, 2013). Os componentes

majoritários estão presentes no OE em altas concentrações, de 20 % a 70 %. Geralmente, são de um a três componentes, mas existem outras substâncias que contribuem para a composição dos OEs, embora sendo encontradas em menores quantidades (Bakkali et al., 2008). No entanto, vale ressaltar que nem sempre o composto em maior concentração apresentará o melhor efeito inibitório sobre o micro-organismo. Vários fatores devem ser considerados para avaliar a efetividade dos OEs.

Cerca de 90–95% do OE é constituído pela fração volátil e consiste de monoterpenos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados, juntamente com aldeídos alifáticos, álcoois e ésteres. O resíduo não volátil, no entanto, constitui cerca de 5–10% do óleo total, que contém principalmente hidrocarbonetos, ácidos graxos, esteróis, carotenóides, ceras, cumarinas e flavonóides (Basile et al., 1998). Os componentes fenólicos, principais responsáveis pelo efeito conservantes de OEs, são caracterizados por pelo menos um anel aromático (C<sub>6</sub>) que contém um ou mais grupos hidroxila (Michalak, 2006). A Tabela 3.1 apresenta algumas plantas aromáticas e os principais compostos com atividade antimicrobiana reportada na literatura.

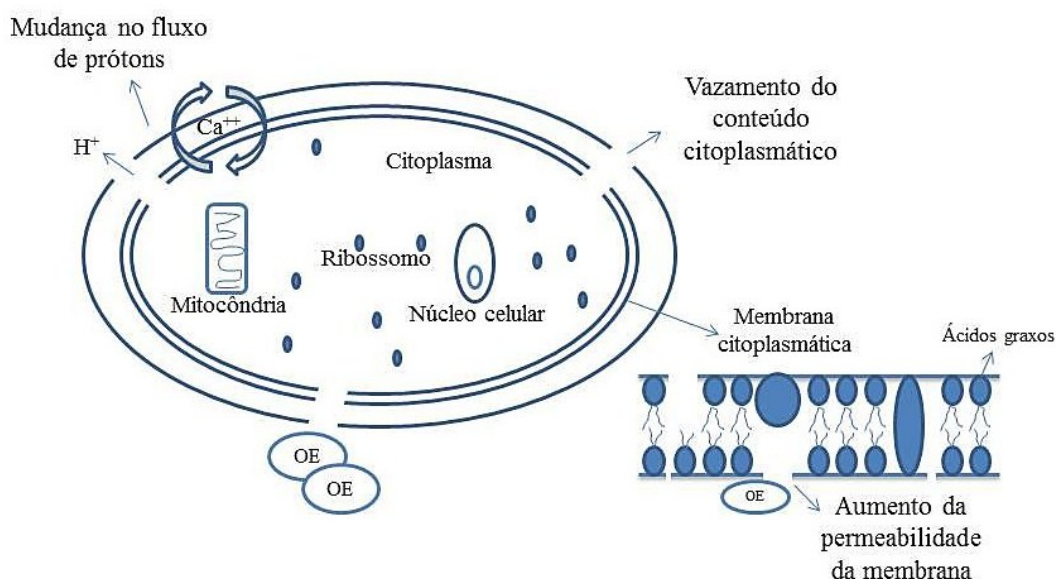
**Tabela 3.1 - Plantas aromáticas e/ou especiarias e os compostos majoritários associados a sua atividade antifúngica**

<b>Especiaria</b>	<b>Nome científico</b>	<b>Compostos majoritários</b>
Canela	<i>Cinnamomum spp.</i>	Cinamaldeído
Cravo	<i>Eugenia caryophyllus</i>	Linalol
Cravo-da-índia	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol
Tomilho	<i>Thymus vulgaris</i>	Timol
Louro	<i>Laurus nobilis</i>	1,8-cineol
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol e timol
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i>	Acetato de linalila
Manjerona	<i>Origanum majorana</i>	4-terpineol
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i>	Cânfora
Alho	<i>Allium sativum</i>	Alicina
Gengibre	<i>Zingiber officinale</i>	$\alpha$ -zingibireno
Casca de laranja	<i>Citrus sinensis</i>	D-limoneno
Anis estrelado	<i>Illicium verum</i>	Trans-anetol
Menta	<i>Mentha piperita</i>	Mentol
Capim-limão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Cítral e mirceno
Alecrim	<i>Rosmarinus officinalis</i>	$\alpha$ -pineno e cânfora
Manjericão	<i>Ocimum basilicum</i>	Linalol

Em geral, a inibição de processos enzimáticos das células pelos OEs é principalmente devido à presença de fenóis, aldeídos e álcoois (Bruni et al., 2003). Entretanto, como compreendem um grande número de componentes é provável que o seu modo de ação envolva vários componentes da célula microbiana, o que dificulta a determinação do mecanismo de ação de compostos minoritários (Burt, 2004).

Conforme se observa na Figura 3.2, a hidrofobicidade dos OEs permite que os mesmos interajam com os lipídios da membrana celular, perturbando assim a estrutura das diferentes camadas de ácidos graxos e fosfolipídios, tornando-a permeável e levando ao vazamento do conteúdo celular (Burt, 2004). Em células eucarióticas, os OEs podem provocar despolarização das membranas mitocondriais, diminuindo o potencial de membrana e afetando o ciclo iônico de  $\text{Ca}^{++}$  (Vercesi et al., 1997). Assim, pode haver uma mudança no fluxo de prótons e alteração nos gradientes de íons, modificando o pH da célula, afetando a composição química e os processos metabólicos, resultando na inativação ou em morte celular (Beckman, 2000).

**Figura 3.2- Representação esquemática da ação dos óleos essenciais na permeabilidade da membrana celular e alteração no gradiente iônico da célula**



Fonte: Elaboração própria (Baseado em Burt, 2004).

De acordo com Hyldgaard (2012), a ação inibitória pode ser atribuída também à inibição enzimática e alteração de proteínas por clivagem oxidativa de ligações dissulfeto. Tais mecanismos variam de acordo com as substâncias presentes no OE. Os componentes ativos timol e carvacrol, por exemplo, induzem a lise celular e alteram a estrutura celular, já o cinamaldeído é responsável pela inibição da divisão celular. A atividade antimicrobiana do OE de mostarda, por sua vez, é baseada no grupo isotiocianato que é altamente eletrofílico e reage com oxigênio, nucleófilos sulfúricos ou nitrogenados.

As condições físicas que intensificam a ação dos OE são o baixo pH, baixa temperatura e baixos níveis de oxigênio (Burt, 2004). Tais parâmetros são também de grande importância para a vida de prateleira de produtos de panificação, considerando a adaptação dos fungos deteriorantes a estas condições. A maioria dos fungos são tolerantes às condições ácidas (baixo pH) e crescem dentro de uma faixa de temperatura de 18,3 a 29,4 °C. Conforme verificado por Abellana e colaboradores (2001), a redução na temperatura de armazenamento de 27 °C a 21 °C duplicou a vida útil livre de bolos. Sendo assim, a aplicação dos OEs em produtos de panificação com pH levemente ácido ( $\pm 5,0$ ), armazenamento em temperaturas brandas ( $\pm 20^{\circ}\text{C}$ ) e em baixos níveis de oxigênio, tende a inibir potencialmente o desenvolvimento de bolores deteriorantes.

### **3.4 Estudos in vitro com óleos essenciais na inibição de fungos deteriorantes de produtos de panificação**

Os OEs são utilizados na indústria de alimentos principalmente como aromatizantes, porém apresentam ação antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados também na conservação de produtos alimentícios. No entanto, a aplicação dos OEs na conservação de alimentos requer conhecimentos detalhados sobre suas propriedades, ou seja, a concentração inibitória mínima (CIM), os micro-organismos envolvidos e o modo de ação, além do efeito dos componentes da matriz do alimento sobre as propriedades antimicrobianas e antioxidantes dos mesmos (Hyldgaard et al., 2012).

A avaliação da atividade antifúngica in vitro de OEs e componentes ativos são realizadas principalmente pelas técnicas de disco-difusão e ensaios de diluição. Os resultados dos ensaios pelo teste de difusão em ágar (mais utilizado) são expressos pela zona de inibição dos fungos que circundam o papel de filtro ou poço contendo o componente ativo (Seow, 2014). As placas de ágar ou caldo são inoculadas com uma solução de esporos fúngicos ou um disco de micélio fúngico, com um certo diâmetro, no centro da placa e o crescimento

radial é registrado em função do tempo de incubação. Os ensaios de diluição geralmente são utilizados para determinar a concentração inibitória mínima de determinado composto ativo (Debonne et al., 2018). Desta forma, torna-se possível verificar a efetividade da inibição e/ou retardo do desenvolvimento dos fungos frente aos OEs. A Tabela 3.2 apresenta de forma resumida os estudos que avaliaram a atividade antifúngica in vitro de OEs frente a fungos deteriorantes pertencentes aos gêneros mais comumente encontrados em produtos de panificação.

**Tabela 3.2 - Aplicação de óleos essenciais na inibição de fungos deteriorantes pelo teste de microdiluição**

Especiaria	Fungo deteriorante	CIM	Referência
Canela	<i>Aspergillus flavus</i>	200 ppm	Mahmoud, 1994
		0,16 % (v/v)	Xing et al., 1994
		0,01 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Freire, 2008
		0,20 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Gasperini, 2014
		0,64% (v/v)	Xing et al., 1994
Louro	<i>Rizopus nigricans</i>	0,16% (v/v)	Xing et al., 1994
		0,16% (v/v)	Xing et al., 1994
		0,25 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Freire, 2008
Anis estrelado	<i>Aspergillus niger</i>	2,25 $\text{mg.mL}^{-1}$	Santoyo, 2006
		1,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Freire, 2008
Manjerona	<i>Aspergillus parasiticus</i>	2,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Freire, 2008
		2,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Freire, 2008
Capim-limão	<i>Aspergillus flavus</i>	0,2 $\text{mg.mL}^{-1}$	Gasperini, 2014
Cravo-da-índia	<i>Aspergillus flavus</i>	0,5 $\text{mg.mL}^{-1}$	Gasperini, 2014
Orégano mexicano	<i>Aspergillus sp.</i>	150 $\text{mg.kg}^{-1}$	Ruiz et al., 2012
		200 $\text{mg.kg}^{-1}$	Ruiz et al., 2012
Tomilho	<i>Aspergillus flavus</i>	0,5 $\text{mg.mL}^{-1}$	Gasperini, 2014

CIM: concentração inibitória mínima.

O cinamaldeído, composto majoritário do OE de canela, exerce atividade antifúngica contra várias espécies associadas a produtos de panificação, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Smid & Gorris, 1999). Estudando o efeito deste composto no crescimento e produção de aflatoxina de *Aspergillus flavus*, Mahmoud (1994) estabeleceu a CIM a 200 ppm, com inibição completa de seu crescimento e produção de toxinas na dosagem de 1000 ppm. Xing e colaboradores (2010), por sua vez, definiram a CIM de OE de canela contra *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium expansum*, sendo os valores estimados em 0,64 % (v/v), 0,16 % (v/v) e 0,16 % (v/v), respectivamente.

Mishra e colaboradores (2015) avaliaram o efeito sinérgico de OEs de cravo e ácidos fracos na inibição de *Penicillium oxalicum* e *Aspergillus flavus*. Os resultados

demonstraram que houve sinergismo nas interações entre o OE e ácido benzoico na inibição de ambos os fungos. No entanto, o OE inibe a atividade antifúngica do ácido acético contra o *A. flavus* e apresentou consequência negativa sobre o efeito antifúngico do ácido cítrico e do ácido láctico contra o *P.oxalicum*.

De Corato e colaboradores (2010) avaliaram a atividade antifúngica de OE de louro sobre *Penicillium digitatum* e a inibição do crescimento micelial após 7 dias de incubação foi de 31, 53 e 71 % para as concentrações de 600, 800 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Este OE também foi avaliado pelo método de disco-difusão contra o desenvolvimento de *Aspergillus niger* e apresentou halo de inibição médio de 19 mm, enquanto a concentração fungicida mínima (CFM) foi de 2,25  $\text{mg.mL}^{-1}$  (Santoyo, 2006).

A inibição fúngica do OE de orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) foi avaliada em concentrações que variaram entre 50 e 200 mg/kg. Houve redução linear na taxa de crescimento específica e no crescimento máximo na fase estacionária de fungos do gênero *Rhizopus sp.* à medida que a concentração de OE aumentou. *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* foram inibidos em 150 e 200 mg/kg, respectivamente (Ruiz et al., 2012).

Os OEs de manjerona, anis-estrelado e canela (*Cinnamomum zeylanicum*) apresentaram efeito inibitório sobre os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, observando-se o crescimento e/ou inibição micelial das culturas fúngicas. A CIM para o crescimento micelial de *A. flavus* foi de 1 e 0,01  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  para anis-estrelado e canela, respectivamente. Entretanto, para o *A. parasiticus*, a CIM foi de 0,25, 2 e 2  $\mu\text{L.mL}^{-1}$  para OEs de canela, anis-estrelado e manjerona, respectivamente (Freire, 2008).

Ensaio in vitro realizados pelo teste de microdiluição mostraram que os OEs de canela (*Cinamomum burmanii*) (CIM: 0,2  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) e capim-limão, cravo da Índia e tomilho (CIM: 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ ) apresentaram elevada ação antifúngica contra *Aspergillus flavus*. O OE de capim-limão foi selecionado para estudo dos efeitos sobre a produção de aflatoxinas ( $B_1$  e  $B_2$ ), quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados mostraram redução na produção de aflatoxina  $B_1$  em 95 % quando incorporado ao meio a 0,5  $\text{mg.mL}^{-1}$ , enquanto houve um aumento de cerca de 53 % na produção da micotoxina a 0,25  $\text{mg.mL}^{-1}$ , após o mesmo período. Em relação à aflatoxina  $B_2$ , os autores relataram que não foi detectada a presença da micotoxina (Gasperini, 2014).

Com base em estudos filogenéticos e morfológicos, Císarová et al. (2018) identificaram cinco diferentes espécies de fungos do gênero *Eurotium* isolados de pães: *E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. herbariorum*, *E. rubrum* e *E. repens*. A atividade inibitória dos

OEs de manjeriço (*Ocimum basilicum L.*), lavanda (*Lavandula Angustifolia Mill.*), orégano (*Origanum vulgare L.*), hortelã (*Metha piperita L.*) e sálvia (*Salvia officinalis L.*) foi avaliada e em todas as cepas estudadas, os OEs causaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no crescimento micelial. O melhor efeito antifúngico foi demonstrado pelos OEs de lavanda e orégano (100 %) a todas as espécies de fungos testados, seguidos de menta (com o melhor inibição de crescimento micelial (ICM = 79,89 %) para *E. rubrum*), manjeriço (ICM de 93,65 % para *E. herbariorum*) e o menor efeito foi do OE de sálvia (ICM de 68,62 % para *E. repens*).

Os OEs de alecrim, manjeriço, menta e orégano foram testados nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000 mg.mL<sup>-1</sup> sobre o desenvolvimento de *Fusarium sp.*; *Aspergillus ochraceus.*; *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. O OE de orégano inibiu o desenvolvimento dos fungos testados em todas as concentrações, exceto *A. niger*, o qual apresentou desenvolvimento micelial inibido a partir da concentração de 1000 mg.mL<sup>-1</sup>. Já os OEs de alecrim, menta e manjeriço tiveram um efeito a partir da concentração de 1500 mg.mL<sup>-1</sup> (Pereira, 2006).

Nguefack e colaboradores (2004) investigaram o efeito inibitório de capim-limão, alfavaca, tomilho e gengibre contra três fungos deteriorantes de alimentos e produtores de micotoxinas (*Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*). Os OEs de alfavaca, tomilho e capim-limão foram os mais eficazes e preveniram a germinação de esporos e o crescimento dos três fungos a 800, 1000 e 1200 ppm, respectivamente. No entanto, o OE de gengibre apresentou atividade moderada entre 800 e 2500 ppm. Os mesmos autores realizaram um teste comparativo da capacidade conservante do OE de alfavaca e sorbato de potássio contra *A. flavus* a pH 3,0 e 4,5. O OE permaneceu estável em ambos os valores de pH, enquanto a eficácia do sorbato de potássio foi reduzida em pH mais elevado.

A atividade antifúngica in vitro do OE de tomilho (*Thymus zygis*) mostrou potencial promissor frente às linhagens fúngicas *Aspergillus niger* e *Penicillium paneum*, utilizando o método de macro-diluição com diferentes faixas de pH (4,8; 5,0; 5,5 e 6,0), atividade de água (0,95 e 0,97) e temperatura (22 e 30 ° C). O diâmetro das colônias não foi afetado significativamente pelo pH e atividade de água, entretanto, houve redução na taxa de crescimento micelial com o aumento da concentração de OE de tomilho (0; 0,2; 0,5 e 1 µL/mL) (Debonne et al., 2018).

O OE de orégano apresentou uma forte propriedade inibitória contra diversas espécies de *Aspergillus spp.* O OE em concentração de 40 e 80 µL.mL<sup>-1</sup> proporcionou efeito

fungicida sobre *A. flavus*, *A. fumigatus* e *A. niger* por uma inibição total do crescimento micelial radial ao longo de 14 dias de incubação. Além disso, nestas concentrações o OE foi capaz de inibir a germinação de esporos destes fungos (Carmo, 2008). Os OEs de tomilho e canela (4500 ppm), hortelã e manjeriço (3000 ppm), por sua vez, inibiram completamente o desenvolvimento de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. ochraceus* (Soliman, 2002).

A atividade antifúngica de vinte OEs foi testada em diferentes concentrações (0-1000 ppm) e condições de atividade de água e pH contra o desenvolvimento de *Eurotium spp.*, *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, principais fungos deteriorantes de produtos de panificação. O crescimento fúngico foi avaliado pela medida do diâmetro da colônia. Os dados foram analisados por regressão de quadrados mínimos e apenas os OEs de canela, alecrim, tomilho, louro e cravo exibiram alguma atividade antifúngica contra todos os fungos isolados. Em geral, foi observada uma inibição expressiva à medida que a atividade de água aumentou. OEs de alecrim, tomilho e louro foram os mais efetivos em pH 5, perdendo sua atividade com o aumento do pH, enquanto apenas OE de canela foi mais efetivo perto da neutralidade (Guynot, 2005).

O efeito de OEs de alho, canela, cravo-da-índia e tomilho, foram avaliados tendo como base as culturas-teste de *Rhizopus sp.*; *Penicillium spp.*; *Eurotium repens* e *Aspergillus niger* isolados de pães envelhecidos. Os OEs foram extraídos pela técnica de arraste à vapor e testados nas concentrações de 500; 1000; 1500 e 2000 mg.mL<sup>-1</sup>, exceto para o cravo, que foi testado nas concentrações de 200; 400; 600 e 800 mg.mL<sup>-1</sup>. O OE de canela inibiu completamente o desenvolvimento dos fungos testados. Os OEs de tomilho e alho tiveram o mesmo efeito nas concentrações mais altas, enquanto o cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *A. niger*, *Rhizopus sp.* e *E. repens* com a concentração de 600 mg.mL<sup>-1</sup> e do *Penicillium spp.* com a dosagem de 800 mg.mL<sup>-1</sup> (Souza et al., 2004).

### **3.5 Óleos essenciais em produtos de panificação avaliados in situ**

Estudos recentes mostraram que a adição de OEs em produtos de panificação resultou na inibição do desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes (Tabela 3.3). Em muitos casos, a aplicação em baixas concentrações não resultou em efeitos sensoriais e tecnológicos indesejáveis, comprovando a aplicabilidade dos OEs como biopreservadores alternativos.



Tabela 3.3 - Aplicação de óleos essenciais e extratos alcóolicos (EA) de plantas aromáticas em produtos de panificação

Produto	Fungo deteriorante	Especiaria	GRAS	Concentração efetiva	Referência
Pão de sal artesanal	<i>Penicillium roqueforti</i>	Tomilho	Sim	10 %	Araújo, 2005
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	Gengibre	Sim		
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	(EA)			
Bolo crocante de limão	<i>Penicillium spp.</i>	Cravo	Sim	0,83 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Ju et al., 2018
	<i>Aspergillus spp.</i>	Canela	Sim	0,21 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	
Pão de ló	<i>Aspergillus flavus</i>	Canela	Sim	0,05 %	Ahmed & Hussein, 2012
Bolo Filme para bolo enriquecido	<i>Aspergillus niger</i>	Tomilho	Sim	0,25 $\text{mg.mL}^{-1}$	Gonçalves, 2017
	Não especificado	Canela	Sim	2 e 4 %	Gutierrez, 2009
Pão de ló	<i>Aspergillus flavus e Aspergillus niger</i>	Casca de laranja	Sim	0,15 %	Ahmed & Hussein, 2012
Pão doce artesanal	<i>Penicillium roqueforti,</i>	Cravo	Sim	10%	Araújo, 2005
	<i>Aspergillus ochraceus, e</i>	Canela	Sim		
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	(EA)			
Pão de cachorro- quente e centeio	<i>Penicillium spp.</i>	Mostarda	Sim	3,5 $\text{mg.mL}^{-1}$ de fase gasosa	Nielsen & Rios, 2000
	<i>Aspergillus flavus</i>				
	<i>Endomyces fibuliger</i>				
Bolo	Não especificado	Coentro	Sim	0,15 %	Darugue et al., 2012
Pão de forma	<i>Aspergillus flavus,</i>	Casca de laranja	Sim	0,1 %	Rehman et al., 2007
	<i>Penicillium spp., Rhizopus e Mucor</i>				
Embalagem ativa para pão	<i>A. niger, P. chrysogenum e</i>	Sálvia	Sim	30 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de fase gasosa	Krisch et al., 2013
	<i>Rhizopus spp</i>	Manjerona	Sim		
Bolo de feijão verde	<i>Penicillium spp. e Aspergillus spp.</i>	Canela	Sim	0,21 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	Ju et al., 2018
		Cravo	Sim	1,67 $\mu\text{L.mL}^{-1}$	

GRAS – Generally recognized as safe – geralmente reconhecidos como seguros.

Os OEs de canela e casca de laranja foram utilizados para avaliar o efeito sobre a qualidade físico-química, sensorial e microbiana de pão-de-ló. Os dois extratos foram avaliados contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* e ambos os fungos demonstraram sensibilidade ao antimicrobiano natural, com redução significativa do crescimento micelial. A melhor inibição foi encontrada nas concentrações de 0,05 % para o extrato de canela e 0,15 % para o extrato de casca de laranja. Nenhuma influência significativa foi reportada ( $p \geq 0,05$ ) nas propriedades físicas (peso e volume específico) dos bolos. Os extratos contribuíram no retardo da auto-oxidação lipídica, melhorando a capacidade de armazenamento à temperatura ambiente. Em geral, os extratos testados não influenciaram desfavoravelmente nas propriedades sensoriais dos bolos, recebendo notas globais significativamente maiores do que os bolos controle ( $p < 0,05$ ) (Ahmed; Hussein, 2012).

Araújo (2005) avaliou a atividade antifúngica de extratos alcoólicos de gengibre, canela, cravo e tomilho sobre a inibição do desenvolvimento dos fungos *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus ochraceus* e *Rhizopus stolonifer* desenvolvidos em pães artesanais. Todos os extratos alcoólicos mostraram efeito inibitório significativo no crescimento micelial e na esporulação dos fungos. Na análise sensorial não houve diferença significativa entre os tratamentos. Na análise microbiológica, a utilização dos extratos alcoólicos a 10 % de cravo e canela para pão doce e dos extratos alcoólicos a 10 % de tomilho e gengibre para pão de sal, aumentou a conservação para 17 dias sem registro de fungos, enquanto a amostra controle apresentou contaminação na crosta dos pães, tendo atingido uma durabilidade de 6 dias.

Rehman e colaboradores (2007) realizaram um estudo para determinar o efeito de OE de casca de laranja sobre o crescimento microbiano e características sensoriais do pão. Os tratamentos incluíram aplicação na massa, aspersão na superfície do pão inteiro, nas fatias e no material de embalagem. O OE afetou significativamente as características sensoriais, como a simetria, cor do miolo e da crosta, sabor, textura e aroma. Além disso, inibiu ou retardou o crescimento microbiano no pão. O efeito inibitório máximo foi alcançado com a pulverização do OE em todas as fatias do pão, sendo mais eficaz contra a deterioração fúngica do pão.

O OE de coentro aplicado em bolos nas concentrações de 0,05, 0,10 e 0,15 % inibiu a taxa de formação de produtos de oxidação primária e secundária com efeitos semelhantes ao antioxidante sintético BHA (2,3-terc-butil-4-hidroxianisol) a 0,02 % ( $p < 0,01$ ), durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Quanto à atividade antifúngica, 0,15 % foi a concentração mínima capaz de inibir o crescimento de fungos no bolo. Sensorialmente, bolos contendo OE em 0,05 % não foram estatisticamente diferentes do

controle ( $p < 0,01$ ). Sendo assim, os resultados mostraram que o OE de coentro pode ser usado como antioxidante natural e antifúngico em bolos (Darughe, et al., 2012).

Gonçalves e colaboradores (2017) produziram e aplicaram micropartículas de OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) com o objetivo de inibir o desenvolvimento microbiano em bolos. O óleo de tomilho livre apresentou alta atividade antifúngica in vitro, com valores abaixo de  $0,50 \text{ mg.mL}^{-1}$  para quase todos os micro-organismos testados (*Candida Albicans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus niger*). Além disso, os valores de CIM para o óleo microencapsulado foram menores do que para o óleo livre, provavelmente devido ao microambiente protetor promovido pela parede das partículas. As micropartículas aplicadas em amostras de bolos conferiram proteção contra a volatilização do óleo encapsulado e promoveram vida útil de 30 dias sem o uso de conservantes sintéticos.

Rodriguez e colaboradores (2008) observaram uma forte correlação entre a concentração de cinamaldeído no pão e a inibição do crescimento de fungos, contudo as mudanças sensoriais foram indesejavelmente significativas. Segundo os autores, a solução pode ser o uso de tratamentos combinados, por exemplo, de OEs com outros conservantes, embalagem ativa ou com atmosfera modificada, sendo necessárias maiores investigações.

De acordo com Preedy (2016), apesar de comprovadas as propriedades conservantes dos OEs ainda existem limitações para o uso mais amplo dos mesmos pela indústria de alimentos. Destacam-se fatores como alto custo de extração, diversidade da composição química de acordo com as condições ambientais, baixo rendimento de extração frente às necessidades de grandes volumes necessários para atender a demanda das indústrias alimentícias e as propriedades sensoriais intensas (sabor e aroma) que levam à rejeição pelos consumidores dos produtos alimentícios.

### **3.6 Óleos essenciais em embalagens ativas para produtos de panificação**

As embalagens ativas têm como objetivo a extensão da vida útil do alimento através da interação entre o produto e o microambiente protetor criado na etapa de acondicionamento (Dainelli et al., 2008). De acordo com Long e colaboradores (2016), o uso de filmes e revestimentos comestíveis incorporando OEs são técnicas promissoras para preservar a qualidade dos alimentos e aumentar a vida de prateleira. Os mesmos autores citam

ainda que as principais aplicações de filmes ou embalagens de atmosfera modificada, contendo OEs para controle de fungos, estão relacionadas aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, comumente presentes em produtos de panificação.

A incorporação de OEs afeta a continuidade da matriz polimérica, levando a mudanças nas interações específicas dos componentes polímero-OE. Geralmente, a estrutura do filme é enfraquecida pela adição de OEs, enquanto as propriedades de barreira à água são melhoradas e a transparência é reduzida. Propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas dos OEs podem ser fornecidas à embalagem, sendo que a composição química e interações específicas com o polímero são determinantes para a sua eficácia como ingrediente ativo (Atares & Chiralt, 2016).

Gutierrez e colaboradores (2009) estudaram o efeito de filmes de polipropileno microperfurado adicionado de OE de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) na conservação e nas características sensoriais de um produto de panificação comercial (composto por açúcar, gemas, amêndoas, nozes, passas e outros ingredientes). Houve aumento no prazo de validade de 3 a 10 dias com qualidade máxima e segurança, de acordo com avaliação sensorial e microbiológica. Segundo avaliação dos autores, o filme produzido pode ser facilmente difundido com aplicabilidade em sistemas comerciais à curto prazo.

O OE de mostarda foi aplicado em sistema de atmosfera modificada de pães de centeio e de cachorro-quente com o objetivo de inibir fungos deteriorantes (*Penicillium spp*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger*). A CIM para o componente ativo, isotiocianato de alilo (AITC) foi determinada e os valores estimados em cerca de 1,8 a 3,5 mg.mL<sup>-1</sup> de fase gasosa, com resultados mais satisfatórios para pão de centeio em relação ao pão de cachorro-quente. O *Aspergillus flavus* foi mais resistente, enquanto *Penicillium roqueforti* foi mais sensível. No entanto, quando a fase gasosa continha pelo menos 3,5 mg.mL<sup>-1</sup>, AITC foi fungicida para todos os fungos testados. Os resultados indicaram que o tempo de armazenamento necessário do pão de centeio poderia ser alcançado por embalagem ativa com AITC. Entretanto, embalagens ativas com OE de mostarda para pães de cachorro-quente requerem o efeito adicional de outros fatores de preservação para evitar desenvolvimento de bolores (Nielsen & Rios, 2000).

