

Ação antifúngica de óleos essenciais em filmes biodegradáveis frente a bolores termorresistentes isolados de tomates

Carolina Kurebayashi Velloso¹
Murilo Dener Martins²
Márcia Luzia Rizzatto³

Resumo: Os bolores termorresistentes são encontrados nos produtos alimentícios, devido sua sobrevivência às temperaturas empregadas na pasteurização de alimentos ácidos e seus derivados. Os óleos essenciais têm mostrado eficiência contra bactérias e fungos contaminantes de alimentos, podendo ser incorporadas a filmes biodegradáveis para o aumento da vida de prateleira. Neste trabalho, foram isolados 12 bolores antes da pré-lavagem, 9 da água de lavagem sem adição de cloro e 9 dos produtos antes da pasteurização. Destes bolores somente 3 espécies mantiveram a termorresistência nas temperaturas de 80, 85 e 90°C, sendo estes possíveis bolores termorresistentes. Foram testados os óleos essenciais de tomilho, louro, orégano, alecrim, gengibre, manjerição, cravo, limão, anis estrelado e noz moscada nas concentrações de 2%, 4% e 8% para a inibição dos bolores determinados como A', E' e M'. Observou-se ação antifúngica do óleo essencial de cravo frente aos três bolores (A', E' e M'). O óleo essencial de tomilho foi eficiente frente aos bolores A' e E', o de orégano no E' e noz moscada no A', nas concentrações de 4% e 8%. As soluções filmogênicas produzidas em ambas concentrações com o óleo essencial de cravo, e pode-se observar melhor inibição na concentração de 8% frente aos três bolores.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Embalagem Ativa. Produtos Ácidos.

Abstract: Thermoresistant molds are found in food products due to their survival at the temperatures used in the pasteurization of acidic foods and their derivatives. Essential oils have been shown to be effective against foodborne bacteria and fungi, and can be incorporated into biodegradable films to increase shelf life. In this work, 12 molds were isolated before the prewash, 9 of the washing water without addition of chlorine and 9 of the products before pasteurization. Of these molds, only three species maintained the thermoresistance at temperatures of 80, 85 and 90 ° C, these being possible thermoresistant molds. The essential oils of thyme, laurel, oregano, rosemary, ginger, basil, clove, lemon, star anise and nutmeg were tested in concentrations of 2%, 4% and 8% for the inhibition of molds determined as A', E' in. Antifungal action of clove essential oil was observed against the three molds (A', E' and M'). The essential oil of thyme was efficient against the molds A' and E', the one of oregano in the E' and nutmeg in the A', in the concentrations of 4% and 8%. The filmogenic solutions produced in both concentrations with clove essential oil, and a better inhibition at 8% concentration can be observed against the three molds.

Keywords: Antimicrobials. Active Packaging. Acid Products.

¹ IFSP - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão; carolina.ifsp@gmail.com

² IFSP - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão; murilo_dener@hotmail.com

³ IFSP - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, Câmpus Matão; marciarizzatto@ifsp.edu.br

Introdução

O tomate é uma cultura de grande importância no cenário nacional. Muito apreciado por seu sabor, seja *in natura* ou processado, é uma das hortaliças mais consumidas no mundo. O Brasil não só é um grande consumidor de tomate, mas também é um eficiente produtor desta hortaliça. No cenário de tomates para processamento, é o 5º maior produtor mundial. E no segmento de tomate de mesa, também se destaca tanto pelo volume produzido como pelas tecnologias disponíveis e adotadas para a produção (CLEMENTE, 2013).

A produção de molho de tomate de uma indústria de Processamento de frutas e hortaliças da região da Cidade de Matão, demonstrou claramente dificuldades na produção da polpa de tomate. Mesmo passando pela limpeza adequada, processos térmicos e assépticos há contaminação por bolores termorresistentes que sobrevivem ao processo.

Atualmente, novas tecnologias têm surgido visando melhorar e, ou monitorar a qualidade dos produtos, dentre elas está o desenvolvimento de embalagens ativas. As embalagens ativas vêm sendo utilizadas para aumentar a vida de prateleira, melhorar as características sensoriais, evitar as deteriorações químicas e microbiológicas e garantir a segurança dos alimentos, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos. As embalagens ativas também são tecnologias inovadoras que monitoram a qualidade e segurança dos alimentos (SOARES et al., 2009).

Na busca por novas soluções e como alternativa aos polímeros convencionais, os polímeros biodegradáveis têm alcançado uma posição de destaque. Dessa maneira, as pessoas em torno desses materiais atingem proporções cada vez maiores. Além do aspecto ambiental, o esgotamento inexorável da principal fonte de matéria-prima para os polímeros sintéticos (petróleo) implica na aceleração da busca por alternativas industrialmente realizáveis (FECHINE, 2013).

