Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz'

Microencapsulação do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides)*: atividade antifúngica *in vitro* e sua influência sobre a vida útil de fatias de pão sem glúten

Juliana Scabello Prando Zambianco

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2020

Juliana Scabello Prando Zambianco
Bacharel em Ciências dos Alimentos

Microencapsulação do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides)*: atividade antifúngica *in vitro* e sua influência sobre a vida útil de fatias de pão sem glúten

Orientadora:
Prof. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

Dissertação apresentada para a obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Zambianco, Juliana Scabello Prando

Microencapsulação do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides*): atividade antifúngica *in vitro* e sua influência sobre a vida útil de fatias de pão sem glúten / Juliana Scabello Prando Zambianco. - - Piracicaba, 2020.

77 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Lippia sidoides* 2. *Aspergillus niger* 3. Conservantes naturais 4. Spray drying 5. Exposição aos voláteis I. Título

Dedico esse trabalho ao meu pai Donizeti (in memoriam), minha maior inspiração. Para sempre em meu coração e em minhas orações.

AGRADECIMENTOS

Sou primeiramente grata a Deus por todas as bênçãos e oportunidades oferecidas ao longo da vida e também por me fortalecer em todos os momentos difíceis. Ao meu marido Wilson, não somente pelo apoio emocional ao longo desses dois anos como também por todas as dicas, orientações, por me acompanhar nas leituras de placas nos finais de semana/feriados e ainda, pela ajuda com os dados estatísticos. Aos meus pais, irmãos e cunhados por me apoiarem em todas as minhas escolhas, por todo o amor e orações para que tudo corresse bem.

Agradeço à minha orientadora Thais M. F. S. Vieira, por ter me recebido como sua orientanda, pela atenção e pelas valiosas contribuições ao meu trabalho.

Agradeço aos membros da banca. Ao Dr. Eduardo M. da Glória por todo o auxilio, prontidão e por todos os ensinamentos em microbiologia e óleos essenciais. À Dra. Izabela Dutra Alvim, pela atenção, pelas sugestões, por auxiliar na produção das micropartículas e nos esclarecimentos relacionados ao tema. À Dra. Jacqueline Oliveira pelas contribuições que permitiram que esse trabalho se tornasse mais completo.

Agradeço ao Gustavo da empresa Quinoa, pelo interesse em meu projeto e por ceder gentilmente os pães para a realização das análises.

Agradeço ao Prof. Stanislau B. Junior pela sua colaboração na realização das análises cromatográficas.

Agradeço à Escola Superior de Agricultura ‘Luiz de Queiroz’ (ESALQ/USP) e aos seus professores pelo ensino de ponta e por todo o aprendizado que obtive desde a graduação. Aos funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, em especial à Regina (secretaria) e aos técnicos: Luis Felipe, Rose, Mariana, Amabile e Denise, por toda disponibilidade e prestreza.

Agradeço a todos os amigos e colegas, tanto do laboratório quanto dos grupos de pesquisa (ESALQFood, GETEP, GEFH, Micotoxinas) pelo convívio e pela troca de experiências. Difícil citar todos os nomes, mas gostaria de agradecer especialmente à Samara, Paula, Renata, Marina, Anaíle, Paula Porrelli, Daniel, Júlia e todos aqueles que de uma forma ou outra eu pude contar e que contribuíram para a conclusão desse trabalho. Muito obrigada a todos.

SUMÁRIO

RESUMO.....7
ABSTRACT 8
LISTA DE FIGURAS 9
LISTA DE TABELAS 10
1. INTRODUÇÃO GERAL 11
2. OBJETIVOS 15
2.1. Objetivo principal 15
2.2. Objetivos secundários.....15
3. REVISÃO 17
3.1. Pão 17
3.1.1. Controle de qualidade em produtos de panificação 18
3.2. Óleos essenciais.....19
3.2.1. Encapsulação de óleos essenciais.....22
3.2.2. Óleo essencial de alecrim pimenta (Lippia sidoides).....24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....27
4.1. Material.....27
4.2. Isolamento e identificação molecular de A. niger.....27
4.3. Microencapsulação do óleo essencial de L. sidoides 29
4.3.1. Preparo da emulsão.....29
4.3.2. Secagem por spray drying 29
4.4. Caracterização das micropartículas.....30
4.4.1. Rendimento.....30
4.4.2. Teor de umidade 30
4.4.3. Retenção de óleo nas micropartículas 31
4.4.4. Eficiência de encapsulação (EE).....31
4.4.5. Distribuição e tamanho das micropartículas.....32
4.5. Identificação e semi-quantificação dos compostos voláteis por CG/MS e CG/FID.....32
4.6. Atividade antifúngica in vitro 33
4.6.1. Método por diluição em ágar.....33
4.6.2. Método por exposição aos voláteis 33