Objetivando minimizar o impacto ambiental causado pelos polímeros convencionais, Pontes (2013) produziu e caracterizou filmes biodegradáveis de metilcelulose adicionados de nanoemulsões do tipo óleo/água de OEs de cravo, orégano e canela. A aplicação foi realizada em fatias de pães de forma que foram acondicionadas nos filmes e

tiveram a qualidade microbiológica, físico-química e sensorial estudadas. Com a utilização de 2 % de OE, observou-se que as incorporações das nanoemulsões nos filmes possibilitaram a ação antimicrobiana para os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium spp* in vitro e foram efetivos na redução das contagens de leveduras e bolores em fatias de pães de forma por 15 dias de armazenamento. Os parâmetros de pH, acidez total titulável e a cor instrumental das amostras de pães não foram afetados pela incorporação das nanoemulsões dos OEs. No entanto, sensorialmente a utilização das embalagens antimicrobianas interferiram negativamente nas características dos pães de forma.

Os OEs de cravo-da-índia e orégano foram utilizados também nos estudos de Otoni e colaboradores (2014), na forma livre e em nanopartículas, adicionadas na formulação de filmes antimicrobianos de metilcelulose. As contagens de bolores e leveduras em pão fatiado acondicionado nestes filmes reduziu significativamente e a redução do tamanho das gotículas forneceu melhoria nas propriedades antimicrobianas.

Krisch e colaboradores (2013) utilizaram o método de disco difusão com papel com 30  $\mu$ L de OE (fase vapor), simulando uma embalagem ativa para pão. A aplicação dos OEs de sálvia e manjerona em um ambiente fechado mostrou boa atividade antifúngica contra fungos deteriorantes do pão (*A. niger*, *P. chrysogenum* e *Rhizopus spp*). Mudanças no tamanho e taxa de crescimento de colônias foram avaliados como marcadores para concluir que o crescimento de todos os bolores investigados foi significativamente reduzido nas fatias de pão tratadas neste sistema. No entanto, a análise sensorial mostrou que a concentração efetiva dos OEs é muito alta, resultando em alterações inaceitáveis no sabor e aroma. Essas alterações sensoriais indesejáveis sugerem o uso de tecnologias combinadas para amenizar esse efeito e tornar o produto palatável e seguro.

### **3.6 Conclusões e perspectivas futuras**

Os OEs apresentam potencial para aplicação como conservantes naturais em produtos de panificação como forma de inibir o crescimento de micro-organismos deteriorantes, principalmente os bolores. A aplicação destes na superfície dos pães ou no material de embalagem apresenta maior viabilidade em relação à sua aplicação como aditivo na formulação do produto. O principal fator limitante, que se apresenta como grande desvantagem, é a alteração sensorial significativa nos alimentos. Para viabilizar o uso de OEs

é interessante o uso de tecnologias combinadas de forma a reduzir as proporções necessárias e avaliar ainda a compatibilidade com o alimento.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) e ao Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) pelo suporte institucional. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro (projeto Universal, protocolo 424938/2016-2) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro, código de financiamento 001.

### 3.7 Referências

- Abellana, M., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2001). Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 151-157.
- Ahmed, Z. S., & Hussein, A. M. S. (2012). Utilization of Cinnamon and Orange Extracts to Improve the Microbial Quality and Shelf Life of Sponge Cakes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(8), 665-672.
- Araújo, R. C. Z. Embalagens ativas com ervas aromáticas e condimentares na conservação de pães artesanais. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Lavras: UFLA, 2005. 88 p.
- Atares, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51-62.
- Bakkali, F. S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446–475.
- Bizzo, H. R., Rezende, C. M., Hovell, A. M. C. (2009). Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, 31(3), 588-94.
- Basile, A., Jimenez-Carmona, M. M., & Clifford, A.A. (1998). Extraction of rosemary by superheated water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5205–5209.

- Beckman, C.H. (2000). Phenolic-storing cells: key to programmed cell death and periderm formation in wilt disease and in general defence response in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, 101–110.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M. (2003). Chemical composition and biological activities of Isphingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415–421.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253.
- Callaway, T. R., Carroll, J. A., Arthington, J. D., Edrington, T. S., Anderson, R. C., Ricke, S. C. (2011). Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits (chap. 17). In R. Watson, J. L. Gerald, & V. R. Preedy (Eds.), *Nutrients, dietary supplements, and nutraceuticals: Cost analysis versus clinical benefits (277-286)*. New York: Humana Press.
- Carmo, E. S., de Oliveira, E. L., & de Souza, E. L. (2008). The potential of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 362-367.
- Cauvain, S.P., Young, L. S. (2009). *Technology of breadmaking*. 2. Ed. ISBN 978-85-2042706-4.
- Císarová, M., Hleba, L., Tančinová, D., Florková, M., Foltinová, D., Charousová, I., Vrbová, K., Božik, M., Klouček, P. (2018). Inhibitory effect of essential oils from some Lamiaceae species on growth of *Eurotium spp.* isolated from bread. *Journal Microbiology Biotechnology Food Science*, 8 (2), 857-862.
- Costa, A. R. T., Amaral, M. F. Z. J., Martins, P. M., Paula, J. A. M., Fiuza, T. S., Tresvenzol, L. M. F., Paula, J. R., Bara, M. T. F. (2011). Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 13 (2), 240-245.
- Dainelli, D., Gontardb, N., Spyropoulosc, D., Beukend, E. Z., Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Trends in Food Science & Technology*, 19, 103-112.
- Darughe, F., Barzegar, M., & Sahari, M.A. (2012). Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake. *International Food Research Journal*, 19 (3), 1253-1260.

- De Corato, U., Maccioni, O., Trupo, M., & Di Sanzo, G. (2010). Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against postharvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29, 142-147.
- Debonne, E., Bockstaele, F.V., Leyn, I., Devlieghere, F., Eeckhout, M. (2018). Validation of in-vitro antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 368-378.
- Elgayyar, M., Draughon, F.A., Golden, D.A., Mount, J.R. (2001). Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal of Food Protection*, 64 (7), 1019–1024.
- Fernandez, F., Vodorotz, Y., Courtney, P., Pascall, M. A. (2006). Extended shelf-life of soy bread using modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*, 69, 693-698.
- Freire, J. M. (2008). Óleos essenciais de canela, manjerona e anis estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *S. aureus*, *E. coli* e *A. flavus* e *A. parasiticus*. 68 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras: Lavras.
- Gasperini, A. M. (2014). Efeito de óleos essenciais sobre o crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus*. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
- Gonçalves, N. D., Pena, F. L., Sartoratto, A., Derlamelina, C. B., Duarte, M. C. T., Antunes, A. E. C., Prata, A. S. (2017). Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. *Food Research International*, 96, 154–160.
- Gutiérrez, L., Sánchez, C., Batlle, R., Nerín, C. (2009). New antimicrobial active package for bakery products. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 92-99.
- Guynot, M. E., Marín, S., Setó, L., Sanchis, V., Ramos, A. J. (2005). Screening for Antifungal Activity of Some Essential Oils Against Common Spoilage Fungi of Bakery Products. *Food Science and Technology International*, 11(1), 2–8. Doi: 10.1177/1082013205050901.
- Gyawali, R., Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429.
- Hyltdgaard, M., Mygind, T., Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3 (12).
- Jarvis, B. (2001). Mould spoilage of food. *Process Biochemistry*, 7, 11-14.



- Krisch, J., Rentskenhand, T., Horváth, G., Vágvölgyi, C. (2013). Activity of essential oils in vapor phase against bread spoilage fungi. *Acta Biologica Szegediensis*, 57(1), 9-12.
- Liewen, M. B., Marth, E. H. (1985). Growth and inhibition of microorganisms in the presence of sorbic acid. *Journal Food Protection*, 48, 364 – 75.
- Long, N. N. V., Joly, C., Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 73–90.
- Magan, N., Arroyo, M., & Aldred, D. (2003). Mould prevention in bread, In: Cauvain, S.P. (Ed.), *Bread Making*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 482–494. doi:<http://dx.doi.org/10.1533/9781855737129.2.500>.
- Mahmoud, A. E. (1994). Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Letters in Applied Microbiology*, 19, 110–113.
- Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15 (4), 523–530.
- Mishra, V. K., Gupta, S., & Pundir, R. K. (2015). Synergistic antimicrobial activity of essential oil and chemical food preservatives against bakery spoilage fungi. *CIBTech Journal of Microbiology*, 4 (1), 6-12. ISSN: 2319-3867.
- Nedorostova, L., Kloucek, P., Kokoska, L., & Stolcova, M. (2008). Comparison of antimicrobial properties of essential oils in vapour and liquid phase against foodborne pathogens. *Planta Medica*, 74. [http:// dx.doi.org/10.1055/s-0028-1084914](http://dx.doi.org/10.1055/s-0028-1084914).
- Nguefack, J., Leth, V., Amvam, P.H., & Mathur, S.B. (2004). Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 329-334.
- Nielsen, P.V., & Rios, R. (2000). Inhibition of fungal growth on bread by volatile components from spices and herbs, and the possible application in active packaging, with special emphasis on mustard essential oil. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 219–229.
- Otoni, C. G., Pontes, S. F.O., Medeiros, E. A.A., Soares, N.F.F. (2014). Edible Films from Methylcellulose and Nanoemulsions of Clove Bud (*Syzygium aromaticum*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils as Shelf Life Extenders for Sliced Bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [dx.doi.org/10.1021/jf501055f](http://dx.doi.org/10.1021/jf501055f).

- Pereira, M. C., Vilela, G. R., Costa, L. M. A. S., Silva, R. F., Fernandes, A. F., Fonseca, E. W. N., Picolli, R. H. (2006). Inibição de desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciências Agrotecnológicas*, 30 (4), 731-738.
- Pontes, S. F. O. (2013). Desenvolvimento de nanoemulsões de óleos essenciais incorporadas em filme de metilcelulose para uso em alimentos. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Viçosa: Viçosa.
- Preedy, V. R. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. London, Academic Press.
- Rehman, S., Hussain, S., Nawaz, H., Ahmad, M, M., Murtaza, M, A., Rizvi, A, J. (2007). Inhibitory Effect of Citrus Peel Essential Oils on the Microbial Growth of Bread. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 558-561.
- Rodriguez, A., Nerin, C., Battle, R. (2008). New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6364-6369.
- Ruiz, M. C. P., Sanchez, R. A. S., Ramos, S. V., Munoz, J. V. T., Moorillón, G. V. N. (2012). Antifungal Effect of Mexican Oregano (*Lippia berlandieri Schauer*) Essential Oil on a Wheat Flour-Based Medium. *Journal of Food Science*. 77 (8).
- Santos, F.S., Novales, M. G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136–141.
- Santos, J. L. P. (2015). Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
- Santoyo, S. R., Lloria, L., Jaime, E., Ibanez, F. J., Senor, G. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis*: Chemical and functional characterization. *European Food Research Technology*, 222, 565-571.
- Saranraj, P., & Geetha, M. (2012). Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(1), 38-48.
- Settanni, L., & Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 123-138.
- Simões, C. M. O., & Spitzer, V. (2000). *Óleos voláteis*. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.

- Siqui, A. C., Sampaio, A. L. F., Sousa, M. C., Henriques, M. G. M. O., Ramos, M. F. S. (2000). Óleos essenciais - potencial antiinflamatório. *Biotechnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 16, 38-43.
- Smid, E. J., & Gorris, L. G. M. (1999). Natural antimicrobials for food preservation, p. 285-308. M. Shafiurr Rahman (ed.), *Handbook of food preservation*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Soliman, K. M., Badeaab, R. I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1669–1675.
- Souza, S.M.C., Pereira, M.C., Angélico, C. L., Pimenta, C. J. (2004). Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciências Agrotecnológicas*, Lavras, 28 (3), 685-690.
- Tanackov, D. K.; Dimić, G. R. (2013). Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. In: *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.).
- Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F. (1997). The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports*, 17, 43–52.
- Xing, Y., Xihong, Li., Qinglian, X., Yun, J., Lu, Y. (2010). Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1837–1842.



#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO II: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E LOURO SOBRE BOLORES DE PÃO DE FORMA INTEGRAL

##### RESUMO

Produtos de panificação com alta umidade são extremamente susceptíveis à deterioração microbiana em função da alta atividade de água. Consequentemente, a indústria de alimentos utiliza aditivos químicos visando aumentar a vida de prateleira destes produtos. No entanto, a existência de possíveis efeitos tóxicos promove o interesse da substituição dos conservantes químicos por naturais. Os óleos essenciais (OEs) são compostos por metabólitos secundários produzidos por certas espécies de plantas que podem atuar como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos e inseticidas. Diante disso, este estudo objetivou isolar e identificar bolores de pães de forma integrais e investigar a atividade antifúngica in vitro de OEs de canela (*Cinamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e louro (*Laurus nobilis*) na inibição do desenvolvimento dos mesmos. A identificação foi conduzida por análises da estrutura macroscópica e microscopia óptica, enquanto a atividade antimicrobiana foi avaliada através das técnicas de disco-difusão em poço e microdiluição em placas para determinar as concentrações inibitória mínima (CIM) e concentração mínima letal (CML). Os resultados indicaram a presença de fungos dos gêneros *Penicillium spp.*, *Aspergillus spp.*, e *Rhizopus spp.* O volume otimizado de OE para inibição do crescimento fúngico foi de 11,77 µL contendo 34,2 % de OE de canela, 42,5 % de OE de cravo e 23,3 % de OE de louro, com desejabilidade de 93,8%. Nestas proporções, tanto a CIM quanto a CML foram de 20 µL de OEs por mL de inóculo, considerando uma população inicial de  $2 \times 10^6$  UFC/g. Futuras aplicações in situ em uma matriz alimentícia complexa poderão avaliar as interações dos componentes e propriedades de conservação dos OEs em produtos de panificação.

**Palavras-chave:** conservação de alimentos; panificação; antimicrobianos naturais.

## ABSTRACT

Bakery products with high moisture content are extremely susceptible to microbial deterioration due to high water activity. Consequently, the food industry uses chemical additives to increase the shelf life of these kind of products. However, the existence of possible toxic effects promotes the interest of replacing chemical preservatives with natural ones. Essential oils (EOs) are composed by secondary metabolites produced by certain plant species that can act as antibacterial, antiviral, antifungal and insecticidal agents. The objective of this study was to isolate and identify whole-grain bread molds and to investigate the in vitro antifungal activity of EOs of cinnamon (*Cinamomum cassia*), clove (*Eugenia caryophyllus*) and bay (*Laurus nobilis*) in the inhibition of mold development. The identification was conducted by analysis of macroscopic structure and optical microscopy, while antimicrobial activity was evaluated by means of disk-diffusion techniques and microdilution in plates to determine minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC). The results indicated the presence of fungi of the genus *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., and *Rhizopus* spp. The optimum volume of EO for inhibition of fungal growth was 11.77  $\mu\text{L}$  containing 34.2 % EO of cinnamon, 42.5 % EO of clove and 23.3 % EO of bay, with a desirability of 93.8 %. In these proportions, both MIC and MLC were 20  $\mu\text{L}$  of essential oils/mL of inoculum, considering an initial population of  $2 \times 10^6$  CFU/g. Future in situ applications in a complex food matrix can evaluate the interactions of the components and conservation properties of EOs in bakery products.

**Key-words:** food preservation; baking; natural antimicrobials

## 4.1 Introdução

Os produtos de panificação, como muitos alimentos processados ou in natura, estão sujeitos à deterioração física, química e microbiológica. Enquanto os danos físicos e químicos limitam a vida útil de produtos de panificação de baixa e média umidade, a deterioração microbiológica, principalmente por bolores, constitui a maior preocupação em produtos de alta umidade, tais como os pães (Saranraj; Geetha, 2012).

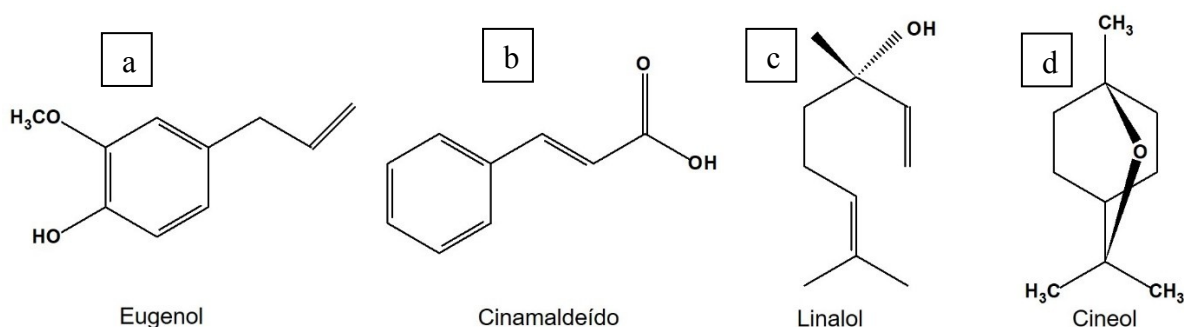
De acordo com Legan (1993), o principal fungo responsável pela deterioração em pães é o *Penicillium* spp., embora o *Aspergillus* spp. possa ter maior ocorrência nos países tropicais. O *Rhizopus stolonifer*, por sua vez, é mais comumente encontrado em pães pretos. Seiler (1992) cita ainda outros gêneros de fungos que podem causar deterioração em pães, como *Cladosporium*, *Mucorales* e *Neurospora*.

Para retardar o desenvolvimento fúngico e aumentar a vida de prateleira de pães de forma, usualmente são adicionados conservantes químicos à massa ou na superfície dos mesmos, tais como propionato de cálcio e sorbato de potássio, respectivamente (Cauvain, 2006). No entanto, debates sobre os possíveis efeitos negativos de conservantes sintéticos têm renovado o interesse do consumidor no sentido de substituí-los por agentes naturais para a extensão da viabilidade do produto (Tanacko; Dimic, 2013).

O mecanismo da ação antimicrobiana baseia-se na hidrofobicidade do óleo essencial (OE) que permite uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (Costa et al., 2011). De acordo com Shylaja e Peter (2004), o dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do OE, acaba por afetar a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos, impedindo o desenvolvimento do microrganismo na matriz alimentícia.

O cravo (*Eugenia caryophyllus*) é uma planta arbórea de odor fortemente aromático e sabor característico, que apresenta ação antifúngica e antioxidante. A composição química de seu OE é constituída principalmente por 4-alil-2-metoxifenol, composto conhecido como eugenol (Figura 4.1-a) presente em cerca de 70-90% do cravo inteiro, e outros compostos minoritários tais como, acetato de eugenol, betacariofileno, ácido oleânico e substâncias das classes: triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis (Nascimento et al., 2000).

**Figura 4. 1 - Estrutura química do eugenol, cinamaldeído, linalol e 1,8-cineol, respectivamente**



Fonte: Elaborado no software livre Chemicpen 2.6, versão 2.1.

O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), apresentado na Figura 4.1-b, é um álcool terpênico cíclico que age como principal componente ativo do óleo essencial de canela (*Cinnamomum spp.*). O composto é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) e tem sido amplamente utilizado em gomas, sorvete, doces, bebidas, pães, cereais e cosméticos (Lee; Balick, 2005). O OE de canela é conhecido por apresentar efeito antimicrobiano e antioxidante, o que justifica seu uso em diversas aplicações farmacológicas e alimentícias. No entanto, a aplicação deste OE na conservação de alimentos é limitada pelo seu sabor particular, volatilidade e natureza lipofílica (Amara et al., 2008). Outro composto de grande interesse quando se trata de antimicrobianos, encontrado no OE de canela, é o linalol (Figura 4.1-c), um monoterpeneo que apresenta efeito anti-inflamatório, analgésico e atividade antimicrobiana (Camargo, 2014).

O louro (*Laurus nobilis*) é um condimento bastante apreciado em pratos típicos brasileiros. Suas folhas contêm aproximadamente 1,5% a 2% de óleo volátil. As folhas desidratadas e também o óleo essencial de louro são utilizados como condimento e flavorizante na culinária e na indústria alimentícia. O principal componente é o 1,8-cineol (Figura 4.1-d), composto que apresenta atividade antisséptica e antifúngica (Santoyo et al., 2006).

A aplicação de OEs em alimentos representa um efeito natural e eficaz contra a deterioração causada por bolores, sendo bem aceita pelos consumidores. No entanto, o forte aroma dos OEs pode afetar as propriedades sensoriais dos alimentos (Krisch et al., 2011). Nesse sentido, as combinações sinérgicas dos mesmos associados a outros métodos de conservação podem reduzir essa desvantagem, atendendo os atuais requisitos de conservantes



naturais, seguros e saudáveis, resultando em um produto estável e palatável (Matan et al., 2006).

Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo isolar e identificar bolores de pães de forma integrais e avaliar a atividade antifúngica combinada dos OEs de canela, cravo-da-índia e louro para possíveis aplicações como antimicrobianos em pães de forma integrais.

## 4.2 Material e métodos

Os OEs de canela (destilado de galhos), cravo (destilado de folhas) e louro (destilado de folhas) foram obtidos comercialmente, em frasco âmbar, lacrados e com volume de 10 mL. A utilização destes foi definida a partir de testes preliminares que avaliaram a influência nas características tecnológicas e atividade antifúngica de condimentos em pó adicionados em pães de forma (Silveira; Schmiele, 2018).

### 4.2.1 Formulação dos pães

Os pães integrais utilizados para o isolamento de colônias fúngicas foram produzidos conforme a formulação apresentada na Tabela 4.1 (Schmiele et al., 2012).

**Tabela 4. 1 - Formulação dos pães**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade (%)</b>
Farinha de trigo integral	100
Cloreto de sódio	1,8
Fermento instantâneo	1,6
Gordura vegetal hidrogenada	4
Sacarose	4
Leite em pó integral	4
Melhorador*	1
Água	60

\* O melhorador refere-se a um complexo de enzima alfa-amilase, oxidantes e emulsificantes, utilizando o amido como veículo.

As massas foram produzidas pelo método de massa direta modificado, divididas em porções de 400 gramas, boleadas, modeladas, fermentadas e forneadas à 180 °C. Em seguida, os pães foram armazenados em embalagem de polietileno de baixa densidade

(PEBD), à temperatura ambiente (18-22°C) por 9 dias, quando se observou o desenvolvimento de colônias fúngicas.

#### 4.2.2 *Preparo do inóculo*

Da superfície dos pães integrais com desenvolvimento fúngico visível, coletaram-se amostras que foram dispersas em caldo nutritivo 1 % e incubadas à 25±1 °C por 24 horas. Em seguida, foram feitas diluições em solução salina 1 % e inoculados 100 µL em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10 % (pH 3,5). As placas foram incubadas a 25±1 °C por 5 dias, e após esse período foi realizada a contagem de colônias.

#### 4.2.3 *Identificação microscópica e macroscópica dos bolores*

A identificação das características macroscópicas foi realizada através do registro de imagem em câmera digital de 13MP (Samsung Galaxy J5 Pro), observando-se a cor, morfologia, crescimento das colônias e estruturas esporuladas. A análise microscópica foi conduzida através da técnica de microcultivo e visualização em microscópio óptico Carl Zeiss GmbH com lente de aumento de 100 X.

#### 4.2.4 *Delineamento experimental*

Os ensaios foram elaborados e avaliados através de um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) de três variáveis independentes (Tabela 4.2), onde: X<sub>1</sub>-Óleo essencial de canela; X<sub>2</sub>- Óleo essencial de cravo e X<sub>3</sub>- Óleo essencial de louro, de acordo com o modelo apresentado na Equação 1, proposto por Rodrigues e Iemma (2009). As proporções de óleos essenciais foram definidas por pré-testes e variaram de 0,5 a 5 µL.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad (1)$$

Onde: Y = valor observado para a variável dependente Y (diâmetro do halo de inibição);  $\beta_0$  = constante de regressão;  $\beta_i$ ,  $\beta_{ii}$  e  $\beta_{ij}$  = coeficiente de regressão linear, quadrático e de interação, respectivamente;  $x_i$  e  $x_j$  = valores codificados das variáveis independentes.

**Tabela 4. 2 - Níveis reais das variáveis independentes para os óleos essenciais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da atividade antifúngica**

Ensaio	Níveis Codificados			Níveis reais		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1,00	-1,00	-1,00	1,34	1,34	1,34
2	1,00	-1,00	-1,00	4,16	1,34	1,34
3	-1,00	1,00	-1,00	1,34	4,16	1,34
4	1,00	1,00	-1,00	4,16	4,16	1,34
5	-1,00	-1,00	1,00	1,34	1,34	4,16
6	1,00	-1,00	1,00	4,16	1,34	4,16
7	-1,00	1,00	1,00	1,34	4,16	4,16
8	1,00	1,00	1,00	4,16	4,16	4,16
9	-1,68	0,00	0,00	0,50	2,75	2,75
10	1,68	0,00	0,00	5,00	2,75	2,75
11	0,00	-1,68	0,00	2,75	0,50	2,75
12	0,00	1,68	0,00	2,75	5,00	2,75
13	0,00	0,00	-1,68	2,75	2,75	0,50
14	0,00	0,00	1,68	2,75	2,75	5,00
15	0,00	0,00	0,00	2,75	2,75	2,75
16	0,00	0,00	0,00	2,75	2,75	2,75
17	0,00	0,00	0,00	2,75	2,75	2,75
18	0,00	0,00	0,00	2,75	2,75	2,75

X<sub>1</sub>-Óleo essencial de canela; X<sub>2</sub>- Óleo essencial de cravo e X<sub>3</sub>- Óleo essencial de louro.

#### **4.2.5 Método de disco-difusão por poço**

Na porção central do meio de cultura solidificado (BDA acidificado com ácido tartárico) foram feitas perfurações de 10 mm de diâmetro, denominadas de poço. Em cada placa de Petri (9 cm de diâmetro), adicionou-se 100 µL de inóculo, contendo toda a microbiota presente nos pães produzidos, na concentração de  $2 \times 10^6$  UFC/g de amostra. Em seguida, o inóculo foi espalhado uniformemente sobre a superfície do meio de cultura. De acordo com o delineamento experimental (Tabela 4.2), foram aplicadas as misturas de óleos essenciais no poço, em triplicata. As placas foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C por 8 dias. A leitura do diâmetro do halo de inibição foi feita diariamente, também em triplicata. Em seguida, procedeu-se a otimização das proporções dos OEs a fim de validar os resultados e avaliar as concentrações mínimas necessárias para o efeito inibitório dos bolores.

#### ***4.2.6 Concentração inibitória mínima e concentração mínima letal a partir do ponto otimizado***

A avaliação das concentrações inibitória mínima (CIM) e mínima letal (CML) foi feita pelo método de microdiluição em placas com 96 poços. Foram adicionados sequencialmente 100 µL de BDA acidificado, 50 µL do inóculo ( $1,8 \times 10^6$  UFC/ g) e a mistura de OEs, com seis repetições. Utilizou-se a proporção de OEs estabelecida no na otimização da mistura. As concentrações testadas foram de 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120; 140; 160; 180; 200; 240, 280, 320, 360 e 400 µL de OEs por mL de inóculo. A CIM foi considerada como a menor concentração de OEs na qual não foi observado crescimento visual de fungos após 48 horas, enquanto a CML foi observada após 96 horas.

#### ***4.2.7 Análise estatística***

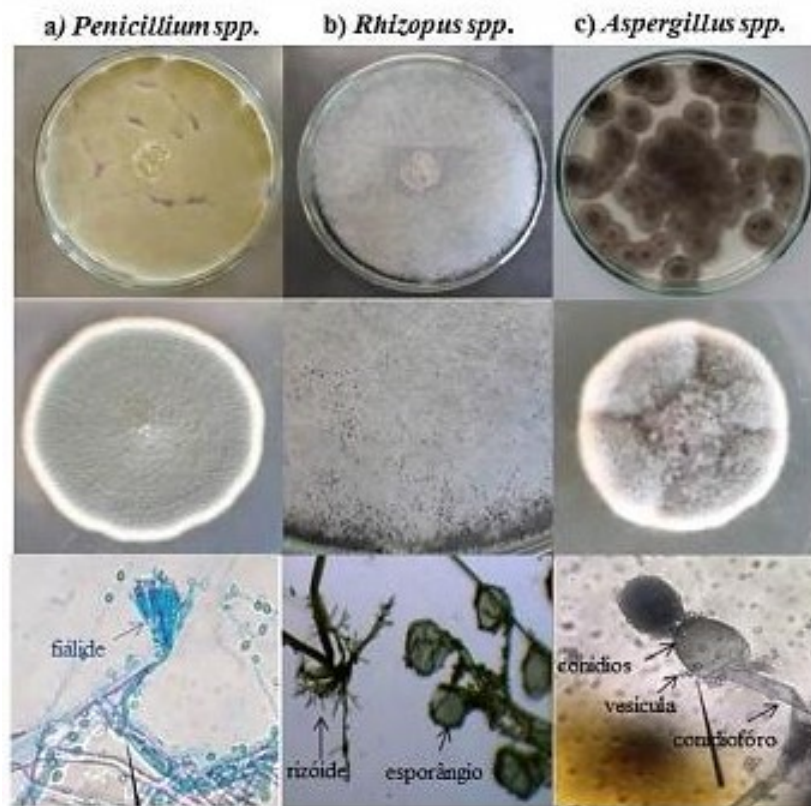
Os dados obtidos nos ensaios do planejamento experimental foram avaliados através de Metodologia de Superfície de Resposta para cálculo dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 10 %. O coeficiente de regressão mínimo ( $R^2$ ) da ANOVA foi definido em 0,80. Os modelos matemáticos elaborados foram representados pelos níveis codificados para as variáveis independentes  $x_1$  (óleo essencial de canela),  $x_2$  (óleo essencial de cravo) e  $x_3$  (óleo essencial de louro). O ponto otimizado foi determinado através de metodologia proposta por Derringer e Suich (1980).