No presente trabalho, foram isolados fungos filamentosos (bolores) desde a matéria-prima até o produto final, e foi testado sua termorresistência. Foi investigado a ação antifúngica de vários óleos essenciais frente a bolores termorresistentes, para então o desenvolvimento de um biofilme a base de amido de mandioca com a inserção dos óleos de efeito positivos, acoplando a melhoria no desenvolvimento de embalagens ativas e conservação de produtos a base de tomate.

Consumo de tomate no Brasil

O consumo de tomate no Brasil é pequeno comparado a países da Europa como Noruega, Grécia e Suíça, que chegam a consumir, *per capita*, 40 Kg por ano. Ainda assim, o público brasileiro do tomate e molho de tomate é maior que vários países vizinhos, abrangendo homens e mulheres de todas as classes sociais, atingindo um consumo *per capita* de 6,5 Kg por ano (ANDRADE; OETTERER; TORNISIELO, 2010).

O tomate e seus derivados são mais utilizados, no Brasil, na preparação de sopas, carnes, aves, panquecas, peixes, pizza, risotos, etc. (EMBRAPA, 2000).

A demanda por este molho é alta, tornando-se um mercado crescente, mesmo diante da atual situação econômica do país, observando, então, a não interferência no consumo desse produto.

Processamento

Os tomates são recebidos e passam por um processo de limpeza e sanitização que elimina corpos estranhos e uma grande parte da carga microbiana. Com a ajuda de uma rampa, a matéria-prima é elevada, retirando a água em excesso, e levado para a seleção, onde se retiram tomates estragados e partes não comestíveis, como gravetos e folhas. Após esta etapa, ocorre a moagem, e são separados mecanicamente, a casca e fibras que podem atrapalhar na qualidade do molho. Depois, a pasta passa por um processo de mistura com outros possíveis ingredientes, como conservantes, e é levada para o processo de pasteurização, que visa eliminar os microrganismos patogênicos e a maioria dos não-patogênicos. Após todos esses processos, o atomatado é embalado e levado ao estoque, onde depois é despachado para os mercados consumidores e distribuído à população (EMBRAPA, 2000).

Bolores

Também conhecidos como mofos, são fungos filamentosos (formam filamentos chamados hifas), amplamente distribuídos na natureza e encontrados no solo, em superfícies de vegetais, nos animais, no ar e na água. Com relação à temperatura, preferem ambientes na faixa de 20°C a 30°C, embora grande número de bolores desenvolva-se em temperatura de refrigeração. De modo geral, não se adaptam a temperaturas mais elevadas e são capazes de se desenvolver em ambientes com baixa disponibilidade de água (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A maioria desses microrganismos encontrados em alimentos são fáceis de eliminar. Os esporos dos gêneros mais comuns como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, entre outros, são mortos depois de aquecimento por cinco minutos a 60°C (TOURNAS, 1994).

Já os fungos termorresistentes conhecidos, como os do gênero *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* e *Eupenicillium*, têm sido reportados devido suas capacidades de sobreviver em temperaturas empregadas em tratamentos térmicos fornecidos a alimentos ácidos, como frutas e derivados (SPLITTSTOESSER, 1976; HOCKING; PITT, 1985) devido, também, a suas capacidades de produzir esporos (ascóporos), porém, mais resistentes, pois formam um asco, que é uma estrutura em forma de bolsa, que garante a integridade dos esporos, que, quando amadurecem e se encontram em ambiente propício, voltam a sua forma ativa e começam a degradar o meio no qual se encontra (SPLITTSTOESSER, 1976).

Byssochlamys fulva* e *Byssochlamys nivea

Os fungos do gênero *Byssochlamys* são caracterizados pela ausência de qualquer corpo que envolvam os ascos durante seu desenvolvimento. Os ascos do *Byssochlamys nivea* tem em seu ciclo de vida, duas formas de reprodução: assexuada ou estágio imperfeito (anamorfo) denominando-se *Paecilomyces niveus*, produzindo conídios e sexuada ou estágio perfeito (teleomórfico), que produzirá os ascóporos (esporos) (SPLITTSTOESSER, 1991).

Neosartorya fischeri

Os ascos desse gênero têm uma aparência granular, devido a produção de ascocarpos, que recobre o esporo. Os ascóporos desse gênero podem ser lisos ou espinhosos possuindo duas cristas equatoriais (SPLITTSTOESSER, 1991), sendo comumente encontrados em frutas e hortaliças cultivadas no solo.