4.6.3. Preparo do inóculo 34
4.6.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Porcentagem de Inibição 34
4.7. Atividade inibitória do desenvolvimento fúngico em fatias de pão contidas em embalagens, através da exposição aos voláteis do óleo essencial de L. sidoides livre e suas micropartículas 35
4.7.1. Elaboração e caracterização dos pães 35
4.7.2. Exposição das fatias de pão aos compostos voláteis 36
4.8. Influência sensorial do óleo essencial livre e encapsulado 37
4.9. Análise estatística 37
5. RESULTADOS 39
5.1. Caracterização das micropartículas 39
5.1.1. Distribuição de tamanho das micropartículas 40
5.2. Composição química dos óleos essenciais 43
5.3. Atividade antifúngica in vitro 46
5.3.1. Atividade inibitória in vitro do óleo essencial 46
5.3.2. Atividade inibitória in vitro das micropartículas 48
5.4. Atividade inibitória do desenvolvimento fúngico em fatias de pão contidas em embalagens, através da exposição aos voláteis do OE de L. sidoides livre e microencapsulado 51
5.4.1. Caracterização dos pães 51
5.4.2. Atividade antifúngica do óleo essencial livre e encapsulado nos pães 53
5.5. Influência sensorial do óleo essencial livre e encapsulado 55
6. DISCUSSÃO 59
6.1. Efeito inibitório da exposição aos voláteis do OE de L. sidoides sobre o crescimento fúngico em pães 59
6.2. Influência da microencapsulação sobre o efeito inibitório do OE de L. sidoides nas fatias de pão 61
7. CONCLUSÃO 63
REFERÊNCIAS 65

RESUMO

Microencapsulação do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides)*: atividade antifúngica *in vitro* e sua influência sobre a vida útil de fatias de pão sem glúten

A demanda por alimentos naturais tem despertado o interesse por parte das indústrias em repensar formulações de alimentos já existentes no mercado. Na indústria de panificação, os maiores desafios são a deterioração por bolores e a busca por alternativas naturais ao uso de conservantes sintéticos. Estudos recentes têm demonstrado resultados positivos com a utilização de óleos essenciais na ação antifúngica de espécies deteriorantes em pães. Nota-se ainda que a utilização de óleos essenciais encapsulados e por difusão dos voláteis nas embalagens pode ser uma interessante saída para a conservação dos compostos bioativos presentes nos óleos, minimizando sua influência nas propriedades organolépticas de pães. O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides)* microencapsulado e sua influência sobre a vida útil de pães, através da liberação de seus compostos voláteis dentro das embalagens. O processo de microencapsulação por *spray drying* ocorreu utilizando-se diferentes materiais de parede (goma arábica e maltodextrina:amido modificado) e posteriormente obteve-se a caracterização das micropartículas. Ainda, a composição química do óleo essencial livre e do recuperado das micropartículas foi obtida por cromatografia gasosa (CG/MS e CG/FID). Foram realizados testes *in vitro* por diluição em ágar e exposição aos voláteis do óleo essencial e encapsulado, de modo a determinar a concentração inibitória mínima (CIM) frente à espécie *A. niger*, previamente isolada e identificada. A ocorrência de crescimento fúngico em fatias de pão, expostas aos voláteis do óleo essencial e das micropartículas, também foi verificada. Ao final, uma análise sensorial dos pães foi realizada, a fim de verificar a influência dos compostos bioativos sobre as propriedades organolépticas dos pães avaliados. A atividade antifúngica *in vitro* avaliada por diluição em ágar mostrou que o óleo essencial apresentou resultados inferiores à exposição aos voláteis, o que é supostamente explicado pela baixa diluição do óleo no meio de cultura. Em contrapartida, no método de exposição aos voláteis as micropartículas do óleo essencial de *L. sidoides* apresentaram efeito inibitório *in vitro* superior ao encontrado no óleo essencial livre. Não houve efeito significativo do material de parede sobre a composição química do óleo essencial. Quando aplicadas nas embalagens de pão, as micropartículas apresentaram efeito inibitório inferior ao óleo essencial livre. No entanto, as micropartículas apresentaram menor impacto sensorial quando comparado ao óleo livre, indicando que a estratégia de encapsulação pode ser promissora. Com estudos futuros de otimização do material encapsulado quanto à formulação (quantidade de óleo, material de parede, estudo de liberação dos compostos na embalagem) pode-se obter um material eficiente na preservação do produto.