### **4. 3. Resultados e discussão**

#### ***4.3.1 Identificação microscópica e macroscópica dos fungos***

O cultivo das espécies fúngicas presentes no inóculo inicial permitiram a visualização de três diferentes morfologias (Figura 4.2). Conforme descrito por Seiler (1992) colônias de cor esverdeada, plana e com espalhamento lento são características do gênero *Penicillium*. Os conídios produzidos são esféricos, unicelulares, hialinos podendo ser lisos ou ásperos dependendo da espécie. Estes fungos possuem conidióforo e cabeça conidial com ramificações, chamadas de fiálides (Cardoso, 2007). Tais estruturas podem ser verificadas na Figura 4.2-a e sugerem que os bolores pertencem a este gênero.

**Figura 4. 2 - Identificação macroscópica e microscópica dos bolores isolados de pães de forma integrais**



Fonte: Acervo pessoal.

*Rhizopus* é um tipo de bolor que se desenvolve particularmente em regiões tropicais e subtropicais, em quase todo tipo de alimento fresco, úmido e parcialmente seco. A espécie mais comumente encontrada é o *Rhizopus stolonifer* (Silva, 2008). Morfologicamente são fungos não septados, com micélios cotonosos e formando esporangióforos nos nódulos onde se encontram os rizóides. Seus esporângios são usualmente muito grandes e negros e suas columelas são hemisféricas. A característica primordial do *Rhizopus stolonifer* é o excessivo crescimento a 25°C, sendo o esporângio primeiramente branco, havendo mudança para preto com o amadurecimento (Pitt; Hocking, 1997). O fungo isolado dos pães (Figura 4.2-b) possui aspecto penugento, micélio cotonífero branco e esporângio preto, tais características indicam que este deve pertencer ao gênero *Rhizopus*.

As espécies do gênero *Aspergillus* tipicamente produzem um conidióforo, asseptado e com a base normalmente em forma de “T” ou “L”, comumente chamada de “célula-pé”, conectada a uma hifa vegetativa. O conidióforo estende-se a partir da célula-pé e pode continuar a se estender por alguns milímetros de comprimento até chegar à vesícula

(Klich, 2002). Os bolores deste gênero possuem coloração de verde a preto, sendo a espécie *Aspergillus niger* penugenta negra, com cabeças de esporos claramente visíveis. Conforme se observa na Figura 4.2-c, as características apresentadas assemelham-se a descrição dos fungos filamentosos deste gênero, o que permite inferir que tais colônias são de *Aspergillus* spp.

#### **4.3.2 Avaliação do delineamento experimental**

Os resultados para a técnica de disco-difusão estão apresentados na Tabela 4.3.

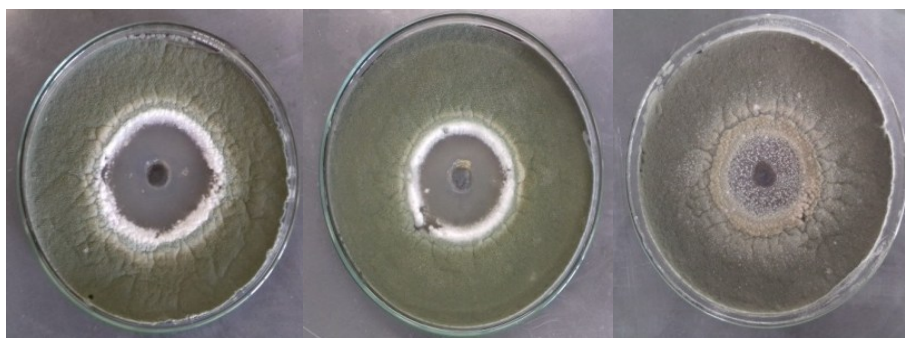
Tabela 4. 3- Diâmetro dos halos de inibição (cm)

Ensaio	Dias de incubação										
	1	2	3	4	5	6	7	8	1/5*	4/5*	1/8*
1	3,0±0,42	2,3±0,39	2,1±0,25	2,1±0,25	1,2±0,08	1,1±0,07	1,1±0,07	1,1±0,08	60,00±0,43	42,86±0,26	63,30±0,43
2	2,3±0,22	2,0±0,24	2,0±0,24	2,0±0,23	1,9±0,25	1,9±0,27	1,9±0,27	1,9±0,24	17,39±0,33	5,00±0,34	17,39±0,33
3	2,5±0,24	2,5±0,30	2,5±0,32	2,5±0,32	2,5±0,32	2,3±0,28	2,3±0,28	2,2±0,23	0,00±0,41	0,00±0,46	12,00±0,34
4	2,3±0,16	2,3±0,10	2,3±0,10	2,3±0,10	2,3±0,09	2,2±0,07	2,2±0,07	2,2±0,11	2,13±0,19	0,00±0,14	6,38±0,20
5	2,1±0,11	2,0±0,14	1,9±0,16	1,9±0,16	1,2±0,09	0,6±0,23	0,6±0,25	0,5±0,28	42,86±0,14	36,84±0,19	76,19±0,30
6	2,5±0,09	2,5±0,09	2,4±0,17	2,4±0,16	2,2±0,15	2,0±0,17	2,0±0,17	2,0±0,20	12,00±0,18	8,33±0,22	20,00±0,22
7	2,6±0,24	2,6±0,29	2,4±0,32	2,4±0,32	2,4±0,32	2,3±0,28	2,3±0,28	2,3±0,23	7,69±0,41	0,00±0,46	11,54±0,34
8	2,6±0,25	2,5±0,15	2,5±0,07	2,5±0,07	2,5±0,05	2,5±0,09	2,5±0,09	2,5±0,08	3,85±0,26	0,00±0,08	3,85±0,27
9	2,5±0,15	2,3±0,15	2,3±0,15	2,2±0,10	2,0±0,09	1,9±0,15	1,9±0,08	1,9±0,15	20,00±0,18	9,09±0,14	24,00±0,22
10	2,7±0,08	2,6±0,05	2,6±0,05	2,6±0,05	2,6±0,05	2,6±0,08	2,6±0,07	2,6±0,07	3,70±0,10	0,00±0,07	3,70±0,11
11	1,9±0,07	1,9±0,07	1,9±0,07	1,8±0,07	1,4±0,09	1,3±0,05	1,3±0,15	1,3±0,13	26,32±0,12	22,22±0,12	31,58±0,15
12	2,5±0,12	2,5±0,12	2,5±0,12	2,5±0,13	2,5±0,11	2,5±0,11	2,4±0,11	2,4±0,18	0,00±0,17	0,00±0,17	4,00±0,22
13	2,1±0,49	2,1±0,41	2,1±0,41	2,1±0,25	2,1±0,10	2,0±0,33	2,0±0,33	2,0±0,11	0,00±0,50	0,00±0,27	4,76±0,50
14	2,4±0,34	2,3±0,27	2,3±0,27	2,3±0,17	2,2±0,19	2,2±0,21	2,2±0,21	2,2±0,07	8,33±0,39	4,35±0,26	8,33±0,35
15	2,2±0,11	2,1±0,18	2,1±0,18	2,1±0,18	2,0±0,12	2,0±0,16	2,0±0,16	2,0±0,14	9,09±0,17	4,76±0,22	9,09±0,18
16	2,2±0,11	2,1±0,09	2,1±0,09	2,0±0,05	2,0±0,05	1,9±0,10	1,9±0,10	1,9±0,10	9,09±0,12	0,00±0,07	13,64±0,15
17	2,2±0,26	2,2±0,25	2,2±0,25	2,1±0,18	2,1±0,18	2,0±0,17	2,0±0,18	2,0±0,20	4,55±0,32	0,00±0,26	9,09±0,18
18	2,2±0,33	2,2±0,29	2,2±0,29	2,1±0,18	2,0±0,18	1,9±0,16	1,9±0,16	1,9±0,16	9,09±0,38	4,76±0,26	13,64±0,15

Média de três repetições ± desvio padrão; \*Porcentagem de redução do halo de inibição (Média da diferença entre os dias de armazenamento ± desvio padrão por erro de propagação).

Conforme características descritas anteriormente, nos ensaios de difusão em ágar, observou-se a predominância de fungos filamentosos do gênero *Penicillium* (Figura 4.3) com redução gradual dos halos de inibição ao longo do período de incubação para todos os ensaios. O maior desenvolvimento de espécies de *Penicillium* frente aos demais fungos pode ser devido à sua capacidade de crescer em uma ampla gama de temperaturas e disponibilidade de água, e profusa produção de esporos que podem ser transportados pelo ar e suspensos na atmosfera (Magan, 2007).

**Figura 4.3 - Aspecto dos halos de inibição (Ensaio 5) após 2, 5 e 8 dias, respectivamente (da esquerda para a direita).**



Fonte: Acervo pessoal.

A Tabela 4.4 resume os resultados da ANOVA, incluindo as equações polinomiais codificadas de segunda ordem, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), e os valores de F e p-valor. Após 1 dia de incubação o diâmetro dos halos de inibição variou de 1,9 a 3 cm e não foi influenciado pelas variáveis independentes dentro da faixa estudada ( $R^2 = 0,6932$ ). Após 2 dias de incubação, os halos de inibição apresentaram diâmetros que variaram de 1,9 a 2,6 cm. Segundo a ANOVA, o valor de  $R^2$  obtido foi de 0,8174, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $< 0,001$ , indicando que o modelo matemático de segunda ordem prediz os valores experimentais.



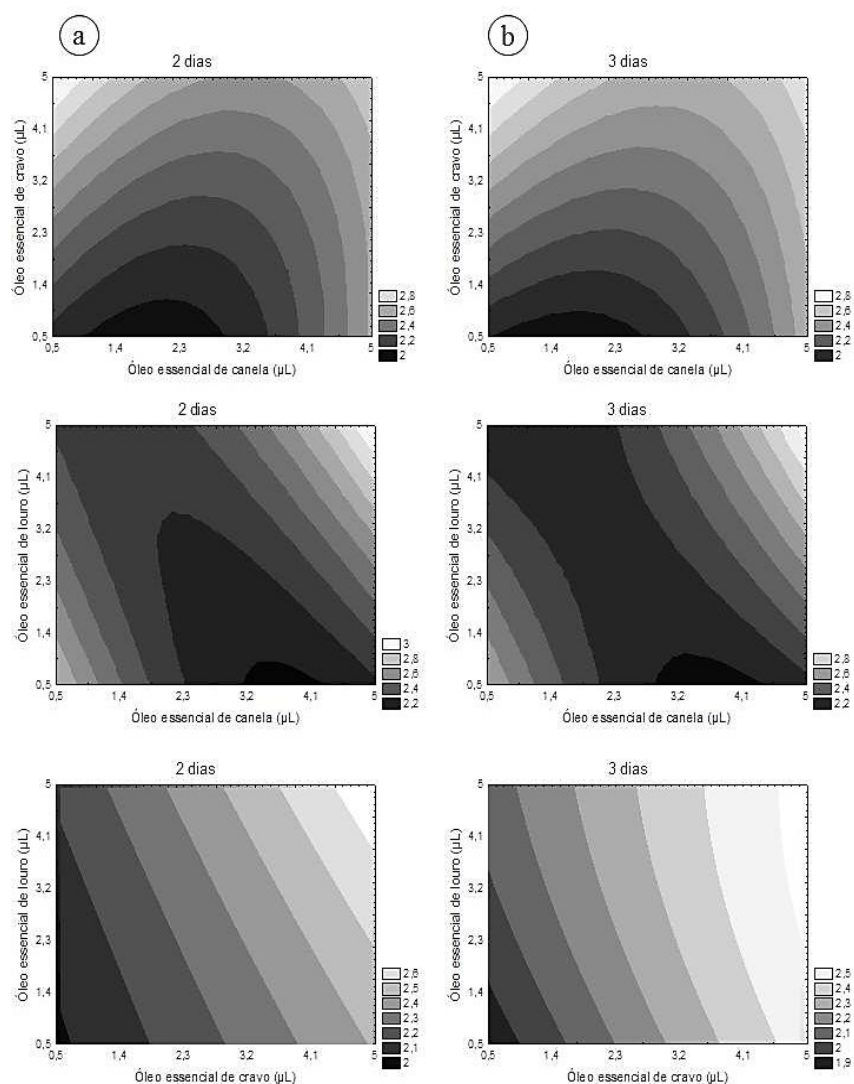
**Tabela 4. 4 - Modelos matemáticos das variáveis dependentes estatisticamente significativas ( $p < 0,10$ ) para as proporções de óleos essenciais nos ensaios in vitro**

<b>Variável dependente (halo de inibição ao longo dos dias de incubação)</b>	<b>Modelo matemático</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-valor</b>	<b>F<sub>tab</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub>/F<sub>cal</sub></b>
2 (cm)	$2,1927+0,1618x_2+0,0686x_3+0,1049x_1^2-0,0500x_1x_2-0,1250x_1x_3$	0,82	<0,001	2,39	4,49
3 (cm)	$2,1716+0,0589x_1+0,1691x_2+0,0466x_3+0,0960x_1^2-0,0625x_1x_2+0,1125x_1x_3$	0,95	<0,001	2,47	9,07
4 (cm)	$2,1038+0,0712x_1+0,1815x_2+0,0466x_3+0,1098x_1^2+0,0390x_3^2-0,0625x_1x_2+0,1125x_1x_3$	0,93	<0,001	2,41	8,39
5 (cm)	$2,0514+0,1911x_1+0,3699x_2+0,0416x_3+0,0684x_1^2-0,0684x_2^2-0,2250x_1x_2+0,0750x_1x_3$	0,89	<0,001	2,43	11,28
6 (cm)	$1,9650+0,2547x_1+0,4189x_2+0,0558x_1^2-0,0682x_2^2-0,2625x_1x_2+0,1125x_1x_3+0,0875x_2x_3$	0,87	<0,001	2,43	9,26
7 (cm)	$1,9500+0,2548x_1+0,4066x_2-0,2625x_1x_2$	0,86	<0,001	2,52	11,54
8 (cm)	$1,9637+0,2694x_1+0,4066x_2+0,0545x_1^2-0,0872x_2^2-0,2625x_1x_2+0,1125x_1x_3+0,1125x_2x_3$	0,92	<0,001	2,41	7,33
1/5* (%)	$8,0548-7,5166x_1-11,9308x_2+3,1068x_1^2+3,5696x_2^2+8,9684x_1x_2+3,9931x_2x_3$	0,87	<0,001	2,39	5,00
4/5* (%)	$4,8349-5,9831x_1-9,5543x_2+3,7515x_2^2+8,2957x_1x_2$	0,86	<0,001	2,43	8,44
1/8* (%)	$12,0116-10,9595x_1-13,8866x_2+3,5644x_1^2+4,9595x_2^2+11,1029x_1x_2-2,3080x_2x_3$	0,82	0,001	2,39	3,60

$x_1$ : óleo essencial de canela;  $x_2$ : óleo essencial de cravo e  $x_3$ : óleo essencial de louro; \*Porcentagem de redução do halo de inibição.

Conforme observado pelas curvas de contorno (Figura 4.4-a), o OE de cravo apresentou maior efeito antifúngico no termo linear ( $\beta_2=0,16$ ). As interações entre os OEs de canela e cravo mostraram efeito antagônico ( $\beta_{12}=-0,05$ ), gerando halos menores, enquanto a interação entre OE de canela e louro apresentou efeito sinérgico ( $\beta_{13}=0,12$ ), com maior inibição do crescimento de bolores. Após 3 dias de incubação, a ANOVA apresentou  $R^2$  de 0,9538, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $<0,001$ , o que possibilitou a geração das curvas de contorno (Figura 4.4-b). Os resultados foram semelhantes ao segundo dia, o que pode ser observado pelo comportamento gráfico (Figura 4.4) e pelos valores dos coeficientes de regressão que se semelhantes ( $\beta_2=0,17$ ;  $\beta_{12}=-0,06$  e  $\beta_{13}=0,11$ ).

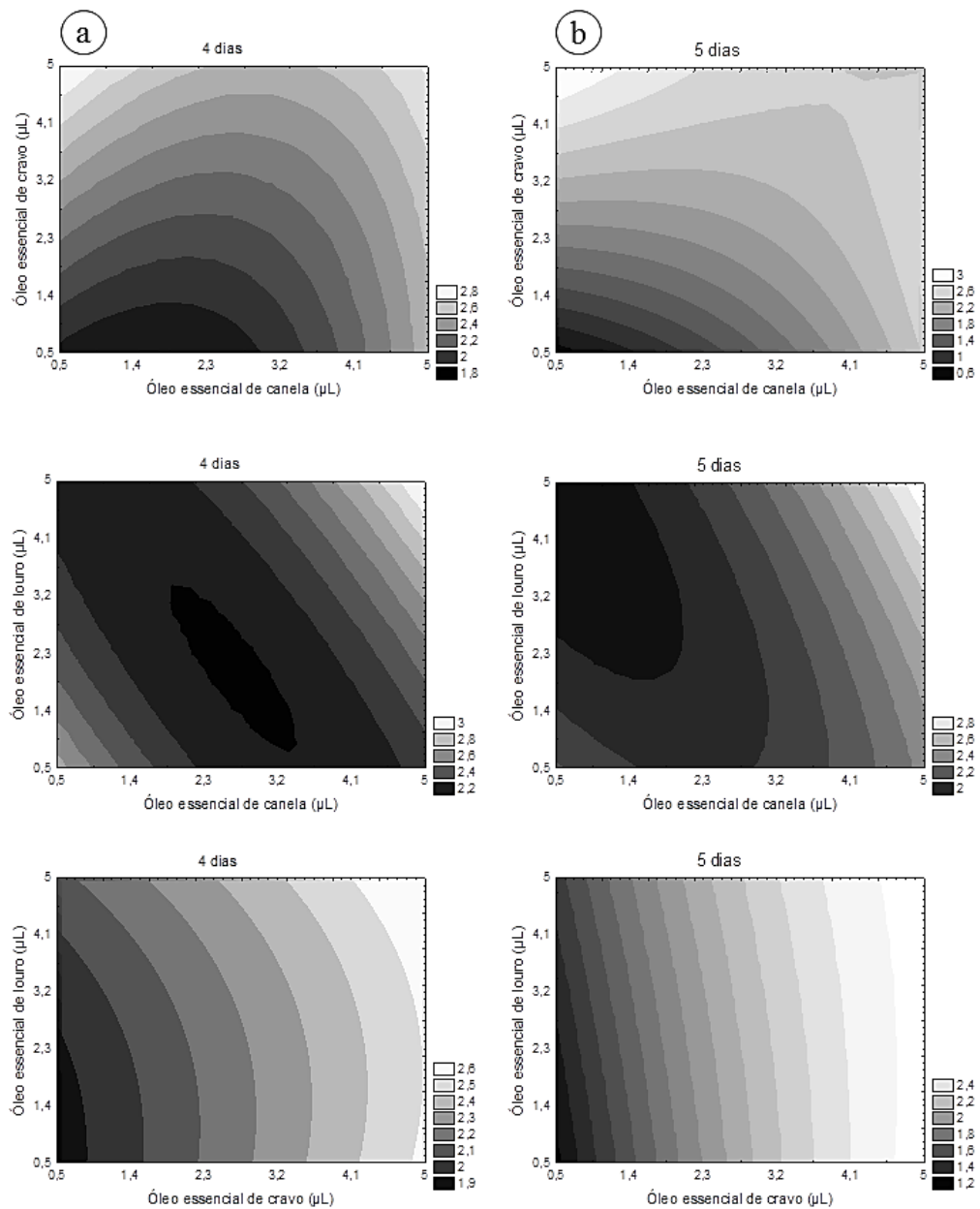
**Figura 4.4 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição após 2 dias (a) e 3 dias (b) de incubação.**



Fonte: Elaboração própria.

Após 4 dias, o diâmetro dos halos de inibição variou entre 1,8 e 2,6 cm, sendo influenciado estatisticamente ( $p \leq 0,10$ ) pelas três variáveis independentes. Os valores preditos do modelo matemático (Tabela 4.4) são explicados pelo  $R^2$  de 0,9340 da ANOVA, a qual ainda resultou em razão  $F_{cal}/F_{tab}$  maior que 1 e p-valor  $< 0,001$ , possibilitando assim a geração das curvas de contorno (Figura 4.5-a). Os resultados mantiveram a tendência das respostas observadas nos dias anteriores ( $\beta_2=0,18$ ;  $\beta_{12}=-0,06$  e  $\beta_{13}=0,11$ ).

**Figura 4.5 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição após 4 dias (a) e 5 dias (b) de incubação.**

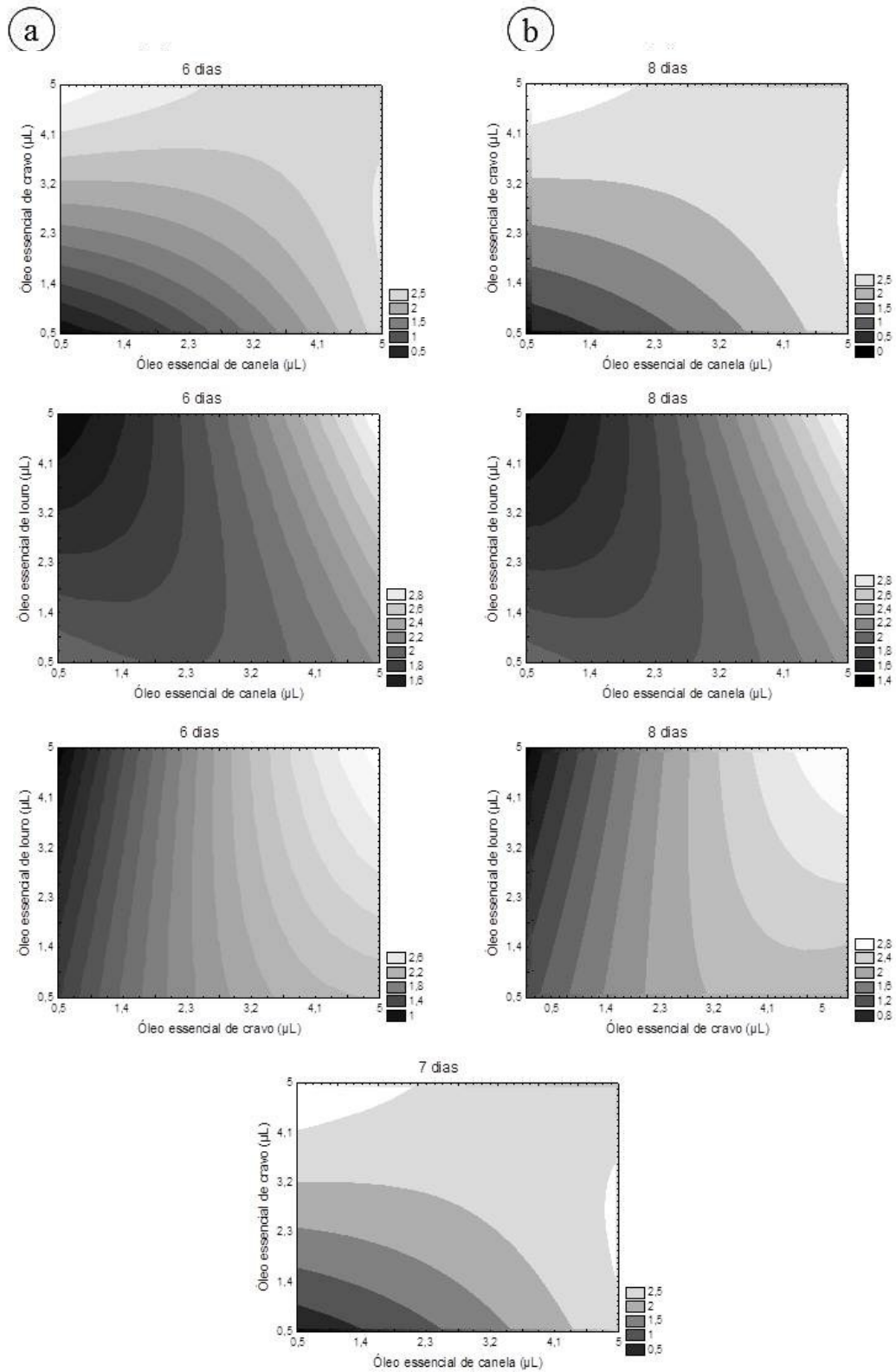


Fonte: Elaboração própria.

No quinto dia de incubação, os halos apresentaram diâmetros entre 1,2 e 2,6. Segundo a ANOVA, o valor de  $R^2$  obtido foi de 0,9738, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $<0,001$ , indicando que o modelo matemático de segunda ordem (Tabela 4.4) prediz os valores experimentais, possibilitando assim a geração das curvas de contorno (Figura 4.5-b). Tais curvas apontam resultados ainda semelhantes aos dias anteriores, porém os fatores de interação apresentaram-se maiores ( $\beta_2=0,37$ ;  $\beta_{12}=-0,22$  e  $\beta_{13}=0,07$ ). Observou-se que o efeito antifúngico do óleo essencial de cravo foi mais acentuado, quando comparado ao período precedente.

No sexto dia, o diâmetro dos halos variou entre 1,1 e 2,6 cm. A ANOVA apresentou  $R^2$  de 0,9390, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $<0,001$ , possibilitando a geração das curvas de contorno (Figura 4.6-a). Verificou-se a influência das interações entre as variáveis  $X_2$  (cravo) e  $X_3$  (louro) ( $\beta_{23}=0,09$ ), com efeito sinérgico entre os OEs. Depois de 7 dias de incubação, a ANOVA apresentou valor de  $R^2$  de 0,8617, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $<0,001$ , indicando que o modelo matemático de segunda ordem (Tabela 4.4) prediz os valores experimentais, possibilitando assim a geração da curva de contorno das interações entre os OEs de cravo e canela (Figura 4.6). No entanto, a variável independente  $X_3$  (louro) não influenciou significativamente no diâmetro dos halos de inibição no dia avaliado. Não foi verificado efeito sinérgico de nenhuma das combinações. O OE de cravo continuou apresentando maior efeito significativo ( $\beta_2=0,40$ ) e a interação entre os OEs de canela e cravo efeito antagônico ( $\beta_{12}=-0,26$ ). No oitavo dia, a ANOVA apresentou  $R^2$  de 0,9252, a razão  $F_{cal}/F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $<0,001$ , possibilitando a geração das curvas de contorno (Figura 4.6-b). Os resultados assemelharam-se aos encontrados após 6 dias de incubação. Foi verificado efeito sinérgico tanto entre os OEs de louro e canela ( $\beta_{13}=0,11$ ), quanto de louro e cravo ( $\beta_{23}=0,11$ ).

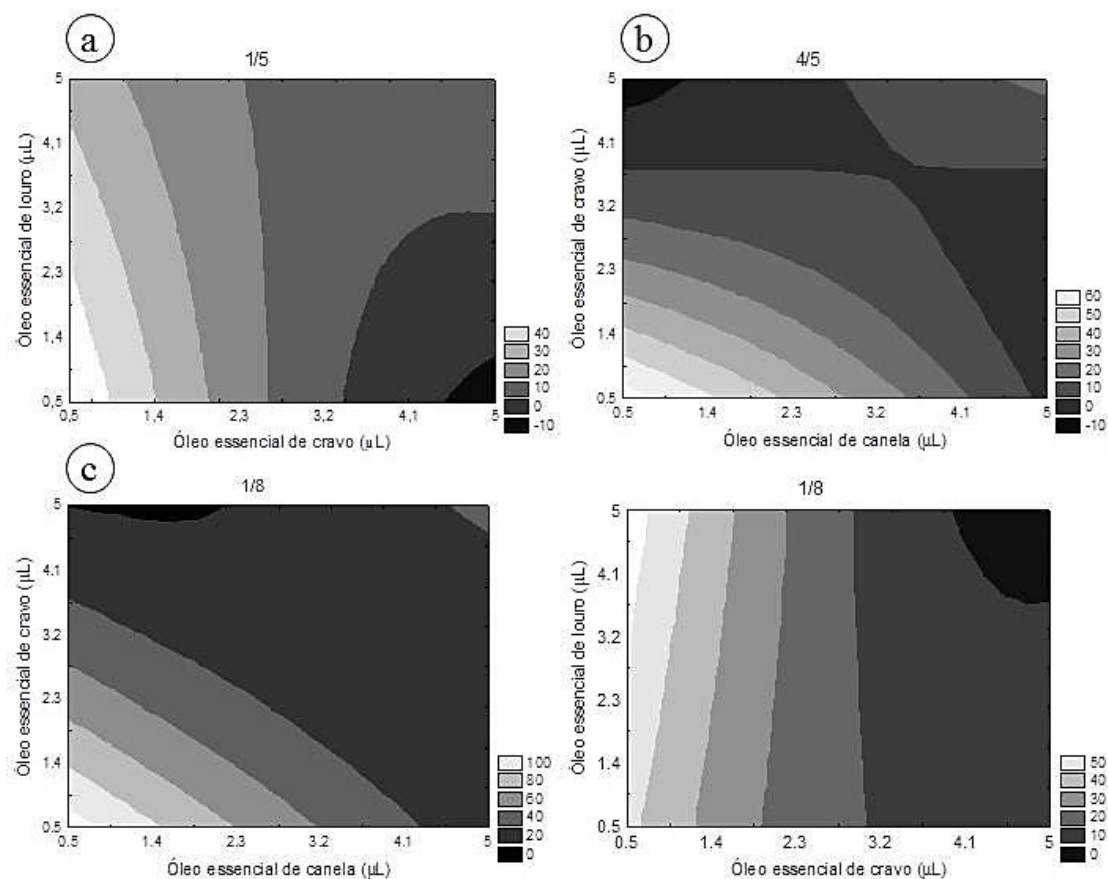
**Figura 4. 6 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição após 6 dias (a), 7 dias (centralizado na parte inferior) e 8 dias (b) de incubação.**



Fonte: Elaboração própria.