Talaromyces flavus

É a espécie mais comumente isolada de alimentos ácidos termoprocessados, caracterizados pela produção de gimnotécios (onde os ascos são produzidos) de coloração branca ou amarelada, composto por hifas finas entrelaçadas resultando em uma estrutura semi-fechada. O seu estado imperfeito é conhecido como *Penicillium dangeardii*, tendo seus ascóporos de forma elipsoidal e paredes espinhosas (HOCKING; PITT, 1985).

Eupenicillium flavus

Produz cleistotécio que, em muitos casos, torna-se extremamente rígido e pode permanecer por semanas ou meses até finalmente amadurecer para assim produzir numerosos ascos com oito ascóporos em seu interior. Os ascóporos são elipsoidais possuindo uma leve ruga longitudinal além de apresentar superfície áspera. A fase anamorfa deste gênero é o *Penicillium* (HOCKING; PITT, 1985).

Embalagens

As indústrias alimentícias priorizam a produção de alimentos com qualidade e segurança alimentar. Para atingir esses objetivos, além da implantação dos programas de qualidade e das

práticas higiênico-sanitárias, faz-se necessário, também, o acondicionamento do produto em embalagens convenientes, competitivas e adequadas, para protegê-lo e conservá-lo durante as fases de estocagem e comercialização, assegurando ao consumidor a aquisição de um produto com um nível satisfatório de qualidade. Esta qualidade pode ser avaliada por parâmetros sensoriais (sabor, cor, textura e odor), por características gerais de aparência, pela carga microbiana, pela absorção de componentes da embalagem ou pelo valor nutricional (SOARES, 2002).

De acordo com Jorge (2013), as principais funções que a embalagem deve exercer são: proteção; conservação; informação; e a função relacionada ao serviço ou à conveniência na utilização do produto.

Embalagens Biodegradáveis

Plásticos convencionais são derivados de petróleo o que implica graves problemas ambientais. Filmes e revestimentos biodegradáveis representam uma alternativa interessante para materiais plásticos convencionais, é por isso que vários bipolímeros têm sido explorados para desenvolver materiais para embalagens de alimentos que não degradem a natureza (AZEREDO, 2009).

Na busca por novas soluções e como alternativa aos polímeros convencionais, os polímeros biodegradáveis têm alcançado uma posição de destaque. Dessa maneira, as pessoas em torno desses materiais atingem proporções cada vez maiores. Além do aspecto ambiental, o esgotamento inexorável da principal fonte de matéria-prima para os polímeros sintético (petróleo) implica na aceleração da busca por alternativas industrialmente realizáveis (FECHINE, 2013).

O estudo de filmes biodegradáveis vem sendo de extrema importância principalmente pelo impacto que os polímeros convencionais vêm causando em nosso planeta, assim de acordo com Fechine (2013) os relatórios da Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2000, o Brasil produziu 22.413 toneladas de resíduos sólidos. Sendo então o estudo de uma nova fonte, a qual não impactará arduamente no meio ambiente o ideal para o futuro da população mundial, que visivelmente não parará de consumir.

Biofilme de amido

A produção de materiais biodegradáveis a partir de fontes renováveis é considerada uma forma de reciclagem. Dessa forma, várias pesquisas com diferentes materiais (amido, celulose e lipídios) têm sido desenvolvidas na tentativa de minimizar, diminuir ou solucionar o problema

da poluição através da obtenção de plásticos biodegradáveis, ou seja, os biofilmes (SILVA et al., 2008).

O amido tem recebido especial atenção e as pesquisas com este polímero se intensificaram nos últimos anos, pois o amido possui baixo custo, abundância e alta aplicabilidade (BENGTSSON et al., 2003).

Embalagens ativas

Atualmente, novas tecnologias têm surgido visando melhorar e, ou monitorar a qualidade dos produtos. As embalagens ativas vêm sendo utilizadas para aumentar a vida de prateleira, melhorar as características sensoriais, evitar as deteriorações química e microbiológica e garantir a segurança dos alimentos, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos. As embalagens inteligentes também são tecnologias inovadoras que monitoram a qualidade e segurança dos alimentos (SOARES, et al., 2009).

Visando atender às necessidades de um mercado consumidor cada vez mais exigente e especificamente preocupado com a qualidade e inocuidade dos produtos alimentícios, surgem as embalagens ativas. Estas embalagens podem ser definidas como embalagens que percebem mudanças no ambiente ao redor do produto e respondem com alterações em suas propriedades. Exemplos são as embalagens com ação de absorção de oxigênio, etileno, odores ou umidade. Outros exemplos de embalagens ativas são as que liberam compostos antimicrobianos, como sais de prata, álcoois, dióxido de enxofre, dióxido de cloro e bacteriocinas (BRODY, 2002).