Posteriormente, realizou-se uma avaliação do efeito antifúngico prolongado através da porcentagem de redução do diâmetro dos halos de inibição ao longo dos dias de incubação. Neste trabalho são apresentados somente os resultados dos dias em que esta resposta foi estatisticamente significativa. Entre o primeiro e o quinto dia, a ANOVA apresentou  $R^2$  de 0,8670. Já entre o quarto e o quinto dia o  $R^2$  foi de 0,8633 e entre o primeiro e oitavo  $R^2$  foi igual a 0,8245. Em todos estes casos a razão  $F_{cal}/ F_{tab}$  foi maior que 1 e p-valor  $\leq 0,001$ , possibilitando a geração das curvas de contorno (Figura 4.7).

**Figura 4.7 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição entre o primeiro e quinto dias de incubação (a) quarto e quinto dia (b) e primeiro e oitavo dias (c), dado em porcentagem.**



Fonte: Elaboração própria.

Os melhores resultados seriam os fatores isolados e/ou combinados nos quais a redução dos halos fosse mínima, indicando efeito antimicrobiano prolongado e de maior eficiência. O efeito positivo das variáveis independentes e sinérgico, neste caso, foi observado

para coeficientes de regressão negativos. Até o quinto dia de incubação houve efeito dos OEs de canela ( $\beta_1 = -7,5166$ ) e cravo ( $\beta_2 = -11,9308$ ) influenciando positivamente na manutenção da efetividade antifúngica (Figura 4.7-a). Entre o quarto e quinto dia os resultados foram semelhantes, no entanto houve menor efeito antifúngico ( $\beta_1 = -5,9831$ ;  $\beta_2 = -9,5543$ ), pois a diferença é de apenas um dia (Figura 4.7-b). Na comparação entre o primeiro e oitavo dia, além dos efeitos isolados dos OEs de canela e louro ( $\beta_1 = -10,9595$ ;  $\beta_2 = -13,8866$ ), foi verificada a influência da interação entre os OEs de cravo e louro com baixa diminuição do diâmetro dos halos ( $\beta_{23} = -2,3080$ ) (Figura 4.7-c).

Em geral, foi considerado como resultado de maior significância a diminuição do halo entre os dias 1 a 8 por ser o tempo máximo de incubação avaliado. Desta forma, o melhor efeito foi obtido com uso do OE de cravo, seguido pela canela. O OE de louro de forma isolada não apresenta um efeito promissor, mas o uso combinado com OE de cravo mostra-se vantajoso.

De acordo com Mishra e colaboradores (2015), os efeitos sinérgicos são devidos à presença de compostos fenólicos e alcoólicos em OEs e à similaridade entre os compostos fenólicos dos mesmos. Enquanto a interação entre hidrocarbonetos monoterpênicos não oxigenados e oxigenados contribui para o efeito antagônico. O mecanismo mais comumente aceito para a atividade de inibição sinérgica são a inibição sequencial de uma via bioquímica comum, a inibição de enzimas protetoras e o uso de agentes ativos na parede celular para aumentar a captação de outros antimicrobianos.

Os efeitos antifúngicos *in vitro* de OEs variam de acordo com sua composição, concentração e espécie de fungos deteriorantes presentes no alimento. Souza e colaboradores (2004) relataram que o OE de cravo inibiu o desenvolvimento dos fungos *Aspergillus niger*, *Rhizopus* sp. e *Eurotium repens* com a concentração de 600  $\mu\text{g/mL}$  e do fungo *Penicillium* spp. com a de 800  $\mu\text{g/mL}$ . Entre os OEs avaliados no presente estudo foi verificado o maior efeito inibidor do OE de cravo, enquanto a inibição de *Penicillium* spp., foi menor quando comparada as demais espécies isoladas dos pães de forma integrais. Xing e colaboradores (2010) determinaram a atividade antifúngica de óleo essencial de canela contra *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium expansum*. Os resultados mostraram que as CIM's foram de 0,64 % (v/v), 0,16 % (v/v) e 0,16 % (v/v), respectivamente. Sendo assim o maior efeito foi verificado para inibição de *R.nigricans*. Tais resultados podem estar associados à predominância de *Penicillium* spp. no presente estudo e sua provável resistência aos efeitos inibitórios de eugenol e linalol.

Observa-se que os OEs apresentam maior especificidade para inibir determinadas espécies, uma vez que os princípios ativos dos seus compostos majoritários são distintos. Sendo assim, o uso combinado pode ser uma alternativa de associar os efeitos inibitórios de diferentes componentes frente às espécies deteriorantes de alimentos.

#### ***4.3.3 Validação dos modelos matemáticos***

A validação dos valores preditos na análise estatística (Tabela 4.5) mostrou que os valores reais não foram condizentes aos preditos pelos modelos matemáticos, na maioria dos casos (desvio relativo > 20%). No entanto, do sexto ao oitavo dias de incubação o diâmetro dos halos de inibição teve o comportamento esperado (desvio relativo < 20%). Para a validação dos modelos matemáticos foram avaliadas duas soluções (1 e 2) com diferentes proporções dos OEs estudados. Os resultados levaram a escolha da solução 1 como a ideal por apresentar halos de inibição com diâmetro superior ao predito pelo modelo matemático e menor desvio relativo para a maioria dos casos, quando comparado à solução 2.



Tabela 4. 5 - Restrições utilizadas para definição do ponto ótimo

Variável	Objetivo	Limite Mínimo	Limite máximo	Importância	Solução 1	Valor experimental	Desvio Relativo (%)	Solução 2	Valor experimental	Desvio Relativo (%)
X <sub>1</sub>	Maximizar	-1,68	1,68	5	1,33 <sup>a</sup>	-	-	1,06 <sup>a</sup>	-	-
X <sub>2</sub>	Maximizar	-1,68	1,68	5	1,68 <sup>a</sup>	-	-	0,44 <sup>a</sup>	-	-
X <sub>3</sub>	Maximizar	-1,68	1,68	2	0,37 <sup>a</sup>	-	-	1,68 <sup>a</sup>	-	-
Dia 2	Maximizar	1,90	2,60	5	2,56 <sup>b</sup>	3,90	34,40	2,47 <sup>b</sup>	3,80	35,00
Dia 3	Maximizar	1,90	2,60	5	2,64 <sup>b</sup>	3,80	30,50	2,67 <sup>b</sup>	3,70	27,84
Dia 4	Maximizar	1,80	2,60	5	2,64 <sup>b</sup>	3,60	26,70	2,74 <sup>b</sup>	3,50	21,71
Dia 5	Maximizar	1,20	2,60	5	2,41 <sup>b</sup>	3,40	29,10	2,58 <sup>b</sup>	3,30	21,82
Dia 6	Maximizar	0,60	2,60	5	2,44 <sup>b</sup>	3,00	18,70	2,61 <sup>b</sup>	3,00	13,00
Dia 7	Maximizar	0,60	2,60	5	2,35 <sup>b</sup>	2,80	16,10	2,24 <sup>b</sup>	2,70	17,04
Dia 8	Maximizar	0,50	2,60	5	2,39 <sup>b</sup>	2,50	4,40	2,63 <sup>b</sup>	2,30	14,35
1/5	Minimizar	0	60	5	8,40 <sup>c</sup>	5,98	49,60	0,33 <sup>c</sup>	34,29	99,04
4/5	Na faixa	0	42,9	3	9,22 <sup>c</sup>	3,12	44,20	3,13 <sup>c</sup>	5,71	45,18
1/8	Na faixa	3,70	76,19	3	18,08 <sup>c</sup>	35,98	49,60	1,11 <sup>c</sup>	5,71	80,56

X<sub>1</sub>: óleo essencial de canela; X<sub>2</sub>: óleo essencial de cravo; X<sub>3</sub>: óleo essencial de louro; <sup>a</sup>nível codificado para a otimização da concentração dos Óleos essenciais; <sup>b</sup>diâmetro otimizado dos halos de inibição; <sup>c</sup>porcentagem otimizada de redução do halo de inibição.

Nos ensaios de validação foram utilizados bolores isolados de lotes de pães integrais distintos das análises do DCCR, o que pode ter resultado em variação na microbiota presente, conseqüentemente influenciando nos valores experimentais. Além disso, foi obtida uma menor concentração do inóculo ( $1,90 \times 10^6$  UFC/ g), o que poderia justificar maiores halos. O período de incubação para contagem de bolores se estende de 5 a 7 dias de incubação em ensaios in vitro. Sendo assim, o modelo se aplica para o tempo médio de desenvolvimento das colônias, o que torna esta metodologia eficiente para avaliação do efeito inibitório de agentes antifúngicos.

A otimização do efeito antifúngico considerando as variáveis dependentes estatisticamente significativas, o objetivo desejado e a importância das variáveis resultou na definição de uma solução ótima com desejabilidade de 93,8 %, em que o volume corresponde a 11,77  $\mu$ L da mistura de OEs na proporção de 34,2 % de OE de canela, 42,5 % de OE de cravo e 23,3 % de OE de louro.

#### **4.3.4 Concentração inibitória mínima e mínima letal**

O inóculo das colônias totais desenvolvidas nos pães apresentou tanto a CIM quanto a CML de 20  $\mu$ L de mistura de OEs por mL de inóculo ( $1,9 \times 10^6$  UFC/ g). Para os fungos isolados observou-se que a CIM foi de 5, 10 e 5  $\mu$ L/mL para *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, respectivamente. Enquanto a CML foi de 10, 20 e 10  $\mu$ L de mistura de OEs por mL de inóculo, respectivamente. Desta forma, por apresentar concentrações mais elevadas, acredita-se que os fungos do gênero *Penicillium* apresentem maior resistência à mistura de OEs, quando comparado aos demais fungos identificados nos pães de forma integrais.

Conforme descrito na avaliação do planejamento experimental, a interação entre os componentes dos OEs na mistura pode ter afetado sua forma de ação individual, devido ao sinergismo ou antagonismo verificado entre os mesmos. Os resultados do presente estudo foram satisfatórios na inibição do crescimento dos fungos o que leva a inferir que a mistura otimizada poderá diminuir o desenvolvimento fúngico em pães de forma integrais.

#### **4.4 Conclusões**

Os resultados do presente estudo mostraram que os OEs estudados apresentam efeito significativo na inibição do crescimento de fungos isolados de pães de forma integrais.

A combinação de OEs de cravo e canela apresenta efeito antimicrobiano antagônico, enquanto os OEs de cravo e louro possuem efeito sinérgico. Avaliando a mistura dos três OEs, determinou-se a proporção ótima que foi de 34,2 % de OE de canela, 42,5 % de OE de cravo e 23,3 % de OE de louro. Nesta proporção, tanto a CIM quanto a CML foram de 20 µL de OEs por mL de inóculo. Os compostos ativos presentes nos OEs avaliados apresentam-se como uma alternativa viável para aplicação como antifúngicos. Para validação dos resultados em uma matriz alimentar, devem ser realizados experimentos com intuito de verificar a eficiência da proporção ótima determinada.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à UFVJM e ao ICT pelo suporte institucional. Ao CNPq pelo suporte financeiro, à FAPEMIG pela bolsa de estudos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro, código de financiamento 001.

### **4.5 Referências**

- Amara AA, El-Masry MH, Bogdady HH (2008) Plant crude extracts could be the solution: Extracts showing in vivo antitumorigenic activity. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21: 159-171
- Camargo SB, Vasconcelos DFA (2014) Atividades biológicas de linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpeno. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, Salvador, 13: 381-387
- Cardoso PG, Pereira OL, Araújo EF (2007) Diferenciação morfológica e molecular de fungos produtores de pectinases: *Penicillium expansum* e *Penicillium griseoroseum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 71-77
- Cauvain SP, Young LS (2009) *Technology of breadmaking*. 2. Ed. ISBN 978-85-204-2706-4.
- Costa ART, Amaral MFZJ, Martins PM, Paula JAM, Fiuza TS, Tresvenzol LMF, Paula JR, Bara, MTF (2011) Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.2, p.240-245

- Derringer GC, Suich R (1980) Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219
- Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3 (12)
- Klich MA (2002) Identification of Common *Aspergillus* species. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 116 p
- Krisch J, Tserennadmid R, Vagvölgyi C (2011) Essential oils against yeasts and moulds spoilage. In: Mendez-Vilas, A. (ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* 2, 1135-1142
- Lee R, Balick MJ (2005) Sweet wood-cinnamon and its importance as a spice and medicine. *The Journal of Science and Healing*. v.1, 61–64
- Legan JD (1993) Mould spoilage of bread: The problem and some solutions. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 32, 33-53
- Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Parker M (2006) Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 180–185
- Mishra VK, Gupta S, Pundir RK (2015) Synergistic antimicrobial activity of essential oil and chemical food preservatives against bakery spoilage fungi. *CIBTech Journal of Microbiology*, 4: 6-12
- Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31: 247- 256
- Pitt JI, Hocking AD (1997) *Fungi and food spoilage*. 2. ed. London: Blackie Academic and Professional
- Rodrigues M, Iemma AF (2009) Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2.ed revisada e ampliada. Campinas: Cárita Editora, 358p. ISBN: 859838903X.
- Santoyo S, Lloria S, Jaime L, Ibañez E, Señorans FJ, Reglero G (2006) Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis*: chemical and functional characterization. *European Food Research Technology*, 222, 565-571
- Saranraj P, Geetha M (2012) Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(1), 38-48

- Schmiele M, Jaekel LZ, Patricio SMC, Steel CJ, Chang YK (2012) Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (10), 2141-2150
- Seiler D (1992) Basic guide to product spoilage and hygiene. Part 1: Mould growth on bread. *Chorleywood Digest No. 124*, CCFRA, Chipping Campden, UK, p.23.
- Shylaja MR, Peter KV (2004) The functional role of herbal spices. In: *Handbook of herbs and spices*. v2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited
- Silva FC (2008) Efeito in vitro e in vivo dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão. *Dissertação de Mestrado*. Lavras: UFLA, 85 p.
- Silveira MP, Schmiele M (2018) Influência nas características tecnológicas e atividade antifúngica de condimentos em pó adicionados em pães de forma. In: *Anais do IV Congresso Mineiro de Engenharia de Alimento: UFLA, Lavras*
- Souza SMC, Pereira MC, Angélico CL, Pimenta JC (2004) Avaliação de óleos essenciais de condimentos sobre o desenvolvimento micelial de fungos associados a produtos de panificação. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 28, n. 3, p. 685-690
- Tanackov DK, Dimic GR (2013) Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi growth and mycotoxin biosynthesis in food. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*
- Xing Y, Li X, Xu Q, Yun J, Lu Y (2010) Antifungal activities of cinnamon oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium expansum* in vitro and in vivo fruit test. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 1837–18425



## 5 ARTIGO CIENTÍFICO III: ÓLEOS ESSENCIAIS DE CANELA, CRAVO E LOURO COMO CONSERVANTES DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS - APLICAÇÃO IN SITU

Mariana Pereira Silveira, Karine Guimarães Moreira, Aline Teixeira Camargo, Marcio Schmiele

### RESUMO

Possíveis efeitos tóxicos de conservantes químicos têm renovado o interesse dos consumidores e, conseqüentemente, da indústria de alimentos pela substituição destes por substâncias naturais. Os óleos essenciais (OEs) são metabólitos secundários produzidos por certas espécies de plantas que podem atuar como agentes antifúngicos. Os pães de forma, por sua vez, são alimentos altamente perecíveis e susceptíveis à deterioração, principalmente por fungos filamentosos. Desta forma, foi realizada a aplicação de uma mistura previamente otimizada de OEs de canela (*Cinamomum cassia*), cravo (*Eugenia caryophyllus*) e louro (*Laurus nobilis*) em pães de forma integrais pelos métodos de adição à massa e aspensão na superfície, com o objetivo de retardar o desenvolvimento de bolores deteriorantes. Os resultados indicaram que com a adição direta de OEs à massa dos pães (0 a 1,42  $\mu\text{L}$  OEs/g massa) a vida-de-prateleira foi insatisfatória, com apenas 7 dias de durabilidade. Entretanto, a aplicação da mistura de OEs na superfície dos pães na concentração de 3,0  $\mu\text{L}$  OEs/g massa resultou em pães integrais com vida útil de 22 dias, mantidas as propriedades de conservação, textura instrumental e umidade adequadas, quando comparadas aos tratamentos controle.

**Palavras-chave:** conservação de alimentos; bolores; panificação; antimicrobianos naturais.

## ABSTRACT

Possible toxic effects of chemical preservatives have renewed the interest of consumers and hence of the food industry by replacing these with natural substances. Essential oils (EOs) are secondary metabolites produced by certain species of plants that can act as antifungal agents. Form breads, in turn, are highly perishable and susceptible to spoilage, mainly by filamentous fungi. The application of a previously optimized mixture of cinnamon (*Cinamomum cassia*), clove (*Eugenia caryophyllus*) and laurel (*Laurus nobilis*) EOs was carried out in whole-grain breads using mass addition and surface spraying methods. retard the development of deteriorating molds. The results indicated that with the direct addition of EOs to the bread mass (0 to 1.42  $\mu\text{L}$  EOS / g mass) the shelf-life was unsatisfactory, with only 7 days of durability. However, the application of OE mixture on the surface of the loaves in the concentration of 3.0  $\mu\text{L}$  EO / g mass resulted in whole loaves with a 22-day shelf life, maintaining adequate conservation, texture and moisture properties when compared to treatments control.

**Key-words:** food preservation; molds; baking; antimicrobial agents.



## 5.1 Introdução

Os produtos de panificação são considerados alimentos essenciais à grande maioria da população mundial (Saranraj & Geetha, 2012). No entanto, como muitos alimentos processados, estão sujeitos à deterioração física, química e microbiológica. Devido à elevada ocorrência de fungos filamentosos em cereais e às características intrínsecas e extrínsecas dos pães, a deterioração por fungos é de extrema importância e limitante na estabilidade destes produtos, incluindo os integrais (Santos, 2015). Usualmente, as indústrias utilizam a adição de propionato de cálcio (0,1 % em base farinha) à massa como forma de aumentar a vida útil de produtos de panificação. O sorbato de potássio (0, 1% em base farinha), por sua vez, é um fungistático aplicado através de aspersão na superfície dos pães, após o forneamento.

Ácido propiônico e seus sais agem distorcendo o equilíbrio do pH de microorganismos. A diminuição do pH celular interno pela ionização das moléculas do ácido leva a eliminação do fornecimento de substrato à célula, causando a inibição do desenvolvimento microbiano. Os propionatos agem principalmente contra o desenvolvimento de bolores. Como sua eficácia contra leveduras é mínima, podem ser utilizados no pão sem prejudicar a atividade de fermentação da massa (Cauvain & Young, 2009).

Ácido sórbico e sorbato de potássio têm sido usados para retardar a deterioração microbiana em uma grande variedade de alimentos, incluindo produtos de panificação. Em geral, o ácido sórbico é eficaz contra bactérias, bolores e leveduras, sendo o principal uso comercial do sorbato como fungistático. Este conservante é comumente utilizado através de aspersão na superfície de pães de forma, utilizando álcool de cereais como veículo.

Em virtude da natureza química destes compostos, associada à toxicidade e efeitos adversos à saúde, a substituição deste tipo de conservante tem sido preconizada pela indústria de alimentos visando a utilização de compostos naturais que apresentem efeito semelhante, satisfatório e considerado seguro (Ray & Bullerman, 2001).

Os óleos essenciais (OEs) são compostos voláteis constituídos de uma mistura de diferentes concentrações de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos sulfurados. Tratam-se de compostos de baixo peso molecular produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, variando a intensidade e a composição de acordo com a espécie, fatores ambientais e o estágio de desenvolvimento da planta (Simões & Spitzer, 2004). Embora a indústria de alimentos utilize os OEs principalmente como

aromatizantes, os mesmos representam uma fonte antimicrobiana e antioxidante natural alternativa, podendo ser utilizados na conservação dos produtos (Hyltdgaard et al., 2012).

O cravo (*Eugenia caryophyllus*) é uma espécie vegetal explorada principalmente para extração industrial do OE, obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes. Os estudos fitoquímicos indicam a presença do eugenol como composto majoritário, sendo este o principal responsável pela atividade antioxidante, antifúngica e antibacteriana (Costa et al., 2011). A canela (*Cinnamomum cassia*) é rica em linalol e cinamaldeído, bem como  $\beta$ -cariofileno e outros terpenos. O OE de canela é útil como conservante de alimentos para inibir crescimento de espécies de fungos, sendo reconhecido pela Food and Drug Administration (FDA) como aditivo seguro (GRAS – Generally Recognized as Safe) (Matan et al., 2006). O louro (*Laurus nobilis*), cujo principal componente é o 1,8-cineol, possui propriedades antifúngica, inseticida e antibacteriana relatadas em diversos estudos que atestam suas aplicações potenciais para uso em alimentos (Preedy, 2016).

Embora os OEs e seus componentes sejam altamente eficientes em testes *in vitro*, contra micro-organismos patógenos e deterioradores de origem alimentar, o mesmo efeito foi encontrado somente quando concentrações maiores de OEs foram utilizadas em alimentos, o que implicou em um impacto sensorial, por exceder o limite aceitável pelo consumidor (Burt, 2004). Nesse sentido, deve-se observar a forma de aplicação, a complexidade da matriz alimentícia e as interações dos OEs com o alimento para viabilizar o uso destes, tendo como resultado a produção de alimentos palatáveis e seguros.

Diante deste cenário, o presente estudo teve como objetivo avaliar as propriedades de conservação de uma mistura otimizada de OEs de canela, cravo e louro, utilizando a técnica de aspersão na superfície, para possíveis aplicações como antimicrobianos em pães de forma integrais.

## **5.2 Material e métodos**

### **5.2.1 Matérias-primas e formulação**

As matérias-primas (formulação) utilizadas foram farinha de trigo integral reconstituída (100 %), cloreto de sódio (1,8 %), fermento biológico instantâneo (1,6 %), gordura vegetal hidrogenada (4 %), sacarose (4 %), leite em pó integral (4 %), melhorador comercial (1 %) e água filtrada (60 %) (Schmiele et al., 2012). Utilizaram-se ainda

conservantes à base de propionato de cálcio, sorbato de potássio e o OEs de canela, cravo e louro, obtidos comercialmente.

### ***5.2.2 Composição centesimal e propriedades reológicas da farinha de trigo integral reconstituída***

As análises da composição centesimal da farinha de trigo reconstituída foi realizada pela determinação dos teores de umidade (método 44-15.02), cinzas (método 08-12.01), extrato etéreo (método 30-25.01) e proteínas (método 46-11.02, N=5,7) (AACCI, 2010). O teor de carboidratos digeríveis (açúcares e amido) foram determinados pelo método ISI 27-1e (ISI, 1999). A quantidade de fibra alimentar total foi calculada por diferença.

As propriedades reológicas da farinha de trigo integral reconstituída foram determinadas em farinógrafo (Brabender, AT, Duisburg, Alemanha), conforme método 54-21.02 (AACCI, 2010). Os parâmetros registrados foram absorção de água (ABS), tempo de desenvolvimento da massa (TDM), estabilidade (EST) e índice de tolerância à mistura (ITM). A análise de extensografia (Brabender, E, Duisburg, Alemanha), foi determinado conforme método 54-10.01 (AACCI, 2010). Determinaram-se os valores de resistência à extensão ( $R_{50}$ ), resistência máxima ( $R_m$ ), extensibilidade (E), número proporcional (D) e energia (A), considerando-se as leituras em 135 minutos.

Os pães foram produzidos pelo método de massa direta modificado. As massas foram submetidas à mistura e amassamento mecânico (GPaniz, AE-15L, Caxias do Sul, Brasil), divididas em porções de  $400 \pm 2$  gramas, boleadas manualmente, descansadas (10 minutos) e modeladas (Venancio, MPV35, Venâncio Aires, Brasil) e colocadas em forma de alumínio untadas com dimensões de 100 mm de largura, 240 mm de comprimento e 50 mm de altura. Em seguida, as massas foram fermentadas ( $30 \pm 3$  °C e  $95 \pm 3$  % UR, até perda da resiliência determinada pelo toque manual) (Lucadema, RFE38, São José do Rio Preto, Brasil) e forneadas ( $180 \pm 5$  °C) por  $25 \pm 2$  min (Venax, FFI 440, Venâncio Aires, Brasil).

### ***5.2.3 Adição de óleos essenciais à massa***

Os tratamentos realizados foram: DS – controle positivo (sem adição de conservante), DC – controle negativo (com conservante comercial à base de propionato de cálcio) e 5 amostras com diferentes concentrações de OEs (D1, D2, D3, D4 e D5). Tanto o

conservante comercial, quanto a mistura otimizada de OEs de canela (34,2 %), cravo (42,5 %) e louro (23,3 %) foram adicionados à massa na etapa de mistura dos ingredientes, nas concentrações apresentadas na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1 - Tratamentos para aplicação direta dos óleos essenciais de canela, cravo e louro às massas de pães de forma integrais**

<b>Código da amostra</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (µL/g massa)</b>
DS	Sem conservante	0
DC	Propionato de cálcio	0,35
D1		0,28
D2		0,57
D3	Mistura de óleos essenciais	0,85
D4		1,13
D5		1,42

Após o forneamento, os pães foram resfriados por cerca de 90 minutos, acondicionados em embalagens de polietileno de baixa densidade (PEBD) e armazenados à temperatura ambiente por 7 dias. Durante o período de estocagem a temperatura média diária variou entre 20,8 e 22,9°C, a umidade relativa média diária entre 68,2 e 76,2 % e o índice pluviométrico médio diário entre 0 e 4,8 mm, conforme registros do Centro de Previsões de Tempo e Estudos Climáticos do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

#### **5.2.4 Aplicação de óleos essenciais na superfície**

Os pães foram produzidos em batelada única e separados em lotes para aplicação dos tratamentos. Para a técnica de aspersão na superfície foram realizados os seguintes ensaios: SS – controle positivo (sem adição de conservante), SC controle negativo (com conservante comercial à base de sorbato de potássio) e 4 amostras com diferentes concentrações de OEs (S3, S6, S9 e S12), conforme apresentado na Tabela 5.2.

**Tabela 5.2 - Tratamentos aplicados pela técnica de aspersão dos óleos essenciais de canela, cravo e louro nas superfícies dos pães de forma integrais**

<b>Código da amostra</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (<math>\mu\text{L/g}</math> massa)</b>
SS	Sem conservante	0
SC	Sorbato de potássio	3,5
S3		0,75
S6	Mistura de óleos essenciais	1,50
S9		2,25
S12		3,00

O conservante comercial e a mistura de OEs foram aplicados através de aspersão uniforme na superfície dos pães de forma, 30 minutos após o forneamento. Em seguida, os pães foram armazenados em embalagem de PEBD, à temperatura ambiente. Durante o período de estocagem foi verificado que a temperatura média diária variou entre 15,0 e 20,7°C, a umidade relativa média diária entre 66,4 e 96,0% e o índice pluviométrico médio diário entre 0 e 70,4 mm, conforme registros do Centro de Previsões de Tempo e Estudos Climáticos do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).

### **5.2.5 Caracterização dos pães**

Para verificar a influência dos OEs no pH da massa durante a fermentação, foram realizadas medidas antes e após esta etapa de processamento. As análises de atividade de água, volume específico, cor instrumental, pH e acidez titulável total dos pães foram realizadas 24 horas após a produção dos mesmos. Para determinar a vida de prateleira foram conduzidas análises de contagem fúngica (UFC/g), textura instrumental e umidade. Para os testes com aplicação na massa as análises foram realizadas após 1, 4 e 7 dias de armazenamento, enquanto as amostras submetidas à aspersão foram analisadas após 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 22 dias de armazenamento.

#### **5.2.3.1 Atividade de água**

A determinação da atividade de água foi feita por medida direta, com três repetições, através do equipamento higrômetro Aqualab (Decagon, 4TE Duo, Pullman, Estados Unidos).

#### *5.2.3.2 Volume específico*

O volume específico foi determinado através do método de deslocamento de sementes de painço, através do método 10-05.01 (AACCI, 2010).

#### *5.2.3.3 Cor instrumental*

A cor instrumental do miolo foi avaliada através do método 14-22.01 (AACCI, 2010) em colorímetro espectrofotométrico (Konica Minolta, CM5, Chiyoda, Japão). O iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e o sistema de cor CIELAB foram estabelecidos. As leituras foram realizadas em triplicata.

#### *5.2.3.4 pH e acidez titulável total*

As amostras foram preparadas com separação de duas frações distintas, a parte externa da fatia (crosta), com aproximadamente 1 cm de espessura, e a parte interna (miolo). O pH das massas e dos pães foi determinado através do método 02-52.01, utilizando-se pHmetro digital (Tecnopon, AC-100, Piracicaba, Brasil). A acidez titulável total foi determinada através da reação de neutralização por meio de titulação (método 02-31.01). Os resultados foram expressos em % de ácido láctico (AACCI, 2010).

#### *5.2.3.5 Contagem de bolores*

A avaliação microbiológica das amostras foi feita pelo método padrão para contagem de bolores e leveduras (método nº 42.50-01) (AACCI, 2010). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados obtidos foram expressos em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g).

#### *5.2.3.6 Umidade*

A determinação da umidade dos pães foi realizada através de secagem em estufa (Tecnal, TE-394/1, Piracicaba, Brasil) à  $130\pm 2$  °C, de acordo com o método 44-15.02 (AACCI, 2010).

#### *5.2.3.7 Textura instrumental*

Os testes de compressão foram realizados utilizando-se *probe* cilíndrica (P/36) (Stable micro systems, TAX.XT Plus, Godalming, Inglaterra), através do método 74-09.01 (AACCI, 2010). Para a análise de textura foi utilizada a velocidade de pré-teste, teste e pós-teste de 1 mm/s, 1 mm/s e 10,0 mm/s, respectivamente, limiar de detecção de 0,049 N e distância de compressão de 40 %, utilizando-se duas fatias de 12 mm de espessura cada (Venancio, FPV129, Venâncio Aires, Brasil). As leituras foram realizadas com seis repetições. Os parâmetros avaliados foram firmeza e dureza e os dados expressos em N.

#### *5.2.3.8 Análise estatística*

Os resultados foram avaliados por teste de regressão linear, sendo os modelos matemáticos válidos quando apresentaram coeficiente de regressão  $\geq 0,80$ , com confiança de 95 %. Para os resultados das análises microbiológicas foram conduzidos análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

### **5.3 Resultados e discussão**

#### ***5.3.1 Composição centesimal e propriedades reológicas da farinha de trigo integral reconstituída***

A farinha de trigo utilizada nas formulações apresentou  $62,92\pm 0,94$  % de carboidratos digeríveis,  $1,05\pm 0,03$  % de cinzas,  $11,97\pm 0,60$  % de umidade,  $3,60\pm 0,06$  % de lipídeos,  $12,45\pm 0,20$  % de proteínas e  $8,02\pm 0,14$  % de fibra alimentar total (em base úmida). Quanto às propriedades reológicas, a absorção de água foi de  $66,00\pm 0,16$  %, o tempo de desenvolvimento da massa de  $11,33\pm 0,46$  min, a estabilidade de  $13,47\pm 0,79$  min, e o índice de tolerância à mistura foi de  $16,00\pm < 0,01$  UF (Unidades Farinográficas). A resistência à extensão foi de  $711\pm 39$  UB (Unidades Brabender), a resistência máxima de  $711,5\pm 38,5$  UB, a

extensibilidade de  $81,5 \pm 2,5$  mm, o número proporcional correspondente a  $8,75 \pm 0,25$  e a energia de  $69,5 \pm 5,5$  cm<sup>2</sup>.

### 5.3.2 Aplicação na massa

Segundo a Portaria 451, de 19 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), para produtos de panificação (pães, doces, bolos, doces de confeitaria com ou sem recheio e cobertura), o limite máximo para bolores e leveduras é  $5 \times 10^3$  UFC.g<sup>-1</sup>. Apesar de revogar a Portaria 451, a Resolução de Diretoria de Colegiado n° 12, de 12 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), não traz os limites para estes micro-organismos neste tipo de produto.

A contagem de bolores (Tabela 5.3) mostrou que até o quarto dia de armazenamento não foi detectada a presença destes. Entretanto, no sétimo dia todas as amostras apresentaram desenvolvimento fúngico, sendo a amostra sem nenhum conservante (DS) significativamente diferente das demais, com maior número de UFC/g. Todos os valores encontram-se abaixo do estabelecido pela legislação citada, entretanto nestas condições já era possível visualizar colônias fúngicas no produto. Este fato pode estar associado com análises prévias que tenham caracterizado o valor definido pela Portaria 451 como inadequado para limitar a comercialização de produtos de panificação.

**Tabela 5.3 - Contagem de bolores nos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa, expressos em unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC/g)**

Amostra	Dia 1	Dia 4	Dia 7
DS	nd	nd	$3,07 \pm 0,34 \times 10^2$ <sup>a</sup>
DC	nd	nd	$1,67 \pm 0,47 \times 10^1$ <sup>b</sup>
D1	nd	nd	$2,33 \pm 0,47 \times 10^1$ <sup>b</sup>
D2	nd	nd	$3,00 \pm 0,82 \times 10^1$ <sup>b</sup>
D3	nd	nd	$4,00 \pm 0,82 \times 10^1$ <sup>b</sup>
D4	nd	nd	$2,33 \pm 0,47 \times 10^1$ <sup>b</sup>
D5	nd	nd	$1,67 \pm 0,94 \times 10^1$ <sup>b</sup>

Média de três repetições  $\pm$  desvio padrão; nd - não detectado ou valor abaixo do limite de detecção (10 UFC/g).

Conforme se observa na Figura 5.1, a amostra sem nenhum conservante apresentou maior número de colônias visíveis, enquanto as demais possuem pontos isolados e



em menor quantidade. Contudo, pode-se considerar que nenhuma das amostras encontrava-se apta para o consumo.

**Figura 5.1 – Aparência visual externa do pães integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa após 7 dias de armazenamento**



Fonte: Acervo pessoal.

A vida de prateleira dos pães em todos os tratamentos foi superior a 4 dias, mas inferior a 7 dias. Utilizando-se embalagem comercial com baixa barreira ao oxigênio pode-se considerar um resultado interessante, e ainda por apresentar custo compatível o produto pode ser viável para os consumidores.

De acordo com Debonne (2018a), poucos artigos relataram o uso direto de OEs em massa de pão. Supõe-se que isso resulta pelo do fato de que a atividade antifúngica potencial de OEs é parcialmente perdida no tratamento térmico durante o forneamento. Os autores sugerem ainda que este efeito pode ser amenizado com técnicas de encapsulação, proporcionando a liberação gradual dos compostos ativos.

Avaliando o efeito conservante do OE de tomilho em pães, Debonne et al. (2018b) concluíram que, apesar do potencial promissor in vitro do óleo de tomilho, não foi observada uma extensão da vida de prateleira para os pães que pudesse ser atribuída ao OE. A fim de permitir a biopreservação de pães pela adição do OE, sugerem a utilização de compostos menos aromáticos e de um emulsificante para favorecer uma dispersão homogênea do componente ativo antifúngico.

Os parâmetros físico-químicos como pH, temperatura e atividade de água são importantes na determinação da vida útil de produtos de panificação, uma vez que, a maioria

dos fungos são tolerantes a condições ácidas (baixo pH) e crescem dentro de uma faixa de temperatura de 18,3 a 29,4 °C. Além disso, alta umidade e atividade de água favorecem o desenvolvimento dos bolores (Abellana & Ramos, 2001).

Os resultados das análises de pH das massas e pH e acidez titulável total dos pães estão expostos na Tabela 5.4. Para todos os tratamentos houve redução proporcional do pH durante a fermentação, sem diferença estatística entre as amostras. Tal resultado relaciona-se à produção de ácidos orgânicos, produtos secundários do metabolismo das leveduras e bactérias lácticas durante a fermentação e pela solubilização parcial do gás carbônico na água, resultando na formação de ácido carbônico.

**Tabela 5. 4 - pH das massas e pH e acidez titulável total (ATT) dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa**

Amostra	pH da massa		pH		ATT (% em ácido láctico)	
	Antes	Depois	Miolo	Crosta	Miolo	Crosta
DS	5,76±0,02	5,54±<0,01	5,64±0,01	5,61±0,01	4,48±0,12	4,78±0,06
DC	5,42±0,01	5,30±<0,01	5,41±0,01	5,34±0,01	5,28±0,01	5,98±0,02
D1	5,66±<0,01	5,54±0,01	5,41±0,01	5,34±0,03	5,26±0,03	5,97±0,03
D2	5,59±<0,01	5,45±0,01	5,46±0,01	5,56±0,01	4,45±0,06	5,35±0,08
D3	5,62±0,01	5,47±0,05	5,56±0,01	5,53±0,01	4,35±0,08	5,35±0,06
D4	5,54±0,01	5,40±0,02	5,60±0,01	5,58±0,03	4,42±0,04	4,97±0,09
D5	5,56±<0,01	5,47±0,02	5,61±0,01	5,57±0,01	4,53±0,03	4,85±0,11
p-valor	0,843	0,513	0,393	0,012	0,133	0,386
R <sup>2</sup>	0,002	0,023	0,038	0,289	0,115	0,04

Média de três repetições±desvio padrão

O pH e a acidez titulável total dos pães não apresentaram diferença estatística ou comportamento linear em relação a variação da concentração de OEs. Sendo assim, compreende-se que tais parâmetros não foram afetados pela adição dos mesmos. Contudo, o valor médio do pH dos pães foi de 5,50, enquanto a acidez titulável total média foi de 5,0 g ácido láctico/100 g de pão, coerentes com a faixa de valores geralmente encontrados para pães (Debonne et al., 2018b).

Os resultados das análises de atividade de água, volume específico e cor instrumental dos pães são apresentados na Tabela 5.5. Os pães apresentaram altos valores de atividade de água (>0,95), sem diferença estatística entre as amostras. Do ponto de vista do consumidor, o volume específico é um parâmetro extremamente relevante para a qualidade de

pães de forma. Os resultados mostraram que o volume dos pães controle (Amostras 1 e 2) foi superior aos demais tratamentos. Houve diferença estatística, sendo que o aumento da concentração de OEs resultou na diminuição do volume específico. Desta forma, pode-se inferir que a incorporação de OEs influenciou negativamente no metabolismo das leveduras durante a fermentação, diminuindo a produção de CO<sub>2</sub>. Quanto à cor instrumental, nenhum dos parâmetros avaliados foi estatisticamente influenciado pela adição de OEs.

**Tabela 5.5 - Resultados das análises de atividade de água, volume específico e cor instrumental dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa**

Amostra	Atividade de água	Volume específico (g.cm <sup>-3</sup> )	L*	a*	b*
DS	0,9632±0,0044	4,22±0,08	66,62±0,34	4,52±0,11	16,86±0,03
DC	0,9454±0,0065	4,22±0,04	68,71±0,13	4,15±0,16	16,40±0,26
D1	0,9499±0,0049	3,89±0,04	65,57±0,46	4,13±0,05	16,65±0,15
D2	0,9643±0,0016	3,63±0,02	65,90±0,13	4,42±0,07	16,90±0,08
D3	0,9581±0,0058	3,69±0,04	65,85±0,18	4,44±0,03	16,94±0,06
D4	0,9559±0,0018	3,63±0,02	65,95±0,98	4,39±0,14	16,99±0,54
D5	0,9698±0,0032	3,43±0,11	66,23±1,54	4,59±0,54	16,92±0,14
p-valor	0,082	<0,001	0,097	0,144	0,091
R <sup>2</sup>	0,151	0,855	0,138	0,109	0,143

Média de três repetições±desvio padrão.

Ao adicionar OE de tomilho à massa de pão, Debonne et al. (2018b) também encontraram valores de volume específico inferiores aos pães controle. Além disso, na avaliação sensorial, cor e sabor dos pães foram afetados negativamente pela incorporação do OE.

A umidade dos pães reduziu significativamente para todas as amostras ao longo do período de armazenamento (Tabela 5.6). Observou-se que no primeiro dia houve diferença significativa entre as amostras (p=0,001) com tendência de redução da umidade em relação ao aumento da concentração de OEs, entretanto o ajuste linear é baixo (R<sup>2</sup>=0,441) o que significa que o comportamento das respostas não é satisfatoriamente justificado pelos modelos matemáticos. Em relação ao período de armazenamento, houve redução significativa da umidade para todos os tratamentos. Tal efeito pode ser justificado pelos fenômenos que ocorrem no pão durante o envelhecimento, principalmente pela redistribuição da água entre as frações amilácea e proteica. Além disso, ocorre a migração da umidade do miolo para a crosta do pão e destapara a atmosfera, efeito conhecido como sinérese e retrogradação (Cauvain &

Young, 2009). Ao longo do período de estocagem, as ligações de hidrogênio das cadeias do amido com a água são rompidas por apresentarem energia de ativação menor que as ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxilas das cadeias amiláceas, promovendo assim a expulsão da água e a recristalização do amido (Damodaran, Parkin & Fennema, 2010).

**Tabela 5.6 - Resultados das análises de umidade do miolo dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa**

Amostra	Dia 1	Dia 4	p-valor	R <sup>2</sup>
DS	36,22±0,13	30,87±0,12	0,002	0,751
DC	34,60±0,09	33,14±0,21	<0,001	0,930
D1	34,97±0,11	32,49±0,14	<0,001	0,873
D2	33,17±0,16	32,55±0,05	<0,001	0,953
D3	32,55±0,14	32,17±0,22	0,005	0,687
D4	33,25±0,07	30,47±0,11	0,004	0,701
D5	34,29±0,16	32,54±0,03	<0,001	0,957
p-valor	0,001	0,828		
R <sup>2</sup>	0,441	0,002		

Média de três repetições±desvio padrão.

Os resultados das análises de firmeza do miolo (Tabela 5.7) indicaram que houve comportamento linear com redução gradual da maciez ao longo do período de armazenamento. O aumento da firmeza era esperado devido aos subprocessos relacionados ao envelhecimento: transferência de umidade do miolo para a crosta e firmeza intrínseca do material amiláceo, que está associado à recristalização do amido durante o armazenamento.

**Tabela 5.7 - Resultados das análises de firmeza do miolo dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa, expressos em N**

Amostra	Dia 1	Dia 4	p-valor	R <sup>2</sup>
DS	2,17±0,11	4,86±0,53	<0,001	0,840
DC	2,84±0,39	5,38±0,68	<0,001	0,870
D1	6,65±0,57	16,72±1,11	<0,001	0,829
D2	8,96±0,54	19,19±1,85	<0,001	0,931
D3	10,67±0,72	27,91±2,81	<0,001	0,921
D4	11,41±0,36	19,26±1,95	<0,001	0,907
D5	7,00±0,39	12,90±0,70	<0,001	0,910
p-valor	<0,001	<0,001		
R <sup>2</sup>	0,575	0,336		

Média de seis repetições±desvio padrão.

Entre os tratamentos, houve aumento da firmeza do miolo até atingir a concentração de OEs de 0,85  $\mu\text{L/g}$  massa com posterior decréscimo para as concentrações mais altas. Este comportamento pode estar relacionado com algum tipo de interação dos OEs com os constituintes da formulação, sendo que altas concentrações podem amenizar a transferência interna de umidade e a retrogradação do amido. Além disso, alguns componentes apolares presentes nos OEs podem atuar como amaciadores de miolo e retentores de umidade pelas interações hidrofóbicas, diminuindo a velocidade de migração da água e o efeito de sinérese.

Semelhante aos resultados obtidos para firmeza, a dureza do miolo das amostras (Tabela 5.8) aumentou com o passar do tempo. Quanto à diferença estatística observada entre os tratamentos, apesar de não serem explicadas pelos modelos matemáticos ( $R^2 < 0,80$ ), deve-se ressaltar que após 4 e 7 dias houve aumento da dureza até a concentração de OEs de 0,85  $\mu\text{L/g}$  massa e redução dos valores para 1,13 e 1,42  $\mu\text{L/g}$  massa.

**Tabela 5.8 - Resultados das análises de dureza do miolo dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à massa**

Amostra	Dia 1	Dia 4	p-valor	R <sup>2</sup>
DS	3,11±0,15	6,79±0,71	<0,001	0,81
DC	3,94±0,40	7,30±0,75	<0,001	0,886
D1	9,74±0,72	20,22±1,00	<0,001	0,832
D2	12,72±0,73	23,69±1,85	<0,001	0,931
D3	14,97±1,01	33,43±1,94	<0,001	0,85
D4	15,09±0,24	22,82±2,16	<0,001	0,897
D5	10,18±0,72	15,79±1,12	<0,001	0,855
p-valor	<0,001	<0,001		
R <sup>2</sup>	0,585	0,325		

Média de seis repetições±desvio padrão.

### 5.3.3 Aplicação na superfície

Visualmente, os pães contendo 3,0  $\mu\text{L}$  OE/g massa (Amostra S12) apresentaram colônias fúngicas apenas após 22 dias, enquanto a amostra padrão (SS) demonstrou contaminação após 6 dias de armazenamento. Corroborando com as análises visuais, a contagem microbiana (Tabela 5.9) indicou resultados satisfatórios em relação à inibição do crescimento de fungos com a adição dos OEs sobre a superfície dos pães de forma integrais.

Tomando como base a Portaria 451 (BRASIL, 1997), observa-se pela Tabela 5. 9 que, microbiologicamente, os pães sem adição de conservante (Amostra SS) estaria apto para consumo até o décimo dia. As amostras S3, S6 e S9 apresentaram-se viáveis até o décimo sexto dia de consumo, enquanto a amostras contendo conservante comercial (SC) e a maior concentração de OEs (S12) apresentaram contagem abaixo do limite até o vigésimo segundo dia de armazenamento. Em geral, os pães de forma integrais comerciais apresentam vida de prateleira de 14 a 21 dias. Desta forma, para a conservação por 2 semanas, a concentração de OEs encontrado na amostra 3 seria o suficiente ( $0,75 \mu\text{L OE/g}$  de massa). No entanto, para prolongar a vida útil do produto, a concentração máxima utilizada neste estudo ( $3,00 \mu\text{L OE/g}$  de massa) será recomendada.

Estatisticamente, não há diferença entre as amostras S3 e S6 após 10 e 13 dias de armazenamento (Tabela 5.14) mas ambas diferem da amostra SS que apresenta maior contagem de bolores. No décimo sexto dia, ocorre comportamento semelhante com as amostras SC, S3, S6 e S9 não diferindo entre si. Após 19 e 22 dias de armazenamento, observa-se que para as amostras com maiores concentrações de OEs (S9 e S12) e com conservante comercial (SC) não houve diferença estatística, entretanto considerando o limite citado, a amostra S9 encontrava-se imprópria para consumo.

**Tabela 5. 9 - UFC/g dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	Tempo (dias)							
	1	4	7	10	13	16	19	22
SS	nd	nd	$1,60 \pm 0,29 \times 10^2$	$4,66 \pm 0,47 \times 10^2$ <sup>a</sup>	$7,27 \pm 1,87 \times 10^3$ <sup>a</sup>	$1,60 \pm 0,29 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$6,00 \pm 2,16 \times 10^4$ <sup>a</sup>	$3,00 \pm 0,22 \times 10^5$ <sup>a</sup>
SC	nd	nd	nd	nd	nd	$7,67 \pm 2,05 \times 10^1$ <sup>b</sup>	$8,33 \pm 1,24 \times 10^2$ <sup>c</sup>	$3,67 \pm 0,20 \times 10^3$ <sup>c</sup>
S3	nd	nd	nd	$3,33 \pm 0,05 \times 10^1$ <sup>b</sup>	$2,60 \pm 0,21 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$4,03 \pm 0,45 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$4,03 \pm 0,45 \times 10^4$ <sup>ab</sup>	$1,30 \pm 0,22 \times 10^5$ <sup>b</sup>
S6	nd	nd	nd	$5,67 \pm 0,94 \times 10^1$ <sup>b</sup>	$1,96 \pm 0,20 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$2,30 \pm 0,21 \times 10^3$ <sup>b</sup>	$2,30 \pm 0,22 \times 10^4$ <sup>bc</sup>	$9,00 \pm 0,82 \times 10^4$ <sup>b</sup>
S9	nd	nd	nd	nd	nd	$1,30 \pm 0,43 \times 10^2$ <sup>b</sup>	$6,07 \pm 0,25 \times 10^3$ <sup>c</sup>	$3,37 \pm 0,86 \times 10^4$ <sup>c</sup>
S12	nd	nd	nd	nd	nd	nd	$2,67 \pm 0,47 \times 10^2$ <sup>c</sup>	$3,00 \pm 0,82 \times 10^3$ <sup>c</sup>

Média de três repetições  $\pm$  desvio padrão; nd - não detectado ou valor abaixo do limite de detecção (10 UFC/g).

A Figura 5.2 apresenta o aspecto dos pães no vigésimo segundo dia de armazenamento. No caso das amostras controle (SS) e com a menor concentração de OEs (S3), observa-se deterioração avançada, enquanto nas demais há o surgimento de colônias menores. De acordo com Junior e colaboradores (2008), contaminações por bolores não representam risco para a saúde humana, principalmente, porque o consumidor dificilmente ingerirá um produto contaminado já que estes fungos geralmente estão visíveis a olho nu, além de deixar cheiro e sabor característicos no alimento. Sendo assim, apesar da contagem estar abaixo de  $5 \times 10^3$  UFC  $\times$  g<sup>-1</sup>, em alguns casos (Amostras SC e S12), visualmente os pães já não se encontravam aptos para o consumo.

Vale ressaltar que os pães comerciais costumam apresentar durabilidade média de 21 dias, utilizando-se aplicação de conservantes tanto na massa, quanto na superfície. Sendo assim, o resultado desta forma de aplicação apresenta-se como uma maneira eficiente para aumentar a vida útil do produto.

**Figura 5.2 - Pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície após 22 dias de armazenamento**

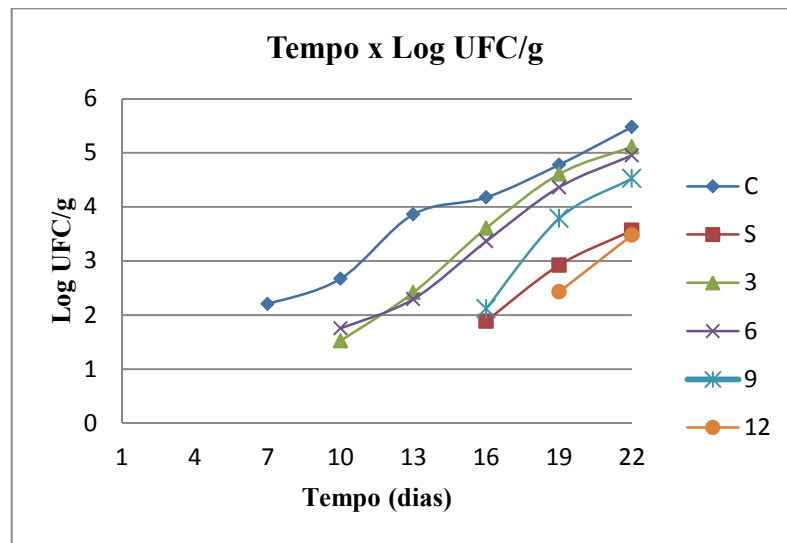


Fonte: Acervo pessoal.

Conforme se observa na Figura 5.3, o número de unidades formadoras de colônia reduziu proporcionalmente em relação ao aumento da concentração de OEs.



**Figura 5.3 - Log de unidades formadoras de colônia ao longo dos dias de armazenamento**



Fonte: Elaboração própria.

O pH da massa antes e após a fermentação foi de  $5,83 \pm 0,02$  e  $5,61 \pm 0,02$ , respectivamente, e apresentaram valores coerentes considerando o aumento da concentração de ácidos na fermentação. O volume específico foi de  $4,08 \pm 0,05$  cm<sup>3</sup>/g, resultados similares aos valores médios geralmente encontrados para pães integrais (Santos et al., 2018). O pH e a acidez titulável total do miolo dos pães (Tabela 5.10) apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), os baixos valores de  $R^2$  (0,560 e 0,525, respectivamente) sugerem que o comportamento linear das variáveis não é totalmente justificado pelos modelos matemáticos. Considerando que a formulação das massas foi idêntica, variações de pH e acidez titulável total do miolo não eram esperadas.

**Tabela 5.10 - Resultados das análises de pH e acidez titulável total do miolo e da crosta dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	pH		ATT (% em ácido láctico)	
	Miolo	Crosta	Miolo	Crosta
SS	5,63±0,04	5,54±0,03	3,45±0,07	3,01±0,07
SC	5,64±0,01	5,38±0,01	4,66±0,05	3,37±0,01
S3	5,66±0,01	5,57±0,07	3,93±0,05	3,11±0,07
S6	5,58±0,02	5,43±0,01	4,92±0,13	3,54±0,04
S9	5,53±0,01	5,38±0,03	4,40±0,14	3,84±0,04
S12	5,55±0,01	5,49±0,01	4,32±0,02	3,54±0,04
p-valor	<0,001	<0,001	0,384	0,119
R <sup>2</sup>	0,560	0,525	0,047	0,145

Média de três repetições±desvio padrão

Os resultados das análises de atividade de água e cor instrumental do miolo dos pães (Tabela 5.11) indicaram que não houve diferença significativa entre os tratamentos para nenhum dos parâmetros avaliados. Este resultado era esperado, uma vez que não houve variação na formulação dos pães, mas apenas no conservante aspergido após o forneamento. Os pães integrais apresentaram altos valores de atividade de água (>0,90) e cor instrumental com tonalidade característica de pães integrais.

**Tabela 5.11 - Resultados das análises de atividade de água e cor instrumental dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	Atividade de água	L*	a*	b*
SS	0,9626±0,0009	71,00±0,65	4,12±0,09	16,62±0,17
SC	0,9607±0,0026	71,73±0,69	4,07±0,12	16,57±0,09
S3	0,9629±0,0026	71,75±0,86	4,11±0,14	16,44±0,25
S6	0,9604±0,0136	70,11±0,71	4,12±0,08	16,62±0,10
S9	0,9669±0,0084	71,91±0,90	4,07±0,13	16,57±0,20
S12	0,9651±0,0042	71,54±0,46	4,11±0,08	16,44±0,15
p-valor	0,515	0,745	0,657	0,381
R <sup>2</sup>	0,027	0,007	0,012	0,048

Média de três repetições±desvio padrão.

O conteúdo médio de umidade dos pães em todos os dias de análises foi maior para amostras com adição de 3,00 µL OE/g de massa (Tabela 5. 12). No entanto, apenas as

amostras SC e S3 apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) ao longo do tempo. No processo de envelhecimento de pães ocorre a retrogradação do amido, alterações na rede de glúten e redistribuição da água, geralmente com redução no teor de umidade (Cauvain & Young, 2009). O tratamento com aspersão do conservante comercial (amostra SC) resultou em pães que mantiveram umidade mais elevada com o passar do tempo. Entretanto, com a aspersão de OEs na menor concentração ( $0,75 \mu\text{L OE/g}$  de massa) houve decréscimo do conteúdo de umidade.

Entre as amostras, houve diferença significativa após 4 e 16 dias de armazenamento. Em ambos os casos, verificou-se que o aumento da concentração de OEs resultou em pães com maior teor de umidade. Estes resultados levam a inferir que a adição deste biopreservador pode influenciar positivamente na retenção de umidade, favorecendo um produto com melhores características sensoriais ao longo da vida de prateleira. Um dos fatores que pode ter resultado neste comportamento provavelmente está relacionado com a característica lipofílica dos OEs. Desta forma, a camada superficial oriunda da aspersão diminuiu a velocidade de evaporação da água (sinérese).

No entanto, é importante ressaltar que os valores do desvio padrão relacionados à variação da repetição das análises são relativamente baixos, favorecendo a diferença estatística entre as amostras, considerando o mesmo tempo de armazenamento. Ao verificar o comportamento ao longo da vida de prateleira, verificou-se um coeficiente de regressão baixo o que indica que os valores dos resultados experimentais não podem ser explicados pelos modelos matemáticos.

**Tabela 5. 12 - Resultados das análises de umidade dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	Tempo (Dias)								p-valor	R <sup>2</sup>
	1	4	7	10	13	16	19	22		
SS	33,99±0,07	31,37±0,26							0,152	0,091
SC	34,21±0,19	33,82±0,17	34,29±0,10	33,61±0,17	34,73±0,26	34,26±0,62	34,94±0,10	34,35±0,36	0,043	0,174
S3	35,34±0,16	35,17±0,11	33,17±0,17						0,004	0,324
S6	30,63±0,07	32,55±0,14	30,84±0,24	32,21±0,26					0,099	0,119
S9	33,19±0,13	33,53±0,09	31,95±0,08	33,36±0,11	31,62±0,12	36,34±0,03			0,697	0,007
S12	34,99±0,40	35,49±0,08	36,44±0,13	34,98±0,14	36,57±0,11	34,45±0,18	36,28±0,14	34,67±0,12	0,068	0,008
p-valor	0,824	0,035	0,149	0,181	0,194	0,006	0,027	0,156		
R <sup>2</sup>	0,003	0,249	0,126	0,109	0,103	0,387	0,267	0,121		

Média de três repetições±desvio padrão.