Um agente antimicrobiano ideal, deve ser efetivo em um largo espectro e em baixas concentrações, não causar alterações nas características sensoriais do produto, ter um custo compatível e atender à legislação vigente. Os maiores desafios dessa tecnologia, têm sido estabilidade térmica a eficácia a baixas temperaturas, o atendimento às exigências legais e o grau de alteração de propriedades físicas, mecânicas e de maquinabilidade dos filmes (SOARES, 2002).

Óleos essenciais

Óleos essenciais de plantas vem sendo usados no combate a fungos deterioradores há séculos (BULLERMAN et al., 1977), eles constituem os elementos voláteis em muitos órgãos vegetais, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (SIQUI et al., 2000).

Óleos essenciais bastante utilizados para o desenvolvimento de pesquisa na área alimentícia, tem características ligadas a condimentos, especiarias já presentes nas formulações dos produtos, muitas vezes para não interferir nas características sensoriais dos mesmos.

Condimento estes que em composição de produtos atomatados são comuns em formulação: cravo, tomilho, noz moscada, orégano, alecrim, limão, louro, anis estrelado, gengibre e manjeriço.

O cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus L.*) é uma planta amplamente utilizada para as mais diversas aplicações (ROUBACH et al., 2005). Na composição volátil do óleo essencial de cravo-da-índia, três compostos foram considerados majoritários, destacando-se o eugenol, com 83,75% da área total, seguido pelo β -cariofileno, com 10,98%, e com 1,26%, α -humuleno (SCHERER et al., 2009). O eugenol que pela denominação de Azambuja (2016) é um químico aromático muito versátil, presente também em óleo essencial de noz moscada (*Myristica fragrans*), e apresenta um importante efeito antibacteriano e antifúngico, pois mostra-se ativo contra *Escherichia Coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e vários outros agentes patogênicos.

O óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) de acordo com Azambuja (2016) tem uma composição majoritária em timol numa concentração entre 45 a 50%, substância com um significado potencial antisséptico, sendo utilizado para inibir proliferação de microrganismos, e que juntamente com sua composição de carvacol denominado um poderoso antimicrobiano, pois além de eliminar diversos tipos de fungos e bactérias, apresenta eficácia mesmo em baixas concentrações (0,07%).

Segundo o mesmo autor, o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*), é um líquido de coloração amarelo-escuro, rico em cerca de 80% de carvacol, fenol também presente em óleo essencial de tomilho que demonstra alta ação antimicrobiana. Além deste, obviamente o óleo de orégano ainda contém vários outros elementos, como o próprio timol, y-terpeno, p-ameno e outros, cuja sinergia resulta numa poderosa estabilidade, com atividade antioxidante e antimicrobiana.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), é uma planta da família Lamiaceae. A composição química pode apresentar variação devido a fatores ambientais e de manejo das plantas bem como da forma de extração e armazenamento, interferindo em sua atividade antimicrobiana (NASCIMENTO et al., 2007).

O limão (*Citrus limon*) em sua forma de óleo essencial tem como constituinte majoritário o d-limoneno (65-70%), um monoterpeneo muito versátil que vem sendo explorado pelos mais diversos ramos da indústria. Os álcoois, como linalol, geraniol, citronelol, etc, encontram-se, em parte, sob forma de ésteres (acéticos, láuricos, cápricos), alguns destes com ação antimicrobiana (AZAMBUJA, 2016).

O óleo essencial louro (*Laurus nobilis*), quando extraído contém concentrações dos fenóis conhecidos como eugenol e cineol, estes sendo responsáveis pela ação antioxidante e antimicrobiana do óleo, efeitos que são muito procurados pelo consumidor e indústrias de diversos ramos (AZAMBUJA, 2016).

O anis estrelado (*Illicium verum*) apresenta inúmeras atividades biológica, reflexos da sua diversidade química, que entre os componentes que se destacam em sua composição é o anetol (FREIRE, 2008).

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), em composição de óleo contém componentes majoritários determinados hidrocarbonetos sesquiterpênicos, tais como: ar-curcumeno, alfa-zingibereno, beta-bisaboleno e beta-sesquifelandreno que de acordo com Magalhães et al. (1997) demonstram ação antimicrobiana.

O óleo essencial de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) possui linalol, o constituinte majoritário do óleo de manjeriço, tem sido largamente usado como composto de partida para várias sínteses importantes, como a do acetato de linalila, e testado como acaricida, bactericida e fungicida (RADÜNZ, 2004).

Produzir filmes biodegradáveis a base de amido de mandioca contendo soluções dos óleos essenciais que demonstraram eficiência como inibidores do crescimento de bolores termorresistentes, para aplicação como embalagem ativa em produtos industrializados a base de tomates.

Material e Métodos

Amostragem

Inúmeras amostras foram coletadas em uma empresa processadora de produtos à base de tomates da região de Matão SP. Foram retiradas amostras de várias fases de processamento do molho de tomate e seus derivados, desde a matéria-prima até o produto final (tomates retirados antes da etapa de pré-lavagem; água do tanque de lavagem sem adição de cloro; antes da pasteurização; após o envase; durante a vida de prateleira).

Isolamento e identificação dos fungos filamentosos termorresistentes

Foi utilizado o método de detecção baseado em Splittstoesser (1976). As amostras (100 mL), receberam choque térmico a 70°C por 2 horas em banho de água termostático sob agitação e após foram resfriadas em banho de gelo. As amostras foram diluídas (10^{-1} e 10^{-2}) e plaqueadas por profundidade (triplicata) em meio Ágar Batata Dextrose (pH 5,6) preparado com 3% de

água adicionado com 50 mg/L de Rosa de Bengala e foram incubadas em BOD a 25 °C/5dias. Cada colônia desenvolvida foi isolada em outras placas de Petri contendo meio PDA (pH 5,6) em duplicata e incubadas em BOD a 30°C/5dias. Após, os bolores foram conservados sob refrigeração.

Aplicação dos choques térmicos para a seleção do isolado mais termorresistente

Para cada bolor isolado, foram utilizados tubos contendo 1,8 mL de molho de tomate (9,3 °Brix, pH 4,2) adicionados de 0,2 mL da suspensão de esporos ajustados a 10^5 esporos/mL, Estes foram submetidos a diferentes choques térmicos, variando de 80, 85 e 90°C/20 minutos (BAGLIONI; GUMERATO; MASSAGUER, 1999). Após foram resfriados em banho de gelo e o conteúdo total de cada tubo (2 mL) foi transferido para placas de Petri em meio PDA e incubadas a 30 °C por até 7 dias. O crescimento do fungo, após este período, foi um indicativo de resistência ao choque térmico.

Microrganismos isolados e Preparo do Inóculo

Os microrganismos isolados foram denominados: A', E' e M'. Foram adicionados 5 mL de água estéril em cada tubo e fez-se a raspagem para extração dos bolores com o uso de uma alça de platina.

Óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados foram obtidos junto ao comércio. Foram utilizados os óleos essenciais de: tomilho, cravo, noz moscada, alecrim, limão, gengibre, orégano, anis estrelado, louro e manjerição. O preparo das soluções dos óleos essenciais foi realizado de acordo com Yamashita (2006) e Soares (2002), com as diluições de 2%, 4% e 8%.

Antibiograma

Para a determinação da susceptibilidade antimicrobiana frente às concentrações dos óleos essenciais foi utilizado o método da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através da técnica de difusão em poços, conforme metodologia adaptada de Kruger (2006) com incubação a 25°C e avaliação após 2 a 4 dias.

Preparo do filme de amido

Os filmes biodegradáveis a base de amido, foram elaborados de acordo com Yamashita (2006) e Soares (2002) nas concentrações de 4 e 8%. Para a produção foram preparadas soluções filmogênicas com amido de mandioca, glicerol como plastificante, óleo essencial como conservador e água como solvente. Para a avaliação da ação antimicrobiana dos óleos essenciais incorporados ao biofilme de amido foi utilizado o método de difusão de discos (halo)

de acordo com Appendini (2002), mantidos em temperatura ambiente (22°C a 25 °C) e avaliados após 2 e 4 dias.

Resultados e Discussões

Isolamento das cepas dos possíveis bolores termorresistentes

As amostras foram coletadas em sacos plásticos assépticos em uma empresa processadora de produtos à base de tomates da região de Matão/SP e transportadas sob refrigeração em caixas de isopor com gelo, ao laboratório de Biologia e Microbiologia do IFSP- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo, campus Matão.

Foram isoladas treze cepas de bolores das amostras, como mostra a Tabela 1. Pode-se observar pela Tabela 1 que a maior quantidade de bolores isolados foram os das etapas antes da pré-lavagem, da água do tanque de lavagem e do produto antes da pasteurização. As amostras dos produtos, após o envase e durante a vida de prateleira não foram isolados bolores, fato este que se deve ao tratamento térmico recebido.