A firmeza do miolo das amostras (Tabela 5.13) aumentou gradativamente com o passar dos dias de armazenamento, apresentando diferença significativa para todas as amostras. Para todas as amostras houve aumento deste parâmetro ao longo do período de armazenamento. Entre as amostras, houve diferença significativa em todos os dias analisados, exceto no vigésimo segundo dia. Os pães apresentaram menor firmeza com o aumento da concentração de OEs.

Assim como para a firmeza, para a dureza (Tabela 5.14) entre as amostras houve diferença significativa em todos os dias analisados, exceto no vigésimo segundo dia. Os pães apresentaram menor dureza com o aumento da concentração de OEs, o que permite inferir que a adição dos mesmos pôde aumentar a vida de prateleira da maciez.

**Tabela 5. 13 - Resultados de firmeza dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	Tempo (Dias)								p-valor	R <sup>2</sup>	
	1	4	7	10	13	16	19	22			
SS	3,16±0,48	10,15±0,32								<0,001	0,771
SC	3,26±0,21	6,72±0,43	9,59±0,77	10,59±0,71	10,79±0,49	14,83±1,53	13,98±1,70	15,48±0,82		<0,001	0,804
S3	3,35±0,19	7,37±0,44	14,32±1,02							<0,001	0,584
S6	3,48±0,44	7,93±0,27	13,93±0,72	10,79±0,89						<0,001	0,774
S9	2,37±0,31	6,04±0,51	12,34±1,09	8,35±0,33	12,93±0,39	9,60±0,91				<0,001	0,685
S12	2,60±0,24	5,39±0,29	7,57±0,33	7,93±0,54	8,42±0,64	12,15±0,50	13,68±0,77	14,46±0,78		<0,001	0,906
p-valor	0,014	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,623			
R <sup>2</sup>	0,164	0,508	0,242	0,560	0,441	0,441	0,307	0,007			

Média de seis repetições±desvio padrão.

**Tabela 5. 14 - Resultados de dureza dos pães de forma integrais com aplicação de óleos essenciais de canela, cravo e louro à superfície**

Amostra	Tempo (Dias)								p-valor	R <sup>2</sup>	
	1	4	7	10	13	16	19	22			
SS	4,91±0,78	12,98±0,42								<0,001	0,862
SC	5,03±0,20	9,17±0,87	9,75±0,73	13,12±1,16	12,94±0,85	17,56±1,47	15,60±1,70	17,88±0,74		<0,001	0,849
S3	5,14±0,24	9,98±0,60	14,61±1,07							<0,001	0,710
S6	5,33±0,58	10,54±0,32	14,19±0,81	13,10±1,43						<0,001	0,813
S9	3,88±0,45	8,39±0,69	12,54±1,10	10,74±0,93	15,39±0,84	11,48±0,82				<0,001	0,702
S12	3,99±0,50	7,72±0,46	7,73±0,41	10,12±0,87	10,83±0,79	14,41±1,08	15,95±1,69	16,54±1,44		<0,001	0,913
	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,002	0,559			
	0,338	0,517	0,265	0,579	0,387	0,454	0,243	0,010			

Média de seis repetições±desvio padrão.

Rehman e colaboradores (2007) encontraram resultados semelhantes, com melhor efeito inibitório do OE de casca de laranja em tratamentos com pulverização em todas as fatias dos pães, em comparação com adição à massa, na superfície do pão inteiro e no interior da embalagem. Sensorialmente, as notas obtidas para este tratamento quanto ao volume específico, simetria, características da crosta, cor do miolo e da crosta, gosto, textura e aroma também foram significativamente superiores às demais amostras.

Sendo assim, os resultados do presente estudo mostraram que a adição da mistura otimizada de OEs na superfície dos pães retardou o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes e manteve propriedades tecnológicas adequadas. Contudo, acredita-se que esta técnica se consolide como a melhor forma de aplicação deste tipo de biopreservador, garantindo maior alcance de área superficial e menor impacto nas características tecnológicas e sensoriais de pães de forma integrais.

#### **5.4 Conclusões**

Considerando a importância de atributos relacionados à conservação e maciez do miolo de pães de forma integrais, os resultados deste estudo podem ser considerados satisfatórios. Apesar de a aplicação da mistura de OEs à massa não apresentar efeito conservante estendido nos pães integrais, a adição de 3  $\mu\text{L}$  OE /g de massa, através de aspersão na superfície, resultou em pães com maiores teores de umidade ao longo da vida de prateleira e menores valores de firmeza e dureza. Além disso, as análises microbiológicas indicaram o retardo do desenvolvimento de fungos com melhores resultados nesta concentração.

No entanto, é importante ponderar que a aplicação dos OEs em pães com diferentes formatos pode necessitar de diferentes concentrações. A área superficial de contato é determinante para a eficiência deste biopreservador, pois é na face externa que os bolores se desenvolvem em maior velocidade e são percebidos visualmente pelos consumidores.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e ao Instituto de Ciência e Tecnologia pelo suporte institucional. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e concessão da

bolsa de estudos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro, código de financiamento 001. Por fim, agradecemos à Kemin® pela doação dos conservantes comerciais.

## 5.5 Referências

- AACCI (American Association of Cereal Chemists International). (2010). *Approved Methods of Analysis*. 11.ed. St. Paul.
- Abellana, M., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2001). Effect of water activity and temperature on growth of three *Penicillium* species and *Aspergillus flavus* on a sponge cake analogue. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 151-157.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (1997). Portaria 451, de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico: Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: Diário Oficial da União.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. (2001). Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”. Brasília: Diário Oficial da União.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.
- Cauvain, S.P., & Young, L. S. (2009). *Technology of breadmaking*. 2. Ed. ISBN 978-85-2042706-4.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., & Fennema, O.R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed.
- Debonne, E., Bockstaele, F. V., Samapundoc, S., Eeckhout, M., Devlieghere, F. (2018a). The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. *Journal of essential oil research*. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1486239>.
- Debonne, E., Bockstaele, F.V., Leyn, I., Devlieghere, F., Eeckhout, M. (2018b). Validation of in-vitro antifungal activity of thyme essential oil on *Aspergillus niger* and *Penicillium paneum* through application in par-baked wheat and sourdough bread. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 368-378.



- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R.L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, 12.
- ISI – International Starch Institute. *Determination of Reducing Power and DE by Lane and Eynon's method*. (1999). Disponível em: <http://www.starch.dk/isi/methods/27DE.htm>. Acesso em: 02 jun 2019.
- Junior, M. S. S., Bassinello, P. Z., Betânia, D., Lacerda, C. L., Koakuzu, S. N., Gebin, P. F. C. (2008). Características físicas e tecnológicas de pães elaborados com farelo de arroz torrado. *Ciências Agrárias*, 29(4), 815-828.
- Matan, N., Rimkeeree, H., Mawson, A. J., Chompreeda, P., Haruthaithanasan, V., Parker, M. (2006). Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 180–185.
- Preedy, V. R. (2016). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. London, Academic Press.
- Ray, L., & Bullerman, L.B. (2001). Preventing growth of potentially toxic molds using antifungal agents. *Journal of Food Protection*, 45, 953-963.
- Rehman, S., Hussain, S., Nawaz, H., Ahmad, M, M., Murtaza, M, A., Rizvi, A, J. (2007). Inhibitory Effect of Citrus Peel Essential Oils on the Microbial Growth of Bread. *Pakistan Journal of Nutrition*, 6, 558-561.
- Santos, C.M., Rocha, D. A., Madeira, R. A. V., Queiroz, E. R., Mendonça, M.M., Pereira, J., Abreu, C. M. P. (2018). Preparação, caracterização e análise sensorial de pão integral enriquecido com farinha de subprodutos do mamão. *Brazilian Journal of Food Technology*, 21, e2017120. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.12017>.
- Santos, J. L. P.(2015). Modelagem preditiva da deterioração de pães integrais multigrãos por fungos filamentosos. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas: Campinas.
- Saranraj, P., & Geetha, M. (2012). Microbial Spoilage of Bakery Products and Its Control by Preservatives. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 3(1), 38-48.
- Schmiele, M., Jaekel, L. Z., Patricio, S. M. C., Steel, C. J., Chang, Y. K. (2012). Rheological properties of wheat flour and quality characteristics of pan bread as modified by partial additions of wheat bran or whole grain wheat flour. *International Journal of Food Science and Technology*, 47 (10), 2141-2150.

Simões, C.M.O., & Spitzer, V. (2000). Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS, Cap.18.

## 6 ARTIGO CIENTÍFICO IV: EMBALAGEM ATIVA BIODEGRADÁVEL DE AMIDO DE MANDIOCA E GELATINA ADICIONADA DE ÓLEOS ESSENCIAIS COM PROPRIEDADES ANTIFÚNGICAS EM BOLORES ISOLADOS DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS

Mariana Pereira Silveira, Franciele Maria Pelissari, Marcio Schmiele

### RESUMO

Filmes biodegradáveis são materiais finos e flexíveis, preparados a partir de macromoléculas biológicas, que agem como barreira a elementos externos, protegendo os produtos e aumentando sua vida-de-prateleira. As embalagens ativas antimicrobianas são exemplos de filmes adicionados de componentes capazes de interagir com o alimento promovendo sua conservação. Em produtos de panificação, a limitação da vida útil ocorre principalmente devido à deterioração por fungos. Este problema pode ser minimizado com a utilização de aditivos químicos, entretanto a tendência do mercado consumidor de alimentos é a substituição destes por substâncias naturais, tais como extratos vegetais e óleos essenciais (OEs) com propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Considerando a importância das propriedades físicas das embalagens e do crescente uso de filmes ativos em alimentos, no presente estudo foram elaborados delineamentos experimentais (planejamento de misturas simplex centroide e delineamento composto central rotacional) para obtenção de um filme otimizado de amido de mandioca e gelatina, adicionado de OEs de canela (*Cinamomum cassia*) e cravo (*Eugenia caryophyllus*). As melhores propriedades físicas foram obtidas para um filme otimizado contendo 65,8% de amido de mandioca e 34,2% de gelatina. Os resultados mostraram ainda que o filme contendo 0,97% de OE de canela e 0,01% de OE de cravo apresentou maior inibição no desenvolvimento de bolores, mantendo-se viáveis as propriedades físicas e mecânicas dos filmes.

**Palavras-chave:** Biopolímeros. Delineamento experimental. Atividade antimicrobiana.

Canela. Cravo.

## ABSTRACT

Biofilms are thin, flexible materials, made from biological macromolecules that act as a barrier to external elements, protecting products and increasing shelf-life. The active antimicrobial packages are examples of biofilms added of components capable of interacting with the food promoting their conservation. In bakery products, the shelf life limitation mainly occurs due to fungal spoilage. This problem can be minimized with the use of chemical additives, however the tendency of the food consumer market is the replacement of these by natural substances such as plant extracts and essential oils (OEs) with antimicrobial and antioxidant properties. Considering the importance of the physical properties of the packages and the increasing use of active films in foods, in the present study experimental designs were elaborated (mixing planning and rotational central composite design) to obtain an optimized film of cassava starch and gelatin, cinnamon EOs (*Cinamomum cassia*) and clove (*Eugenia caryophyllus*). The best physical properties were obtained for an optimized film containing 65.8% cassava starch and 34.2% gelatin. The results also showed that the film containing 0.97% OE of cinnamon, 0.01% of OE of clove presented greater inhibition in the development of molds, keeping the physical and mechanical properties of the films viable.

**Key-words:** Starch. Gelatine. DCCR. Cinnamon. Clove.

## 6.1 Introdução

O uso de polímeros sintéticos como material de embalagem se deve principalmente ao seu baixo custo, fácil processamento, elevada aplicabilidade e durabilidade. No entanto, o crescente acúmulo de lixo não biodegradável, aliado à dificuldade de reciclagem, tem levado a comunidade científica mundial a desenvolver métodos para redução do impacto ambiental, como o desenvolvimento de novos materiais biodegradáveis (De Bona, 2007).

Dentre as matérias-primas utilizadas para a produção de filmes e revestimentos, o amido tem se destacado por ser o mais abundante, de menor custo e por apresentar possibilidades de modificação química, física, enzimática ou genética, dando origem a filmes resistentes e biodegradáveis (Araújo, 2014). Além disso, os filmes à base deste polímero apresentam boas propriedades mecânicas e de barreira ao oxigênio. Contudo, alta fragilidade mecânica e elevada solubilidade em água são as principais desvantagens do mesmo para aplicação em embalagens de alimentos. Para melhorar as características deste material, têm-se utilizado filmes à base de amidos modificados, além de misturas com proteínas e/ou outros biopolímeros compatíveis (Pelissari et al., 2013; Pelissari et al., 2019).

As propriedades químicas, físicas e funcionais da amilose são fundamentais para definir a aplicação do amido na produção de filmes (Schmiele, Sampaio & Clerici, 2019). Devido a sua linearidade, as moléculas de amilose em solução tendem a se orientar paralelamente, aproximando-se o suficiente para que se formem ligações de hidrogênio entre as hidroxilas de polímeros adjacentes. Desta forma, a afinidade do polímero por água é reduzida, favorecendo a formação de pastas opacas e filmes resistentes (Chiu & Solarek, 2009; Wurzburg, 2006).

A hidroxipropilação é um tipo de eterificação do amido com óxido de propileno na presença de catalisador alcalino, o que reduz a temperatura e entalpia de gelatinização, aumenta a clareza da pasta, a estabilidade de congelamento e descongelamento e solubilidade em água fria. Por outro lado, o intercrossamento é um tipo de modificação química que altera a viscosidade, o poder de inchamento, além de outras propriedades físicas e características de transição térmica do amido (Shen, 2019). De acordo com Shaik (2018), a incorporação de amidos modificados tais como hidroxipropilados pode melhorar a transparência, a solubilidade em água e a flexibilidade dos filmes. Sendo assim, a utilização de amido

hidroxipropilado inter cruzado pode ser considerada como uma alternativa para melhorar as propriedades do amido nativo para aplicação em filmes biodegradáveis.

A gelatina é uma proteína de origem animal obtida do colágeno por hidrólise ácida ou básica, formando uma rede de hélice tripla com zonas de junções microcristalinas intermoleculares (Rivero, Garcia & Pinnoti, 2010). Tem sido amplamente utilizada como estabilizante, espessante, emulsificante, como agente encapsulante de substâncias bioativas e para formação de filmes biodegradáveis, sendo uma boa matriz para diminuição da permeabilidade à gases (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) e à água, quando adicionados de substâncias hidrofóbicas (Tongnuanchan et al., 2015). Ademais, no Brasil a gelatina é produzida em abundância e com baixo custo, o que viabiliza sua utilização para produção de filmes e revestimentos (Fakhouri, 2017).

O uso de embalagens biodegradáveis incorporando OEs é uma técnica promissora para preservar a qualidade dos alimentos e aumentar a vida-de-prateleira. A aplicação de filmes, revestimentos e/ou embalagens de atmosfera modificada contendo OEs para o controle de fungos estão relacionadas principalmente aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, comumente presentes em produtos de panificação (Long et al., 2016). O uso de ácidos orgânicos fracos, como o propiônico, o benzóico e o sórbico em produtos panificados tem sido explorado constantemente. É comum a prática de adição de propionato de cálcio à massa e/ou sorbato de potássio aplicado através de aspersão na superfície do produto, utilizando álcool de cereais como veículo. Contudo, a utilização de embalagens ativas têm sido uma alternativa eficiente para extensão do prazo de validade (Cauvain & Young, 2009).

Diante da crescente demanda dos consumidores por produtos sem conservantes, livres de micro-organismos e toxinas, mantendo-se a qualidade nutricional e sensorial, o desafio para a indústria de alimentos é atender tais exigências com mínima mudança na qualidade dos alimentos e máxima segurança, sem o uso de aditivos químicos (Gutiérrez, 2009). Neste sentido, a aplicação de OEs desponta como uma tecnologia promissora, sendo estes compostos resultantes do metabolismo secundário de plantas que apresentam atividade antimicrobiana e antioxidante. Devido a sua natureza volátil, os OEs podem ser usados em concentrações que são seguras para consumo (GRAS – Generally Recognized as Safe). Além disso, são facilmente decompostos e não são fitotóxicos, favorecendo sua aplicação como conservantes em alimentos (Sivakumar, 2014).

A incorporação de OEs pode afetar a continuidade da matriz polimérica, proporcionando mudanças nas interações específicas dos componentes polímero-OE. Além

disso, propriedades antioxidantes e/ou antimicrobianas dos OEs podem ser fornecidas à embalagem, sendo que a composição química e as interações com o polímero são determinantes para a sua eficácia como ingrediente ativo (Atares & Chiralt, 2016).

O OE de cravo é constituído majoritariamente pelo eugenol, substância responsável pela atividade antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e antioxidante (Oliveira et al., 2009). O cinamaldeído (aldeído cinâmico ou 3-fenil-2-propenal), importante constituinte do OE de canela, é um álcool terpênico cíclico que age como principal componente ativo, conferindo atividade antimicrobiana e antioxidante. O linalol, também encontrado na canela, é um monoterpeneo que apresenta efeito anti-inflamatório, analgésico e antimicrobiano. Outra especiaria conhecida pela atividade antisséptica e antifúngica é o louro, cujo principal componente é o 1,8-cineol (Santoyo et al., 2006).

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi elaborar uma formulação otimizada de filmes biodegradáveis de amido de mandioca, gelatina e amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado adicionados de OEs de canela, cravo e louro, visando a ação antimicrobiana em bolores isolados de pães de forma integrais.

## **6.2 Material e métodos**

Os materiais utilizados foram amido de mandioca nativo, gelatina, amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado, glicerol, óleos essenciais comerciais de cravo, canela e louro e surfactante polisorbato 80. Todos os materiais utilizados neste projeto são comerciais e foram adquiridos no mercado nacional. O planejamento experimental consistiu na definição de um filme otimizado de três materiais poliméricos distintos (amido de mandioca, gelatina e amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado), baseando-se em suas propriedades físicas, através de um planejamento de misturas simplex centroide. Em seguida, foi avaliada a atividade antifúngica deste filme adicionado de OEs de canela, cravo e louro em diferentes proporções, definindo-se a concentração ótima através de um delineamento composto central rotacional (DCCR).

### ***6.2.1 Planejamento de misturas para os biopolímeros utilizados na elaboração dos filmes***

Para definição da proporção otimizada de materiais poliméricos os ensaios foram elaborados e avaliados através de um planejamento de misturas simplex centroide de três

variáveis independentes (Tabela 6.1), onde:  $X_1$  – amido de mandioca nativo,  $X_2$  – gelatina e  $X_3$  – amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado.

**Tabela 6.1 - Níveis das variáveis independentes dos biopolímeros utilizados na formulação dos filmes para o planejamento de misturas simplex centroide**

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais (%)		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	1,000	0,000	0,000	2,000	0,000	0,000
2	0,000	1,000	0,000	0,000	2,000	0,000
3	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	2,000
4	0,500	0,500	0,000	1,000	1,000	0,000
5	0,500	0,000	0,500	1,000	0,000	1,000
6	0,000	0,500	0,500	0,000	1,000	1,000
7	0,667	0,167	0,167	1,334	0,334	0,334
8	0,167	0,667	0,167	0,334	1,334	0,334
9	0,167	0,167	0,667	0,334	0,334	1,334
10	0,333	0,333	0,333	0,666	0,666	0,666
11	0,333	0,333	0,333	0,666	0,666	0,666
12	0,333	0,333	0,333	0,666	0,666	0,666

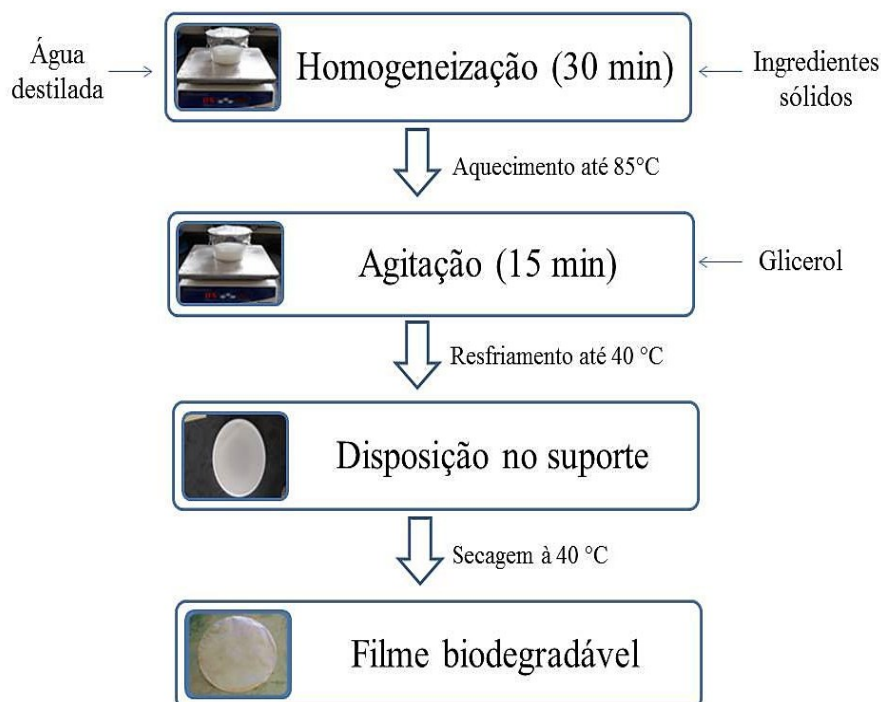
$X_1$ -amido de mandioca;  $X_2$ -gelatina e  $X_3$ -amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado.

### 6.2.2 Produção dos filmes

Os filmes foram produzidos pelo método de *casting* (Figura 6.1), processo que consiste em secar uma suspensão formadora de filme aplicada sobre um suporte. O procedimento envolveu a homogeneização de uma solução aquosa dos ingredientes sólidos sob agitação por 30 minutos, seguido de aquecimento até a temperatura de 85 °C sob agitação (Tecnal, TE-0854, Piracicaba, Brasil). Em seguida, foi adicionado o glicerol (22,5 g de glicerol/100 g de sólidos) e a solução foi mantida sob agitação a esta temperatura durante 15 minutos. Após o resfriamento da solução até 40 °C foram vertidos 8,59 g sobre placas de polietileno de alta densidade (7,4 cm de diâmetro), de modo a obter uma gramatura média de 0,2 g/cm<sup>2</sup>. Os filmes foram secos em estufa sob temperatura controlada (40 °C) (Tecnal, TE 394/2MP, Piracicaba, Brasil), durante aproximadamente 20 horas.



**Figura 6. 1 - Diagrama esquemático da produção dos filmes**



Fonte: elaboração própria.

### 6.2.3 Caracterização dos filmes

#### 6.2.3.1 Solubilidade em água

A solubilidade em água foi determinada, em quadruplicata, de acordo com metodologia descrita por Pelissari et al. (2013), na qual três discos (2,1 cm de diâmetro) de cada amostra de massa seca inicial conhecida foram imersos em 50 mL de água destilada a 25 °C por 24 horas, sob agitação esporádica. Em seguida, a matéria solúvel foi obtida por filtração em papel Whattman (n° 40) e seca em estufa a 105 °C por 24 horas (Tecnal, TE 394/1MP, Piracicaba, Brasil) para a obtenção da fração mássica. A solubilidade em água foi calculada através da Equação 6.1:

$$S (\%) = \frac{(m_i - m_f)}{m_i} * 100 \quad (6.1)$$

Onde  $S (\%)$  é a porcentagem de material solubilizado,  $m_i$  corresponde à massa seca inicial da amostra (g) e  $m_f$  à massa seca final da amostra (g).

### 6.2.3.2 Densidade

Para determinar a densidade, as amostras foram cortadas em quadrados (20 x 20 mm) e a espessura medida com o auxílio de um micrômetro digital (Mitutoyo, Mdc-lite 293-821-30, São Paulo, Brasil) com uma precisão de  $\pm 0,0001$  mm. Em seguida, as amostras foram secas a 105 °C por 24 h (Tecnal, TE 394/1MP, Piracicaba, Brasil) e a massa aferida em balança analítica. A densidade foi calculada como a razão entre a massa e o volume (espessura x área) do filme. A análise foi realizada em triplicata.

### 6.2.3.3 Teor de umidade

O teor de umidade dos filmes foi analisado gravimetricamente, em triplicata, de acordo com o método padrão D644-99 (ASTM, 2007), com o condicionamento em solução saturada de NaBr (UR=58%) por 48h e posterior secagem das amostras a 105° C por 24 h em estufa com circulação e renovação de ar (Tecnal, TE 394/1MP, Piracicaba, Brasil).

### 6.2.3.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas utilizando-se Texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.TXplus, Surrey, Inglaterra) de acordo com o método padrão D882-02 (ASTM, 2012), com seis repetições. As amostras foram cortadas em tiras de 10 mm de largura e 50 mm de comprimento. Antes da caracterização, os filmes foram condicionados em dessecador com solução saturada de NaBr (UR=58%) a 25 °C. Após 48 horas, as amostras foram acopladas nos pontos de fixação de tração para análise das propriedades mecânicas. A distância inicial e a velocidade do teste foram fixadas em 30 mm e 1,0 mm/s, respectivamente, utilizando-se o probe *Tensile Grips*. A tensão de ruptura e a elongação na ruptura foram obtidas diretamente da curva de tensão em função da elongação, e o módulo de Young foi calculado pela tangente na região linear da curva.

### 6.2.3.5 Cor instrumental

A cor instrumental foi avaliada em colorímetro espectrofotométrico (Konica Minolta, CM5, Chiyoda, Japão), através de metodologia D2244-09 (ASTM, 2011). Foi

utilizado o modo de transmitância total, onde um feixe de luz incide na superfície do filme através da amostra. O iluminante D65, o ângulo de 10° para o observador e o sistema de cor CIE Lab foram estabelecidos.

#### *6.2.3.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A superfície e a seção transversal dos filmes foram analisadas por MEV para avaliação da microestrutura. As amostras dos filmes secos (armazenados em sílica por 9 dias) foram fraturadas com o auxílio de pinças para obtenção de pequenos fragmentos. Estes foram fixados em um disco de alumínio através de fita dupla face. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, modelo TM3000, Chiyoda, Japão) operando a uma tensão de aceleração de 15 kV e corrente de feixe de 32,7 pA. As imagens da superfície e seção transversal foram feitas utilizando-se aumento de 5000x e 2000x, respectivamente.

#### ***6.2.4 Delineamento composto central rotacional para avaliação da atividade antifúngica do filme otimizado adicionado dos óleos essenciais***

Os ensaios para determinação da melhor proporção de OEs com atividade antifúngica adicionados à matriz polimérica dos filmes foram elaborados e avaliados através de um DCCR de três variáveis independentes (Tabela 6.2), onde:  $X_1$  – óleo essencial de canela;  $X_2$  – óleo essencial de cravo e  $X_3$  – óleo essencial de louro. As proporções de OEs foram definidas através de ensaios preliminares e variaram de 0 a 1,5 % em relação a solução filmogênica.

**Tabela 6.2 - Níveis das variáveis independentes para os óleos essenciais utilizados no Delineamento Composto Central Rotacional para avaliação da atividade antifúngica do filme otimizado**

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais (%)		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1,00	-1,00	-1,00	0,30	0,30	0,30
2	1,00	-1,00	-1,00	1,20	0,30	0,30
3	-1,00	1,00	-1,00	0,30	1,20	0,30
4	1,00	1,00	-1,00	1,20	1,20	0,30
5	-1,00	-1,00	1,00	0,30	0,30	1,20
6	1,00	-1,00	1,00	1,20	0,30	1,20
7	-1,00	1,00	1,00	0,30	1,20	1,20
8	1,00	1,00	1,00	1,20	1,20	1,20
9	-1,68	0,00	0,00	0,00	0,75	0,75
10	1,68	0,00	0,00	1,50	0,75	0,75
11	0,00	-1,68	0,00	0,75	0,00	0,75
12	0,00	1,68	0,00	0,75	1,50	0,75
13	0,00	0,00	-1,68	0,75	0,75	0,00
14	0,00	0,00	1,68	0,75	0,75	1,50
15	0,00	0,00	0,00	0,75	0,75	0,75
16	0,00	0,00	0,00	0,75	0,75	0,75
17	0,00	0,00	0,00	0,75	0,75	0,75

X<sub>1</sub>-Óleo essencial de canela; X<sub>2</sub>-Óleo essencial de cravo e X<sub>3</sub>-Óleo essencial de louro.

Os filmes foram produzidos pelo método de *casting*, conforme descrito no item 6.2.2. Entretanto, após o resfriamento da solução até 40 °C foram adicionados a mistura de OEs e o surfactante polissorbato 80 (10 g/100 g de OE). Em seguida, a solução foi mantida sob agitação a 40 °C por 15 minutos e foi então vertida nas placas para secagem.