Tabela 1: Bolores isolados de várias etapas do processo de molho de tomate

Etapas	Bolores isolados
Tomates retirados antes da etapa de pré-lavagem	12
Água do tanque de lavagem sem adição de cloro	9
Produto antes da pasteurização	9
Produto após o envase	0
Produto durante a vida de prateleira	0

Fonte: elaborado pelo autor.

O mesmo foi observado por Baglioni (1998), que encontrou no seu trabalho bolores termorresistentes em maiores quantidades nas etapas de pré-lavagem e na matéria-prima, evidenciando que a maior quantidade de bolores, são realmente encontrados nas amostras antes da pasteurização.

Em pesquisa realizada por Salomão (2002) em processamento de néctar de maçã, foram encontrados termorresistentes em todas as etapas da produção, o que não foi observado neste trabalho. O mesmo foi observado em néctar de laranja e uva processados por Gomes (2016) e Ferreira (2009) em néctar e suco integral de abacaxi, evidenciando que esses bolores teriam sobrevivido a todas as etapas anteriores, ou seja, que estes estariam em toda a linha de processo do suco integral e néctar de abacaxi.

Aplicação dos choques térmicos para a seleção do isolado mais termorresistente

Para selecionar os bolores mais termorresistentes, após os choques térmicos de 80, 85 e 90°C/20 minutos, o crescimento dos bolores, após o período de 5 dias a temperatura de 30°C, foi um indicativo de resistência ao choque térmico. Após todas as análises realizadas foi possível isolar três bolores considerados termorresistentes.

A resistência térmica de bolores também foi observada em trabalhos envolvendo polpa e suco de morango e, também, néctar de maçã e suco de abacaxi. Segundo Salomão (2002) isolados de néctar de maçã conseguiram sobreviver a temperaturas de até 95°C/20 minutos. Polpas comerciais de morango e suco de morango preservado e pasteurizado também foram observados bolores com tal resistência. Ambos pertencentes ao gênero *N. fischeri* e *B. fulva*.

Em pesquisa realizada por Ferreira (2009) identificou-se a presença de *B. nivea* em suco de abacaxi com resistência térmica em diferentes temperaturas, sendo a eliminação total do bolor a 90°C/15 minutos. Nos isolados de néctar de laranja e uva de Gomes (2016) bolores do gênero *N. fischeri* foram encontrados após tratamentos de 80°C/30 minutos.

Antibiograma de óleos essenciais

A Tabela 2 apresenta os resultados para o halo de inibição do bolor A', E' e M' em relação aos óleos de cravo, tomilho, noz moscada e orégano após 4 dias.

Os óleos essenciais que apresentaram efeito fungicidas frente ao bolor A', após 4 dias de incubação, foram os de cravo, tomilho e noz moscada, tendo um maior halo de inibição na concentração de 8%. O óleo essencial de orégano não apresentou ação antimicrobiana em nenhuma de suas concentrações frente ao bolor A'.

Tabela 2: Resultados do halo de inibição do bolor A', E' e M' frente aos óleos de cravo, tomilho, noz moscada e orégano em concentrações de 2%, 4% e 8%

Óleos Essenciais	Concentração	Halo de inibição (cm)		
		A'	E'	M'
Cravo	2%	0,7	0,1	0,2
	4%	1,0	1,5	0,4
	8%	1,2	1,5	0,6
Tomilho	2%	0,1	-	-
	4%	0,2	0,2	-
	8%	0,3	0,75	-
Noz	2%	-	-	-
	4%	0,1	-	-
Moscada	8%	0,2	-	-
	2%	-	0,2	-
Orégano	4%	-	0,4	-
	8%	-	0,75	-

Para o bolor E', os óleos essenciais que apresentaram ação inibitória foram os de cravo, tomilho e orégano demonstrando maior eficiência em concentração de 8%, sendo que o óleo essencial de cravo demonstrou 50% mais eficiência frente ao óleo essencial de tomilho e de orégano. Para o bolor M' o único óleo essencial que demonstrou ação fungicida foi o óleo essencial de cravo.

O óleo essencial de cravo foi o único agente natural de inibição que obteve eficiência em sua ação fungicida frente aos três bolores termorresistentes em estudo, efeito esse devido provavelmente a alta concentração de eugenol (83,7%) em relação aos outros óleos, como observado por SCHERER et al. (2009).

Os demais óleos citados (gengibre, louro, anis estrelado, alecrim, manjerição e limão) não apresentaram resultados eficientes frente aos bolores pesquisados, tais óleos como limão gengibre não apresentaram quaisquer efeitos de formação de halos, já os de manjerição alecrim, anis estrelado e louro apresentaram halos com pouca inibição, nos quais não eram mantidos ao decorrer do tempo.