### 6.2.5 Atividade antifúngica

O inóculo foi preparado coletando-se amostras da superfície de pães integrais com desenvolvimento fúngico visível, com posterior homogeneização em caldo nutritivo 1% e incubação à 25 ± 1 °C por 24 horas (Lucadema, 81/100, São José do Rio Preto, Brasil), conforme descrito por Silveira et al. (2018). A concentração do inóculo foi determinada pelo método padrão para contagem de bolores e leveduras, enquanto o método de disco-difusão foi utilizado para avaliar a capacidade de inibição fúngica dos filmes. Após a solidificação do meio de cultura (Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico 10 % até pH 3,5), foram adicionados 100 µL de inóculo, na concentração de 2,63x10<sup>6</sup> unidades formadoras de

colônias por grama de amostra (UFC/g). Em seguida, colocaram-se os discos dos filmes (2,3 cm de diâmetro) na porção central das placas, as quais foram incubadas a  $25 \pm 1$  °C por 8 dias. A leitura do diâmetro do halo de inibição foi feita diariamente, em triplicata para cada repetição, e os resultados expressos em centímetros (cm).

### **6.2.6 Análise estatística**

Os dados obtidos nos ensaios do planejamento experimental foram avaliados através de Metodologia de Superfície de Resposta para cálculo dos coeficientes de regressão e análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 10%. Para o planejamento de misturas simplex centroide, o coeficiente de regressão mínimo ( $R^2$ ) da ANOVA foi definido em 0,80, enquanto para o DCCR o  $R^2$  mínimo foi de 0,70. Os modelos matemáticos elaborados foram representados pelos níveis codificados para as variáveis independentes. O ponto otimizado foi determinado através de metodologia proposta por Derringer e Suich (1980). As características do ponto otimizado foram comparadas ao padrão (sem OE) através do Teste t-*Student* ( $p < 0,05$ ).

## **6.3 Resultados e discussão**

### **6.3.1 Planejamento de misturas para os biopolímeros utilizados na elaboração dos filmes**

Os resultados de caracterização física dos filmes estão dispostos na Tabela 6.3.

Tabela 6.3 - Resultados das análises físicas de caracterização dos filmes

Ensaio	Solubilidade (%)	Umidade (%)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	Módulo de Young (MPa)	Elongação na ruptura (%)	Tensão de ruptura (MPa)
1	12,29±0,75	12,07±0,79	0,6921±0,0198	42,00±4,15	106,29±7,02	0,24±0,02
2	34,03±0,30	9,99±0,39	0,6321±0,0221	24,70±1,01	60,03±11,57	1,59±0,21
3	21,64±1,54	8,77±0,55	0,6031±0,0511	33,00±3,14	167,00±11,93	0,31±0,01
4	29,35±0,05	13,33±0,63	0,8561±0,0698	118,73±1,20	17,04±1,48	1,52±0,13
5	21,82±1,93	8,22±0,19	0,6121±0,0698	1,93±0,36	124,76±16,61	0,32±0,03
6	29,44±0,84	11,07±0,73	0,5162±0,0315	14,63±1,13	90,56±2,87	1,25±0,05
7	24,41±2,84	12,54±0,24	0,7759±0,0574	49,30±1,07	40,68±1,18	0,71±0,02
8	25,20±0,09	9,12±0,26	0,7078±0,0499	27,90±5,27	72,04±13,15	1,37±0,28
9	23,13±1,63	9,52±0,86	0,3605±0,0158	0,97±0,09	113,97±19,30	0,36±0,06
10	28,08±3,97	13,30±0,54	0,6511±0,0415	23,66±4,27	82,37±7,22	1,44±0,12
11	27,15±0,98	9,57±0,26	0,5740±0,0527	26,16±5,54	87,75±2,82	1,25±0,16
12	26,22±2,13	9,04±0,97	0,5487±0,0418	21,16±3,00	98,27±13,13	1,22±0,02
Ensaio	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>C</i> *	<i>h</i> *	
1	96,98±0,03	0,03±<0,01	0,31±0,02	0,31±0,02	83,85±0,66	
2	96,76±0,07	-0,04±0,01	0,46±0,02	0,48±0,02	94,54±0,97	
3	96,92±0,02	0,00±0,01	0,24±0,02	0,24±0,02	87,63±0,18	
4	97,01±0,02	0,02±0,01	0,51±0,02	0,51±0,02	87,97±0,44	
5	96,98±0,02	0,02±0,01	0,25±0,01	0,25±0,01	85,87±0,85	
6	96,86±0,02	0,02±0,01	0,43±0,03	0,43±0,03	88,07±0,44	
7	97,09±0,08	0,04±0,01	0,37±0,02	0,37±0,02	84,37±1,38	
8	97,07±0,31	0,01±0,04	0,55±0,08	0,55±0,09	88,95±4,34	
9	96,78±0,17	0,06±0,04	0,41±0,06	0,42±0,06	86,47±1,46	
10	97,03±0,07	0,01±0,01	0,43±0,01	0,43±0,01	88,70±0,05	
11	97,29±0,03	0,01±0,02	0,42±0,03	0,42±0,03	88,63±2,84	
12	96,93±0,02	0,01±0,02	0,40±0,02	0,40±0,02	88,45±0,09	

Média ± desvio padrão, considerando três repetições para a solubilidade, umidade, densidade e cor instrumental e seis repetições para as propriedades mecânicas.

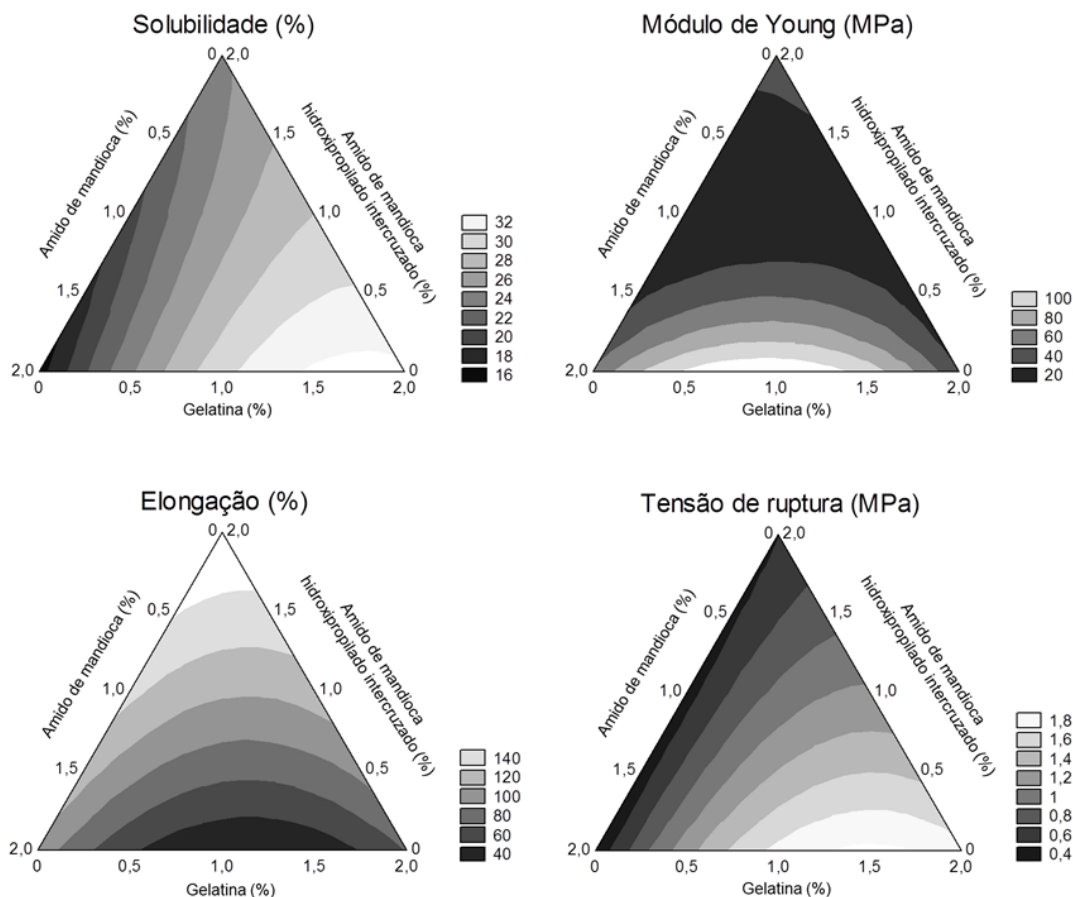
A solubilidade dos filmes variou entre 12,29 e 34,03%. Este parâmetro apresentou significância estatística, o que possibilitou a geração do modelo matemático (Tabela 6.4) e da curva de contorno (Figura 6.2). A gelatina teve maior influência neste parâmetro, conforme verificado pelo maior coeficiente de regressão ( $\beta_2=32,470$ ) considerando os pseudocomponentes, no entanto, a combinação binária entre o amido de mandioca nativo e a gelatina, resultou em menores solubilidades. Desta forma, a menor solubilidade dos filmes biodegradáveis pode ser obtida com os maiores teores de amido de mandioca nativo e gelatina, sem uso do amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado, pois os grupamentos hidroxipropil proporcionam impedimento estérico sobre as cadeias de amilose e amilopectina e apresentam características hidrofílicas, favorecendo as ligações de hidrogênio com a água (Masina et al., 2017).

**Tabela 6.4 - Modelos matemáticos das variáveis dependentes estatisticamente significativas ( $p < 0,10$ ) para o planejamento de misturas simplex centroide**

<b>Variável dependente</b>	<b>Modelo matemático</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-valor</b>	<b>F<sub>tab</sub></b>	<b>F<sub>cal</sub>/F<sub>tab</sub></b>
Solubilidade	$15,18x_1 + 32,47x_2 + 23,46x_3 - 22,00x_1x_2$	0,80	0,003	2,92	3,74
Módulo de Young	$44,01x_1 + 21,3x_2 + 32,11x_3 - 338,74x_1x_2 - 40,05x_1x_3 - 65,46x_2x_3 - 699,29x_1x_2x_3$	0,97	0,001	3,40	9,50
Elongação na ruptura	$92,88x_1 + 61,10x_2 + 157,56x_3 - 222,54x_1x_2$	0,85	0,001	2,92	5,33
Tensão de ruptura	$0,24x_1 + 1,68x_2 + 0,39x_3 - 2,80x_1x_2$	0,88	0,001	2,92	6,55
<i>b</i> *	$0,29x_1 + 0,47x_2 + 0,25x_3 - 0,51x_1x_2 + 0,39x_2x_3$	0,90	0,001	2,96	5,78
<i>C</i> *	$0,29x_1 + 0,49x_2 + 0,25x_3 - 0,48x_1x_2 + 0,36x_2x_3$	0,91	0,001	2,96	5,89
<i>h</i> *	$83,54x_1 + 93,89x_2 + 87,76x_3 - 8,71x_2x_3$	0,88	<0,001	2,92	7,10



**Figura 6.2 - Curvas de contorno para avaliação do efeito da variação dos teores de amido de mandioca, gelatina e amido hidroxipropilado inter cruzado sobre a solubilidade em água e propriedades mecânicas dos filmes**



Fonte: Acervo pessoal.

O teor de umidade e a densidade não foram influenciados pelas variáveis independentes dentro da faixa estudada ( $R^2 < 0,80$ ). A densidade provavelmente não apresentou diferença significativa devido às formulações conterem o mesmo teor de sólidos totais, além da quantidade de solução em cada filme ser equivalente. Isto implica em que todos os filmes apresentaram um comportamento semelhante na desidratação, não alterando estas características, pois os valores de umidade não apresentaram diferença entre os ensaios. Diferenças no conteúdo de água dos filmes poderia resultar em alterações nas demais características dos filmes, mas não seria possível inferir que estas alterações seriam oriundas das variáveis independentes.

Espera-se das embalagens, em geral, que as mesmas sejam resistentes à ruptura e à abrasão, para assim, proteger e reforçar a estrutura dos alimentos e, ainda, que sejam

flexíveis, para adaptar-se a possíveis deformações sem se romper (Sobral, 2000). O valor do módulo de Young corresponde à medida de elasticidade ou rigidez dos filmes e variou entre 0,97 e 118,73 MPa. Conforme observado pelos coeficientes de regressão (Tabela 6.4), houve maior influência dos amidos no aumento da rigidez. No entanto, as combinações binárias e ternárias apresentaram efeito negativo sobre esta resposta, principalmente pelo sinergismo entre as três variáveis independentes em estudo.

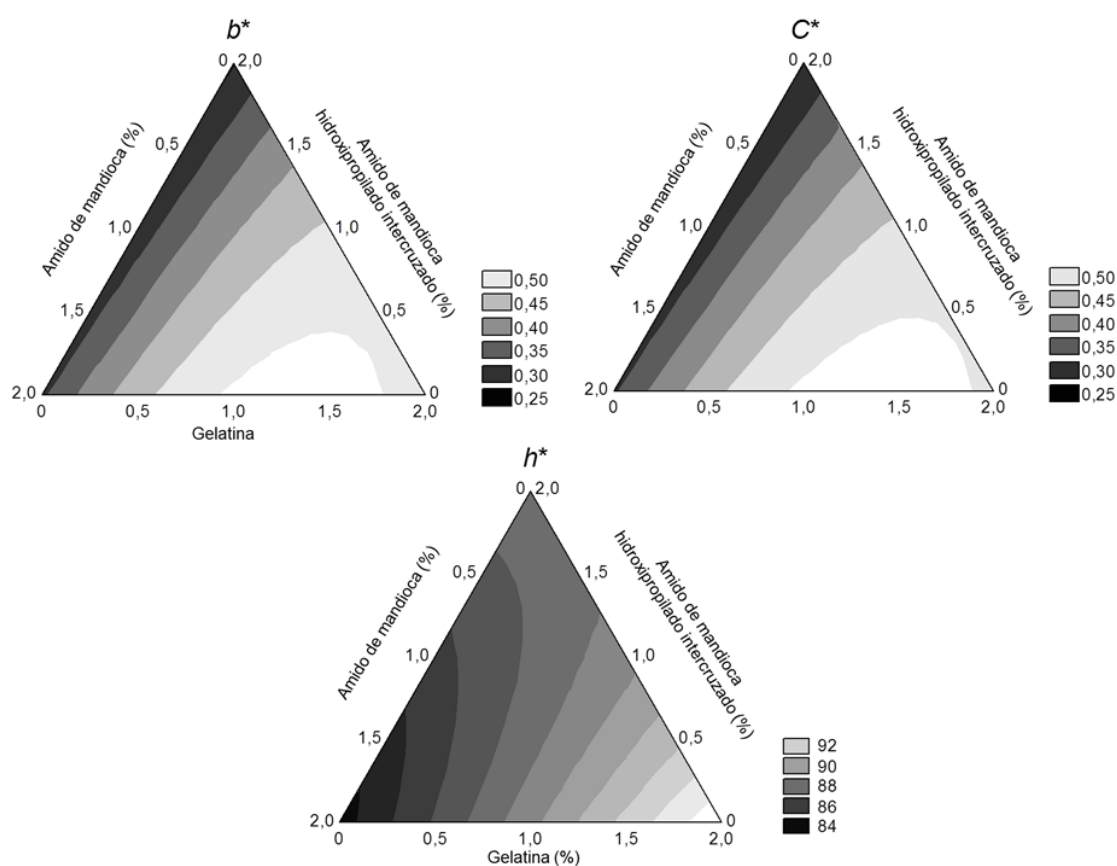
A alongação na ruptura corresponde à relação entre o alongamento e o comprimento inicial do filme, refletindo sua extensibilidade. Filmes de amido possuem flexibilidade limitada, pois a gelatinização dá origem a um material que apresenta fortes ligações polares o que os torna quebradiços (Lawton, 1996). Os filmes produzidos exibiram alongação na ruptura entre 17,04 e 167,00%. Houve maior influência dos amidos de mandioca nativo ( $\beta_1=92,88$ ) e hidroxipropilado inter cruzado ( $\beta_3=157,56$ ) sob esta propriedade, com maiores valores de alongação na ruptura (aumento na flexibilidade) na região do gráfico onde estão presentes em maior quantidade. Em geral, a alongação e a tensão de ruptura são inversamente proporcionais em filmes biodegradáveis. As alterações nas propriedades mecânicas dos filmes proporcionada pelo amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado é função do inter cruzamento dos grupamentos hidroxilas das cadeias de amilose e amilopectina, resultando em ligações covalentes no interior dos grânulos de amido, favorecidas pela ligação covalente formada pelos reagentes químicos de inter cruzamento (Jaekel et al., 2015; Jyothi et al., 2006).

Os maiores valores de tensão de ruptura foram obtidos nas regiões com maiores teores de amido de mandioca nativo e gelatina (Figura 6.2). Destaca-se que a gelatina foi a variável independente de maior influência ( $\beta_1=1,68$ ), aumentando a resistência dos filmes. Corroborando com os resultados apresentados, Acosta e colaboradores (2015) concluíram que a adição de gelatina deu origem a filmes com maior resistência à quebra e flexibilidade, em comparação com filmes de amido puro, o mesmo foi observado por Fakhouri et al. (2015). Nos polímeros amiláceos ocorrem interações através da ligação de hidrogênio, no entanto, na presença da matriz proteica, outras interações são possíveis de ocorrer, como as ligações covalentes (dissulfeto e não dissulfeto), as ligações iônicas, as interações hidrofóbicas e, com menor energia necessária para a ruptura, as forças de Van der Waals (Damodaran, Parkin & Fenemma, 2010), além das ligações de hidrogênio ocorridas no amido.

Os filmes produzidos são identificados subjetivamente pela transparência. Pela análise colorimétrica instrumental, como os valores de  $a^*$  (+60 = vermelho, -60 = verde) e  $b^*$

(+60 = amarelo, -60 = azul) foram próximos de zero, considera-se que não há uma cor predominante. Os parâmetros de cor  $L^*$  e  $a^*$  não foram estatisticamente influenciados pelas variáveis independentes dentro da faixa estudada ( $R^2 < 0,80$ ). Os valores obtidos para a coordenada  $b^*$  variaram de 0,24 a 0,55. Apesar deste parâmetro apresentar significância estatística ( $R^2=0,9072$ ), os valores absolutos apresentaram pequena variação. Contudo, houve maior influência da gelatina ( $\beta_2=0,4860$ ). A saturação ou intensidade de cor ( $C^*$ ) variou entre 0,24 e 0,55, sendo os valores absolutos, o comportamento gráfico (Figura 6.3) e os coeficientes de regressão semelhantes aos de  $b^*$ . Como  $C^*$  é calculado pela raiz quadrada da soma dos quadrados de  $a^*$  e  $b^*$ , este resultado era esperado considerando-se que os valores de  $a^*$  ficaram próximos à zero. O ângulo de tonalidade ( $h^*$ ) variou entre 84,37 e 94,54, sendo influenciado principalmente pela gelatina ( $\beta_2=93,891$ ), situando-se no primeiro quadrante do sólido de representação da cor instrumental.

**Figura 6. 3 - Curvas de contorno para avaliação do efeito da variação dos teores de amido de mandioca, gelatina e amido hidroxipropilado inter cruzado sobre a cor dos filmes**



Fonte: Acervo pessoal.

### *6.3.1.1 Validação dos modelos matemáticos do planejamento de misturas simplex centroide*

Conforme apresentado na Tabela 6.5, os modelos matemáticos foram validados (desvio relativo < 10%), exceto para a propriedade módulo de Young. O valor apresentado para esta variável foi inferior ao valor predito pelo planejamento, promovendo a formação de um filme com menor rigidez mecânica. A redução desta propriedade está associada a maior alongação e menor tensão de ruptura obtida quando comparado com o valor predito. No geral, com base nos valores de desvio relativo obtidos para cada variável resposta, a metodologia de otimização empregada foi considerada satisfatória. O ponto otimizado foi definido a partir da importância das variáveis independentes de acordo com a avaliação dos resultados experimentais. Sendo assim, a melhor proporção entre os materiais poliméricos continha 65,8% de amido de mandioca e 34,2% de gelatina. A formulação otimizada não continha amido de mandioca hidroxipropilado inter cruzado pois este amido modificado apresentou influência negativa sobre as propriedades de solubilidade, alongação, módulo de Young e tensão de ruptura.

Tabela 6.5 - Restrições utilizadas para definição do ponto ótimo

Variável	Objetivo	Limite Mínimo	Limite máximo	Importância	Solução	Valor experimental	Desvio relativo (%) <sup>a</sup>
X <sub>1</sub>	Maximizar	0	1	5	0,658	-	-
X <sub>2</sub>	Na faixa	0	1	3	0,342	-	-
X <sub>3</sub>	Minimizar	0	1	5	0,000	-	-
Solubilidade	Minimizar	12,26	34,03	5	26,04	26,50	1,74
Módulo de Young	Maximizar	0,97	118,73	5	112,47	84,56	33,01
Elongação na ruptura	Minimizar	17,00	167,00	5	31,93	35,33	9,60
Tensão de ruptura	Maximizar	0,24	1,59	5	1,36	1,24	9,63
<i>b</i> *	Na faixa	0,24	0,55	3	0,47	0,43	7,22
<i>C</i> *	Na faixa	0,24	0,55	3	0,47	0,43	7,58
<i>h</i> *	Na faixa	83,85	94,54	3	87,08	87,40	0,36

<sup>a</sup> Desvio relativo = [(valor experimental – valor predito)/valor experimental] x 100

### 6.3.2 Delineamento composto central rotacional para avaliação da atividade antifúngica do filme otimizado adicionado dos óleos essenciais

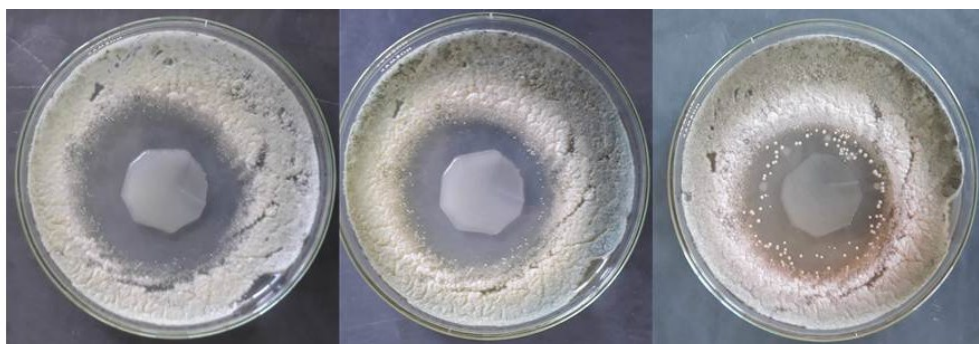
Os resultados para a técnica de disco-difusão para avaliar o efeito dos OEs adicionados no filme biodegradável estão apresentados na Tabela 6.6. Conforme observado pelos valores do diâmetro dos halos de inibição e aspecto visual dos mesmos (Figura 6.4), houve redução gradual ao longo do período de incubação.

**Tabela 6.6 – Diâmetro (cm) dos halos de inibição**

Ensaio	Dias de incubação						
	2	3	4	5	6	7	8
1	4,1±0,1	3,7±0,2	3,6±0,2	3,4±0,2	3,0±0,3	0,0±0,0	0,0±0,0
2	4,7±0,5	4,4±0,5	4,2±0,6	4,0±0,4	3,7±0,9	3,0±0,2	2,9±0,1
3	3,5±0,3	2,9±0,2	2,8±0,5	2,7±0,5	2,1±0,1	0,9±0,1	0,8±0,2
4	5,5±0,1	5,3±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1
5	2,7±0,1	1,8±0,2	1,5±0,1	1,4±0,1	1,2±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0
6	4,4±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,2±0,2	4,1±0,2	4,1±0,2
7	4,7±0,3	4,7±0,2	4,7±0,5	4,6±0,5	4,6±0,1	4,6±0,3	4,6±0,2
8	5,4±0,2	5,3±0,2	5,3±0,3	5,2±0,3	5,2±0,3	5,1±0,3	4,4±0,6
9	4,3±0,2	4,3±0,5	4,2±0,4	4,2±0,4	4,0±0,5	4,0±0,6	3,9±0,7
10	6,1±0,3	6,1±0,2	6,1±0,5	6,1±0,3	5,8±0,2	5,8±0,3	5,8±0,2
11	4,0±0,3	3,9±0,2	3,8±0,2	3,4±0,2	3,0±0,3	2,7±0,3	1,7±0,2
12	5,6±0,4	5,5±0,4	5,5±0,4	5,5±0,4	5,4±0,3	5,4±0,3	5,4±0,3
13	5,4±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1	5,2±0,1	4,9±0,4	4,9±0,4	4,9±0,4
14	4,5±0,2	4,3±0,3	4,2±0,4	4,2±0,5	4,2±0,5	4,1±0,6	3,9±0,3
15	3,9±0,5	3,5±0,2	3,5±0,2	3,4±0,2	2,4±0,1	2,1±0,1	2,1±0,1
16	3,6±0,7	3,6±0,6	3,5±0,7	3,3±0,8	2,4±0,4	2,2±0,2	2,1±0,2
17	3,9±0,2	3,4±0,4	3,4±0,5	3,3±0,5	2,8±0,2	2,4±0,4	2,2±0,4

Média de três repetições ± desvio padrão da população.

**Figura 6.4 – Aspecto visual dos halos de inibição (Ensaio 14) após 2, 5 e 8 dias de incubação, respectivamente (da esquerda para a direita)**



Fonte: Acervo pessoal.

A Tabela 6.7 resume os resultados da ANOVA, incluindo as equações polinomiais codificadas de segunda ordem, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), e os valores de F e p-valor. Para determinar se as equações ajustadas foram preditivas e significativas para plotar as curvas de contorno, foi verificado se o  $R^2$  das equações eram iguais ou superiores a 0,70, e, além disso, foram utilizados critérios baseados nos valores de F ( $F_{\text{calc}}$  e  $F_{\text{tab}}$ ), sendo que a razão entre ambos deve ser  $\geq 1,00$ . Dessa forma, apenas as equações dos halos de inibição após 7 e 8 dias de incubação não foram influenciadas pelas variáveis independentes dentro da faixa estudada ( $R^2 = 0,67$  e  $0,69$ ). Quanto aos demais resultados, estes sugerem que os modelos ajustados para os halos de inibição após 2, 3, 4, 5 e 6 dias de incubação são adequados (significativos e preditivos), já que apresentaram coeficientes de regressão significativos, baixos valores residuais, falta de ajuste não significativa e coeficientes de determinação satisfatórios.

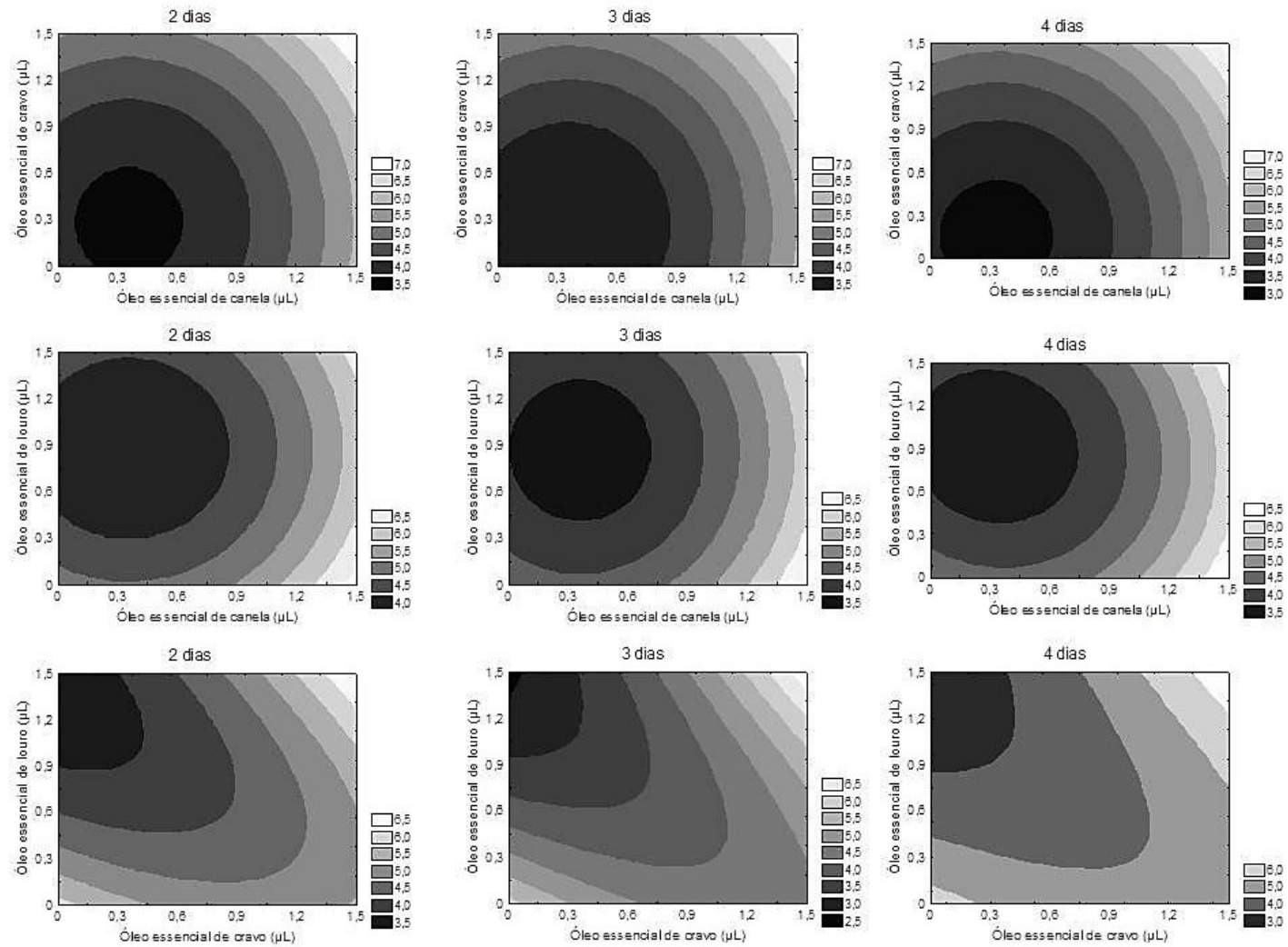
**Tabela 6.7 - Modelos matemáticos das variáveis dependentes estatisticamente significativas ( $p < 0,10$ ) para as proporções de óleos essenciais nos filmes biodegradáveis**

<b>Variável dependente (halo de inibição ao longo dos dias de incubação)</b>	<b>Modelo matemático</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>p-valor</b>	<b>F<sub>tab</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub>/F<sub>cal</sub></b>
2 (cm)	$3,85+0,59x_1+0,41x_2-0,14x_3+0,33x_1^2+0,20x_2^2+0,25x_3^2+0,36x_2x_3$	0,81	0,011	2,51	2,17
3 (cm)	$3,56+0,67x_1+0,48x_2-0,12x_3+0,38x_1^2+0,23x_2^2+0,23x_3^2+0,50x_2x_3$	0,75	0,034	2,51	1,50
4 (cm)	$3,52+0,70x_1+0,53x_2-0,13x_3+0,37x_1^2+0,20x_2^2+0,23x_3^2+0,05x_1x_3+0,49x_2x_3$	0,73	0,090	2,59	1,05
5 (cm)	$3,39+0,71x_1+0,61x_2-0,11x_3+0,42x_1^2+0,18x_2^2+0,26x_3^2+0,46x_2x_3$	0,74	0,038	2,51	1,45
6 (cm)	$2,59+0,77x_1+0,66x_2+0,62x_1^2+0,37x_2^2+0,50x_3^2+0,48x_2x_3$	0,75	0,013	2,46	2,04



Após 24 horas de incubação não foi verificada a formação de halos de inibição, devido ao irrelevante desenvolvimento das colônias fúngicas neste período. Os comportamentos dos halos de inibição após 2, 3 e 4 dias de incubação podem ser explicados e observados pelas equações (Tabela 6.7) e curvas de contorno presentes na Figura 6.5. No segundo dia, o diâmetro dos halos variou entre 2,7 e 6,1 cm. Observou-se que o OE de canela apresentou maior efeito antifúngico no termo linear ( $\beta_1 = 0,59$ ), enquanto o OE de louro mostrou efeito contrário ( $\beta_3 = -0,14$ ). Houve efeito apenas das interações entre os OEs de cravo e louro, com ação sinérgica ( $\beta_{23} = 0,36$ ). Após 3 e 4 dias de incubação os resultados foram semelhantes, com maior efeito do OE de canela ( $\beta_1 = 0,67$  e  $0,70$ , respectivamente).