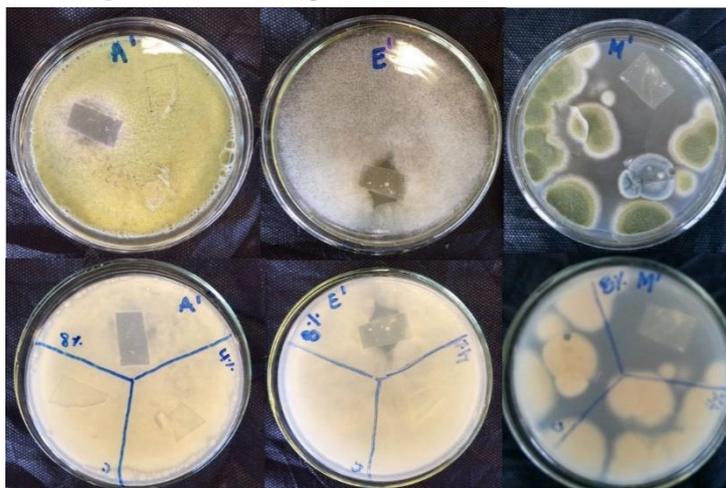
De acordo com os resultados obtidos da eficiência antifúngica do óleo essencial de cravo frente a todos os bolores estudados foi realizado um biofilme à base de amido nas concentrações de 4% e 8%. Pode-se observar uma menor ação fungicida do óleo essencial de cravo quando adicionado no biofilme, devido provavelmente a menor mobilidade do meio, o que diminuiu o seu poder de inibição frente aos bolores estudados.

Antibiograma do filme de amido de mandioca

De acordo com os resultados da eficiência antifúngica do óleo essencial de cravo frente a todos os bolores estudados, foi realizado um biofilme à base de amido em suas concentrações de maior eficiência, ou seja, 4% e 8%.

A Figura 1 mostra a eficiência do biofilme adicionado de óleo essencial de cravo nas concentrações de 4 e 8% frente aos três bolores (A', E' e M'). Pode-se observar que a ação fungicida do óleo essencial de cravo, quando adicionado em um biofilme, teve uma menor ação inibitória frente aos bolores. Comparando os biofilmes com a adição direta do óleo no ágar, pode-se observar que a adição direta, foi mais eficiente, com a hipótese de que em filme o óleo não esteja móvel como em sua forma em solução de óleo, fase que permite que a ação antimicrobiana dos óleos seja mais presente.

Figura 1: Antibiograma do biofilme de amido



Fonte: elaborada pela autora.

Conclusão

Foi possível isolar três bolores termorresistentes a temperaturas de 80, 85 e 90°C. Dentre os óleos estudados frente a inibição dos bolores termorresistentes isolados da produção de polpa de tomate, apenas o óleo essencial de cravo foi eficiente frente aos três bolores estudados. O óleo essencial de tomilho foi eficiente frente aos bolores A' e E', o óleo essencial de orégano frente ao bolor E' e o de noz moscada frente ao bolor A'. A concentração de 8% foi a mais eficiente comparada com as concentrações de 4 e 2% para todos os óleos essenciais de cravo, tomilho, orégano e noz moscada. Os óleos essenciais de gengibre, louro, alecrim, anis estrelado, limão e manjerição não apresentaram ação fungicida frente aos bolores estudados. Na solução filmogênica, o óleo essencial de cravo com a concentração de 8% foi o que teve maior inibição. Assim, pode-se afirmar que o óleo essencial de cravo é um bom agente inibidor para uso em embalagens ativas, para produtos susceptíveis a contaminações por bolores termorresistentes.

Referências

- ALONSO JUNIOR, R. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones. SRL, 1998. 1039 p.
- ANDRADE, C.T. et al. "Redução da Hidrofilicidade de Filmes Biodegradáveis à Base de Amido por meio de Polimerização por Plasma" **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 14, nº 1, p. 57-62, 2004.

APPENDINI, P. Review of antimicrobial food packaging. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 3, 2002.

AZEREDO, H. M. C. (2009). Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*, 42, 1240-1253.

AZAMBUJA, W. **Método de extração de óleos essenciais**. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/>>. Acesso em: 6 nov. 2016.

BAGLIONI, F. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada asépticamente. Campinas, 1998, 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BAGLIONI F.; GUMERATO, H. F.; MASSAGUER P. R. Estudo da ocorrência de fungos filamentosos termorresistentes em polpa de tomate envasada asépticamente. Campinas, 1999, 94p. Tese de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

BENGTSSON, M.; KOCH, K.; GATENHOLM, P. Surface octanoylation of high-amylose potato starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, p. 1-11, 2003.

BRODY, A. L. **Action in active and intelligent packaging**. *Food Technology*. Chicago, v. 56, n. 2, p. 70-71, Feb. 2002.

BULLERMAN, L. B.; LIEU, Y.; SIER, S.A. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. **J. Food Sci.** v.46, p.1107- 1109, 1977.

CLEMENTE, F. M. V. T. (Ed.). **árvore do conhecimento**. 2013. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tomate/Abertura.html>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Tomate para processamento industrial. Brasília, 2000.

FECHINE, G. J. M. **Polímeros Biodegradáveis: Tipos, Mecanismos, normas e mercado mundial**. São Paulo: Mackenzie, 2013.

FERREIRA, E. H. R. Avaliação da barorresistência e da termorresistência de *Byssochlamys nivea* em néctar e suco integral de abacaxi. Rio de Janeiro, 2009, 148p. Tese de Doutorado – Faculdade de química, UFRJ.

FREIRE, J. M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus***

flavus e Aspergillus parasiticus. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

GAVA, A. J. et al. Microrganismos de importância em alimentos. In: GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. Cap. 2, p. 87.

GOMES, V. L. H. Isolamento de fungos termorresistentes em néctares comerciais industrializados de laranja e uva na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rio de Janeiro, 2016, 71p. Tese de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ.

HOCKING, A.D.; PITT J.I. **Fungi and Food Spoilage**. Sydney: Academic Press, p. 413, 1985.

JORGE, N. Função das embalagens. In: JORGE, Neuza. **Embalagens para alimentos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2013. Cap. 13. p. 19-21.

MAGALHÃES, M. T. et al. Gengibre (*zingiber officinale roscoe*) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. parte 2 - secagem, óleo essencial e oleoresina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.132-136, ago. 1997.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. A.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JUNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Antimicrobial activity of the essentials oils: a multifactor approach of the methods. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

RADÜNZ L. L. 2004. Efeito da temperatura do ar de secagem no teor e na composição dos óleos essenciais de guaco (*Mikania glomerata Sprengel*) e hortelã-comum (*Mentha x villosa Huds*). 2004. Viçosa: UFV. 90p (Tese doutorado).

ROUBACH, R. et al. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). **Aquaculture Research**, v.36, n.11, p.1056-61, 2005.

SALOMÃO, B. C. M. Isolamento, identificação e estudo da resistência térmica de fungos filamentosos termorresistentes em produtos de frutas. Florianópolis, 2002, 99p. Tese de pós-graduação – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UFSC.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, 2004. 1102 p.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, 2003.

- SIQUI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F.S. Óleos essenciais – potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, São Paulo, v.16, p.38-43, 2000.
- SOARES, N. F. F. Embalagens ativas. **Revista Nacional da Carne**, Curitiba, ano 26, n. 305, jul. 2002.
- SOARES, N. F. F. - Novos desenvolvimentos e aplicações em embalagens de alimentos – **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 9, 2009.
- SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.442-449, 2009.
- SPLITTSTOESSER, D. F. Enumeration of heat resistant mold (*Byssoschlamys*). In: Compendium of methods for the Microbiology. Exam. of Foods. Am. Public. Health Assoc, p. 230-234, 1976.
- SPLITTSTOESSER, D. F. Fungi of importance in processed fruits. In: ARORA, D. K.; MUKERJI, K. G.; MARTH, E. H. (Eds.) **Handbook of Applied Mycologi – Foods and Feeds**. New York: Marcel Dekker Inc., V 3, Cap 7, p. 201-219, 1991.
- SPLITTSTOESSER, D.F.; NIELSEN, P.V.; CHUREY, J.J. Detection of viable ascospores of *Neosartorya fischeri*. *Journal of Food Protection*, v.56, p.599-603, 1993.
- TOURNAS, V. Heat resistant fungi of importance to the food and beverage industry. **Crit. Rev. Microbiol**, Boca Raton, v. 20, n. 4, p. 243-263, 1994.
- VENTURINI, A.C.; CONTRERAS, C.J.C.; SARANTÓPOULOS, C.I.G.L.; FELÍCIO, “Embalagens ativas para carnes”. **Revista Nacional da Carne**, n. 318, 2003.
- YAMASHITA, F. et al. Filmes Biodegradáveis para Aplicação em Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas. **Brazilian Journal of Food Technology**. v.8, n.4, 2005.