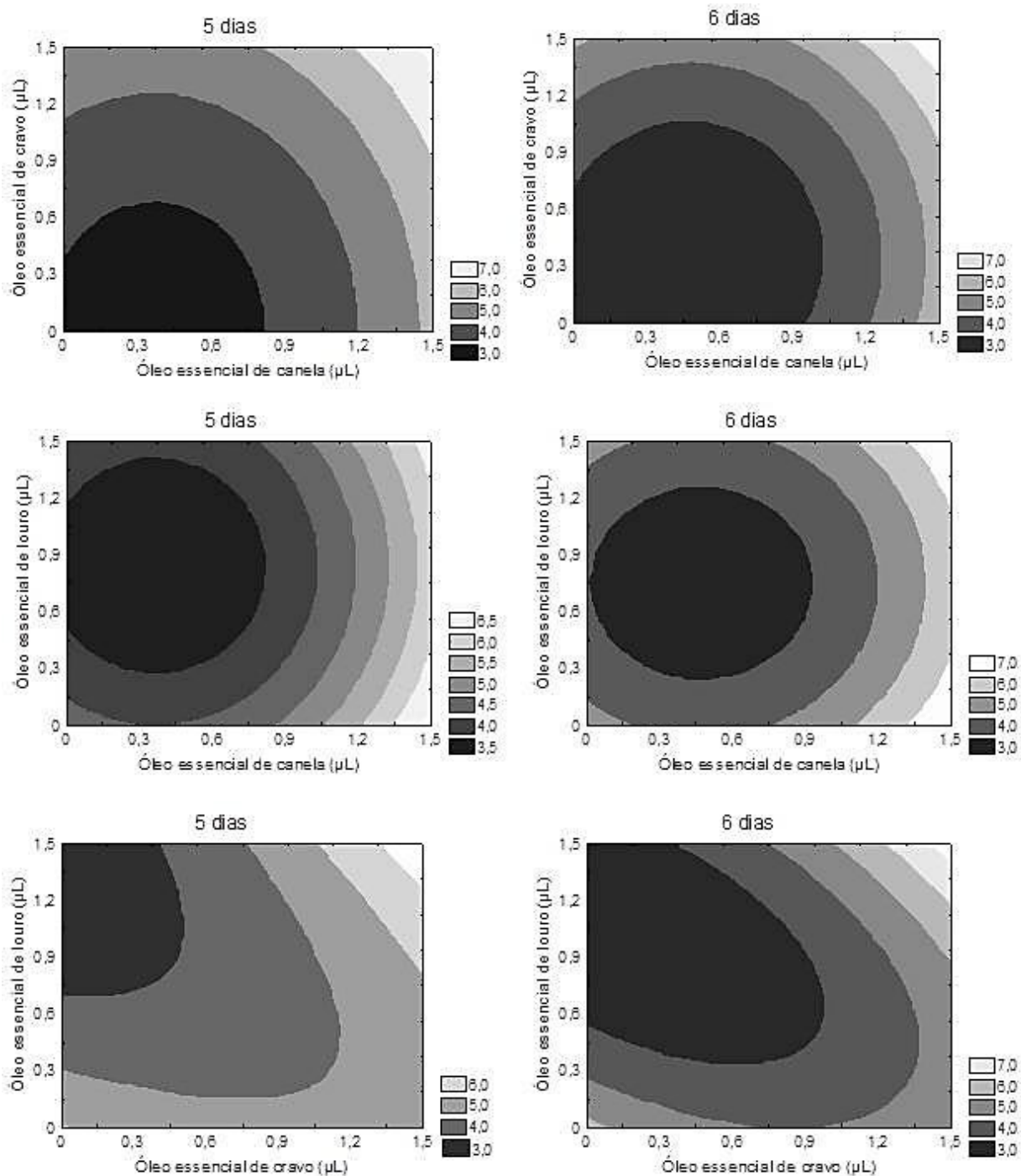
Figura 6.5 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição após 2, 3 e 4 dias de incubação.



Fonte: Acervo pessoal.

Após 5 e 6 dias de incubação, os resultados continuaram similares ao período precedente, o que pode ser observado pelo comportamento gráfico das curvas de contorno (Figura 6.6) e pelos coeficientes de regressão dos modelos matemáticos (Tabela 6.7).

**Figura 6.6 - Curvas de contorno para avaliação do efeito dos óleos essenciais sobre o halo de inibição após 5 e 6 dias de incubação.**



Fonte: Acervo pessoal.

Uma avaliação do efeito antifúngico prolongado foi realizada através da porcentagem de redução do diâmetro dos halos de inibição ao longo dos dias de incubação. Entretanto, esta resposta não foi estatisticamente significativa e em termos práticos estes resultados não foram relevantes para a discussão do efeito dos OEs.

#### *6.3.2.1 Validação dos modelos matemáticos do DCCR*

A validação dos valores preditos na análise estatística (Tabela 6.8) mostrou que os valores reais foram condizentes aos preditos pelos modelos matemáticos (desvio relativo < 10 %). O ponto otimizado foi definido considerando-se proporções minimizadas de OEs com efeito antifúngico satisfatório (maximizando-se os halos de inibição), de tal forma que não houvesse prejuízo na continuidade da matriz polimérica. Além disso, concentrações mais altas podem resultar em impacto sensorial negativo devido ao sabor e aroma muito pronunciados. Outro fator importante a ser considerado é o alto custo dos OEs, levando a necessidade de considerar o uso das menores concentrações possíveis.

Cabe ressaltar que a concentração do inóculo para a validação foi de  $1,91 \times 10^6$  UFC/g, valor inferior ao utilizado na realização dos ensaios do DCCR. Isto ocorre devido às diferentes condições climáticas durante a produção e armazenamento dos pães utilizados para isolamento dos bolores. Contudo, o resultado final foi satisfatório e a mistura otimizada de OEs apresentou, em níveis reais, 0,97% de OE de canela e 0,01% de OE de cravo, sem adição de OE de louro. A ausência do OE de louro pode ser justificada pelo baixo poder antimicrobiano que apresenta sobre os bolores explicados pelos coeficientes negativos apresentados nos modelos matemáticos (Tabela 6.7), bem como pelos resultados dos ensaios *in vitro* apresentados no Capítulo 4.

Tabela 6.8 - Restrições utilizadas para definição do ponto ótimo

Variável	Objetivo	Limite Mínimo	Limite máximo	Importância	Solução	Valor experimental	Desvio relativo (%)
X <sub>1</sub>	Minimizar	-1,68	1,68	5	0,50	-	-
X <sub>2</sub>	Minimizar	-1,68	1,68	5	-1,64	-	-
X <sub>3</sub>	Minimizar	-1,68	1,68	5	-1,68	-	-
Dia 2	Maximizar	2,73	6,06	5	6,02	6,10	1,34
Dia 3	Maximizar	1,78	6,05	5	6,09	5,77	5,54
Dia 4	Maximizar	1,53	6,10	5	5,84	5,75	1,45
Dia 5	Maximizar	1,44	6,09	5	5,51	5,61	1,74
Dia 6	Maximizar	1,23	5,81	5	5,77	5,58	3,52

<sup>a</sup> Desvio relativo = [(valor experimental – valor predito)/valor experimental] x 100

### 6.3.3 Características dos filmes otimizados

Conforme descrito por Fani e colaboradores (2015), os OEs têm baixa solubilidade em água devido à baixa dispersão dentro de produtos de base aquosa. Sendo assim, o filme otimizado com adição de OEs apresentou solubilidade estatisticamente inferior ao padrão (Tabela 6.9), provavelmente devido ao aumento da hidrofobicidade do meio.

**Tabela 6.9 - Características do filme otimizado com (PO) e sem adição de óleo essencial (P)**

Parâmetro	P	PO	p-valor
Solubilidade (%)	26,49±1,58	16,38±0,59	<0,001
Umidade (%)	11,69±1,09	5,40±0,16	<0,001
Densidade (g/cm <sup>3</sup> )	0,50±0,03	0,55±0,05	0,073
Módulo de Young (MPa)	84,56±12,98	109,82±11,85	0,023
Elongação na ruptura (%)	35,33±4,35	29,51±2,51	0,128
Tensão de ruptura (MPa)	1,24±0,13	2,10±0,04	<0,001
<i>L</i> *	97,03±0,03	98,78±0,22	<0,001
<i>a</i> *	0,02±0,01	0,09±0,01	<0,001
<i>b</i> *	0,43±0,02	1,18±0,20	<0,001
<i>C</i> *	0,43±0,02	1,19±0,20	<0,001
<i>h</i> *	87,40±0,48	85,39±1,13	0,115

Semelhante aos valores obtidos por Galindo (2017) para filmes de amido com adição de OE de orégano, a umidade do filme com adição da mistura de OEs foi de 5,4%, com redução significativa em relação ao controle. No entanto, a densidade não foi significativamente afetada pela adição de OEs.

As propriedades mecânicas de um filme dependem fortemente da formulação (macromolécula, solvente e plastificante) e do processo de obtenção dos mesmos. Observou-se, pela Tabela 6.9, que o módulo de Young do filme contendo a mistura de OEs foi superior ao controle. Comportamento semelhante foi encontrado por Zivanovic et al. (2005), com aumento do módulo de Young na concentração de 1 % de OE de orégano, em relação ao controle, em filmes de quitosana. Entretanto, estes resultados contradizem diversos estudos (Melo, 2010; Zinoviadou et al., 2009; Espitia et al., 2011; Botre et al., 2010), onde a adição de OEs ocasionou a redução do módulo de Young. Acredita-se que a interação dos OEs com os

aminoácidos hidrofóbicos presentes na gelatina podem ter resultado em menores efeitos negativos sobre as propriedades mecânicas dos filmes biodegradáveis.

A porcentagem de alongação na ruptura dos filmes foi inferior ao padrão considerando-se os valores absolutos, entretanto não houve diferença significativa entre as amostras. Magalhães (2012) encontrou resultados semelhantes, sugerindo que dependendo da concentração de OE o percentual de alongação na ruptura pode não sofrer variações consideráveis, como ocorreu entre o filme de acetato de celulose puro e incorporado de 15 e 50 ( $\mu\text{g}/100$  g de sólidos) de OE de cravo.

A adição da mistura otimizada de OEs resultou no aumento significativo da tensão de ruptura. Em contrapartida, ao adicionar OEs de orégano e cravo em filmes de acetato de celulose, Magalhães (2012) concluiu que a incorporação destes à formulação do filme interferiu diretamente na resistência, com redução significativa da tensão de ruptura em relação ao aumento da concentração de OEs. Estudo de Pelissari e colaboradores (2009), também mostrou que a incorporação de OE de orégano em filmes de amido e quitosana reduziu a resistência à tração.

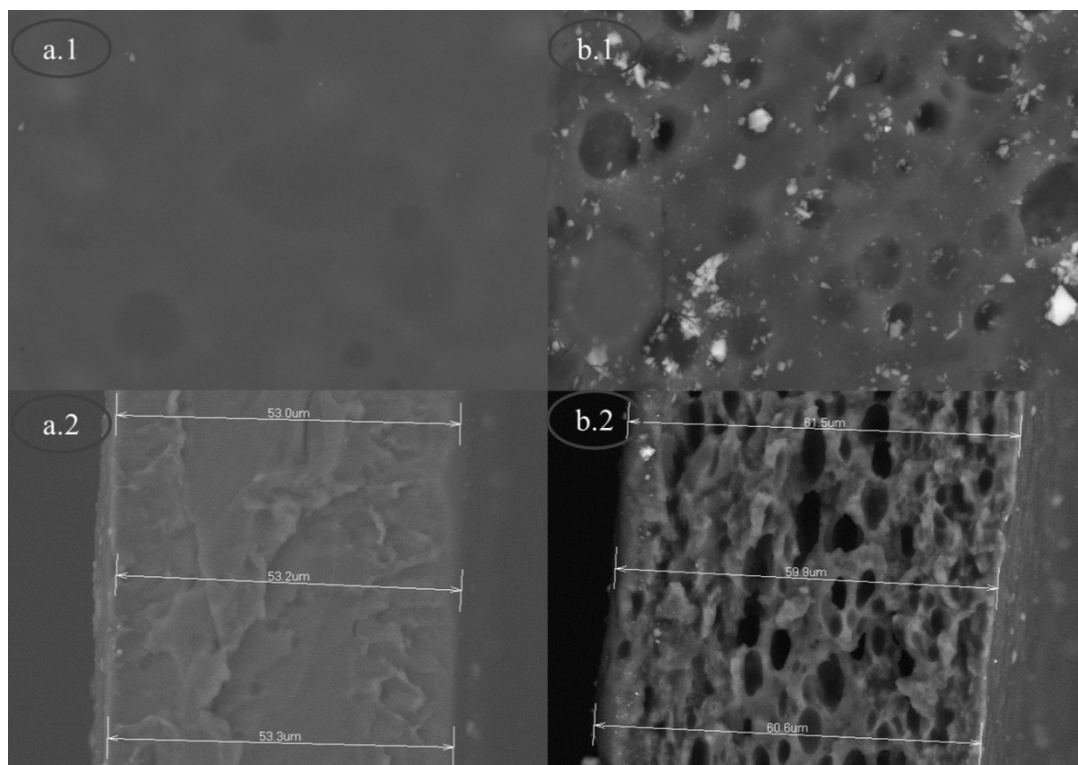
As diferentes combinações e concentrações utilizadas, tanto dos polímeros, quanto dos OEs no presente estudo, podem ter ocasionado em interações químicas distintas das observadas por outros autores, levando ao conflito na relação entre a elevação ou decréscimo das características de tração. Desta forma, acredita-se que interações específicas entre os constituintes do filme e do OE, tais como ligações cruzadas, diferentes arranjos estruturais dos componentes ou a formação de estruturas bifásicas heterogêneas devem ser levadas em consideração para avaliar tais parâmetros (Atares & Chiralt, 2016).

A cor do filme adicionado de OE apresentou diferença significativa com maiores valores de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  e  $C^*$  em relação ao padrão. Como o OE de canela está presente em maior proporção e apresenta tonalidade amarelada pode ter havido influência direta na cor final dos filmes, principalmente em relação ao parâmetro  $b^*$  e a saturação de cor ( $C^*$ ). Tongnuanchan e colaboradores (2015), aplicaram óleo de palma em filmes de gelatina e encontraram menor valor de  $L^*$ , enquanto a coordenada  $b^*$  apresentou valor mais alto. O óleo de palma tinha cor amarelada devido à presença de pigmentos (beta-caroteno), o que foi utilizado para justificar a diferença de cor.

O filme padrão (Figura 6.7 - a.1 e a.2) exibiu uma estrutura homogênea, compacta e densa, sem microporos, sugerindo completa miscibilidade entre os biopolímeros amido de

mandioca e gelatina. A adição de OEs aumentou significativamente a porosidade do meio, conforme evidenciado na Figura 6.7 - b.1 e b.2.

**Figura 6.7 - Microestrutura da superfície e seção transversal dos filmes**



a.1 e a.2: superfície e seção transversal do filme padrão (sem adição de OE); b.1 e b.2: superfície e seção transversal do filme otimizado com OE, respectivamente.

Fonte: Acervo pessoal.

Visualmente, todos os filmes apresentaram superfície lisa, uniforme e regular. Entretanto, a análise microscópica mostrou que os filmes com OE possuem uma estrutura descontínua, com gotículas embutidas na rede polimérica provenientes dos OEs. De acordo com Brandelero e colaboradores (2015), a presença de microporos ao longo da matriz ocorre em filmes obtidos por *casting* devido a evaporação contínua da água que ao atravessar a matriz dos filmes cria tais microestruturas. Contudo, a adição de OEs ocasiona aumento do diâmetro das cavidades e fissuras, com maior prejuízo à integridade estrutural dos filmes. A medida da sessão transversal dos filmes indicou que a amostra sem OEs apresentou menor espessura (50,0-53,3 μm) em função da maior compactação. No entanto, com a adição dos OEs e o aumento da porosidade, a espessura dos filmes foi levemente superior (59,9-61,5 μm)



De maneira geral, o filme otimizado apresentou propriedades mecânicas adequadas (boa rigidez e alta tensão de ruptura), baixa umidade e solubilidade em água, além de bom desempenho antifúngico, frente aos bolores de pães integrais. Considerando os princípios da embalagem ativa (interação embalagem-alimento), acredita-se que o contato direto na aplicação in situ na matriz alimentícia pode ser capaz de melhorar as propriedades de conservação dos pães por meio de liberação controlada dos compostos voláteis dos OEs.

#### **6.4 Conclusão**

Os resultados do presente estudo indicam que o filme otimizado, produzido com 2% de sólidos em relação à solução filmogênica, contendo 65,8% de amido de mandioca e 34,2% de gelatina, adicionado de 0,97% de OE de canela e 0,01% de OE de cravo apresentou inibição satisfatória no desenvolvimento de bolores in vitro, mantendo-se viáveis as propriedades físicas e mecânicas, indicando assim, potencial para aplicação em produtos de panificação.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à UFVJM e ao ICT pelo suporte institucional. Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada (LMMA). Ao CNPq pelo suporte financeiro (Projeto 424938/2016-2), à FAPEMIG pela bolsa de estudos e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos e pelo suporte financeiro, código de financiamento 001.

#### **6.5 Referências**

- Al-Hassan, A. A., & Norziah, M. H. (2012). Starch e gelatin edible films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocolloids*, 26, 108-117.
- Araújo, G. K. P. (2014). Desenvolvimento de filmes biodegradáveis de amido incorporados com extrato de própolis. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia de Alimentos). UTFPR: Campo Mourão.

- ASTM. (2007). Standard test method for moisture content of paper and paperboard by oven drying (D64-99). *In Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (2011). Standard practice for calculation of color tolerances and color differences from instrumentally measured color (D2244-11). *In Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- ASTM. (2012). Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting (D882-12). *In Annual book of ASTM standards*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.
- Atares, L., & Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 51-62.
- Botre, D. A., Soares, N. de F. F., Espitia, P. J. P., Sousa, S. de, Renhe, I. R. T. (2010). Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. *Revista Ceres*, 57 (3), 283-291.
- Brandelero, R. P. H., Almeida, F. M., & Alfaro, A. (2015). Microestrutura e propriedades de filmes de amido-álcool polivinílico-alginato adicionados de óleos essenciais de copaíba e capim limão. *Química Nova*, 38 (7), 910-916.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223– 253.
- Cauvain, S. P., Young, L. S. (2009). *Tecnologia da panificação*. 2. ed. Barueri: Manole.
- Chiou, B.S., Avena-Bustillos, R.J., Bechtel, P.J., Jafri, H., Narayan, R., Imam, S.H., Glenn, G.M., Orts, W. (2008). Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradable properties. *European Polymer Journal*, 44, 3748-3753.
- Chiu, C. W., & Solarek, D. Modification of starches. (2009). In: BEMILLER, J.; WHISTLER, R. *Starch: Chemistry and Technology*. New York: Elsevier Inc., 629-655.
- Damodaran, S.; Parkin, K.L.; Fennema, O.R. (2010). *Química de Alimentos de Fennema*. 4. ed., Porto Alegre: Artmed.
- De Bona, J. C. (2007). Preparação e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de blendas de amido com polietileno. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). UFSC: Florianópolis.

- Derringer, G. C., & Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *Journal of Quality Technology*, 12, 214-219.
- Espitia, P. J. P., Botti, L. C. M., Soares, N. F. F., Salgado, J. J., Hoyos, J. A., Silva, W. A., Melo, N. R., Pereira, O. L. (2009). Efeito da incorporação de óleos essenciais nas propriedades mecânicas, de barreira ao vapor de água e caracterização estrutural de embalagens ativas celulósicas. In: Congresso brasileiro de polímeros.
- Fakhouri, F.M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J.I., Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57–64.
- Fani, A. A., Trujillo, L. S., Grau, M. A. R., Belloso, O. M. (2015). Edible films from essential-oil-loaded nanoemulsions: Physicochemical characterization and antimicrobial properties. *Food Hydrocolloids*, 47, 168–177.
- Galindo, M. V. (2017). Filmes biodegradáveis de gelatina e quitosana com adição de óleos essenciais na conservação de presunto embalado a vácuo. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos). UTFPR: Londrina.
- Grau, M. A. R., Bustillos, R. J. A., Friedman, M., Henika, P.R., Belloso, O. M., McHugh, T.H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 9262–9267.
- Jaekel, L. Z., Schmiele, M., Silva, R. S., Chang, Y. K. (2015). Influence of the extrusion process on the technological properties of hydroxypropylated cross-linked cassava starch. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7305–7312.
- Jyothi, A. N., Moorthy, S. N., & Rajasekharan, K. N. (2006). Effect of cross-linking with epichlorohydrin on the properties of cassava (*Manihot esculenta Crantz*) starch. *Starch-Starke*, 58(6), 292-299. doi:10.1002/star.200500468.
- Lawton, J. W. (1996). Effect of starch type on the properties of starch containing filmes. *Carbohydrate Polymers*, 29, 203-208.
- Long, N. N. V., Joly, C., & Dantigny, P. (2016). Active packaging with antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 220, 73–90.
- Magalhães, R. M. F. (2012). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e incorporação em filme de acetato celulose na conservação de carne resfriada de frango. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). UFG: Goiás.

- Masina, N., Choonara, Y. E., Kumar, P., Toit, L. C., Govender, M., Indermun, S., Pillay, V. (2017). A review of the chemical modification techniques of starch. *Carbohydrate Polymers*, 157, 1226–1236.
- Melo, A. A. M. (2010). Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) na conservação de carne de frango. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos. UFG: Goiânia.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., & Freitas, P. C. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic – resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247- 256.
- Oliveira, R. A., Reis, T. V., Sacramento, C. K., Duarte, L. P., Oliveira, F. F. (2009). Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19 (3), 771-775.
- Pelissari, F. M., Ferreira, D. C., Louzada, L. B., Santos, F., Corrêa, A. C., Moreira, F. K. V., Mattoso, L. H. (2019). Starch-based edible films and coatings: an eco-friendly alternative for food packaging. In: CLERICI, M. T. P. S.; SCHMIELE, M. Starches for food application: Chemical, Technological and Health Properties. New York: Elsevier Inc., p. 360-420.
- Pelissari, F. M., Grossmann, M. V. E., Yamashita, F., Pineda, E. A.G. (2009). Antimicrobial, Mechanical, and Barrier Properties of Cassava Starch-Chitosan Films Incorporated with Oregano Essential Oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 57, 7499–7504.
- Pelissari, F. M., Mahecha, M. M. A., Sobral, P. J. A., Menegalli, F. C. (2013). Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *LWT - Food Science and Technology*, 52, 1-11.
- Rivero, S., García, M., & Pinotti A. (2010). Correlations between structural, barrier, thermal and mechanical properties of plasticized gelatin films. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 369-375.
- Santoyo, S. R., Lloria, L., Jaime, E., Ibanez, F. J., Senor, G. (2006). Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from *Laurus nobilis*: Chemical and functional characterization. *European Food Research Technology*, 222, 565-571.

- Schmiele, M., Sampaio, U. M., Clerici, M. T. P. S. (2019). Basic Principles: Composition and Properties of Starch. In: CLERICI, M. T. P. S.; SCHMIELE, M. Starches for food application: Chemical, Technological and Health Properties. New York: Elsevier Inc., p. 1-22.
- Silveira, M. P., Santos, M. A. A., Souza, P. M., Pelissari, F. M., Schmiele, M. (2018). Atividade antifúngica de óleos essenciais de canela, cravo e louro sobre bolores de pão de forma integral. Anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos: Belém.
- Sivakumar, D., Bautista-Baños, S. (2014). A review on the use of essential oils for postharvest decay control and maintenance of fruit quality during storage. *Crop Protection*, 64, 27–37.
- Sobral, P. J. A. (2000). Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 35 (6), 1251-1259.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T., Nilsuwan, K. (2015). Emulsion film based on fish skin gelatin and palm oil: Physical, structural and thermal properties. *Food Hydrocolloids*, 48, 248-259.
- Wurzburg, O. B. (2006) Modified starches. In: STEPHEN, A. M.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Food Polysaccharides and Their Applications, 2nd Ed. Boca Raton: CRC Press, 87-118.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2009). Physico-chemical properties of whey protein isolate films containing oregano oil and their antimicrobial action against spoilage flora of fresh beef. *Meat Science*, 82, 338–345.
- Zivanovic, S., Chi, S., Draughon, A. F. (2005). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70, 1.



## 7 CONCLUSÃO GERAL

OEs de canela, cravo e louro apresentaram efeito significativo na inibição do crescimento *in vitro* de fungos isolados de pães de forma integrais. A proporção otimizada de OEs foi de 11,77  $\mu\text{L}/100 \mu\text{L}$  de inóculo, contendo 34,2 % de OE de canela, 42,5 % de OE de cravo e 23,3 % de OE de louro. Nestas proporções, tanto a CIM quanto a CML foram de 20  $\mu\text{L}$  de OEs por mL de inóculo.

Na aplicação *in situ*, apesar de a adição direta de OEs à massa não apresentar efeito conservante estendido nos pães integrais, a adição de 3  $\mu\text{L}$  OE /g de massa, através de aspersão na superfície, resultou em pães com maiores teores de umidade ao longo da vida de prateleira e menores valores de firmeza e dureza. Além disso, as análises microbiológicas indicaram o retardo do desenvolvimento de fungos com melhores resultados nesta concentração.

Além disso, o filme otimizado contendo 65,8% de amido de mandioca e 34,2% de gelatina, adicionado de 0,97% de OE de canela e 0,01% de OE de cravo (com base na solução filmogênica) apresentou inibição satisfatória no desenvolvimento de bolores *in vitro*, mantendo-se viáveis as propriedades físicas e mecânicas das embalagens.

De maneira geral, os OEs apresentaram potencial para aplicação como conservantes naturais em pães de forma integrais. A aplicação destes na superfície dos pães apresentou maior viabilidade em relação à sua aplicação como aditivo na formulação do produto. E ainda, os filmes produzidos apresentaram características físicas adequadas e capacidade de inibição/retardo do desenvolvimento de fungos. Para viabilizar o uso de OEs pode ser interessante utilizar técnicas combinadas de forma a minimizar as proporções necessárias, contribuindo para melhores características tecnológicas, nutricionais, sensoriais e propriedades de conservação.