Palavras-chave: *Lippia sidoides*, *Aspergillus niger*, Conservantes naturais, Spray drying, Exposição aos voláteis

ABSTRACT

Microencapsulation of rosemary pepper (*Lippia sidoides)* essential oil: *in vitro* antifungal activity and its influence on the shelf life of gluten-free bread slices

The demand for natural and sustainable foods has sparked the interest on the part of the industries in rethinking food formulations already existing in the market. In the bakery industry, one of the current challenges is directly related to the mold deterioration. In view of these reports, the current challenge for the bakery industry is to find ways to replace synthetic preservatives with natural conservation alternatives. Recent studies have shown positive results with the use of essential oils in the antifungal activity against deteriorating species in breads. It is also noted that the use of encapsulated essential oils and by diffusion of volatile compounds in packaging can be an interesting way to preserve the bioactive compounds present in the oils and also to minimize their interference in the organoleptic properties of breads. The present study has as main objective to evaluate the antifungal potential of the microencapsulated *Lippia sidoides* essential oil and its influence on the shelf life of breads, through the release of its volatile compounds inside the packages. The microencapsulation process by spray drying took place using different wall materials (gum arabic and maltodextrin: modified starch), and subsequently the characterization of the microparticles was obtained. Also, the chemical composition of the free essential oil and the oil recovered from the microparticles was obtained by gas chromatography (CG / MS and CG / FID). *In vitro* tests were performed by agar dilution and exposure to volatiles of the essential oil and its microparticles, in order to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against the species A. niger, previously isolated and identified. The occurrence of fungal growth in slices of bread, exposed to the volatiles of essential oil and microparticles, was also verified. At the end, a sensory analysis of the bread was performed in order to verify the influence of bioactive compounds on the organoleptic properties of the breads evaluated. The *in vitro* antifungal activity evaluated by agar dilution showed that the essential oil presented lower results than those observed for volatile exposure, which is supposedly explained by the low dilution of the oil in the culture medium. On the other hand, in the method of exposure to volatiles, the microparticles had an inhibitory effect *in vitro* superior to that found in the free essential oil. There was no significant difference between the chemical composition of the evaluated wall materials, and both had a similar composition compared to the free essential oil. When applied to bread packaging, microparticles showed only a slight inhibitory effect, while treatment with free essential oil showed greater antifungal activity. Despite the lower performance of microencapsulated oil in growth inhibition, it had less sensory impact on bread when compared to free oil, indicating that the encapsulation strategy can be promising for bread preservation. With further studies of optimization of the encapsulated material in terms of formulation (quantity of oil, wall material, study of the release of the compounds in the packaging), an efficient material for the preservation of the product can be obtained.

Keywords: *Lippia sidoides*, *Aspergillus niger*, Natural preservatives, Spray drying, Volatile exposure

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Presença de colônias de fungos na superfície de pães armazenados a 18 °C (A) e a 28 °C (B) após 7 dias de armazenamento. 28

Figura 2. *A. niger* após isolamento direto dos pães. 28

Figura 3. Esquema da secagem por *spray dryer* para obtenção das micropartículas. 30

Figura 4. Ilustração das placas submetidas às diferentes metodologias de atividade antifúngica *in vitro*. 34

Figura 5. Recipiente com fatias de pães submetidas ao tratamento com OE livre pelo período de 7 dias. 37

Figura 6. Gráficos de dispersão representando o diâmetro das partículas (eixo x) e os volumes de diâmetro em % (eixo y), sendo A) referente a GA e B) referente a MD:AM. 42

Figura 7. Relação de compostos majoritários identificados e semi-quantificados (% relativa da área) no OE de *L. sidoides* livre e nos óleos extraídos das micropartículas com goma arábica (GA) e com maltodextrina e amido modificado (MD:AM). 44

Figura 8. Crescimento micelial de *A. niger* aos 14 dias após incubação a 25 °C, em tratamentos de exposição ao OE de *L. sidoides* (200 µL/L) por diferentes métodos: DA (OE diluído em ágar); EV (OE por exposição aos voláteis); GA (micropartículas constituídas de goma arábica por exposição aos voláteis); MD:AM (micropartículas constituídas de maltodextrina e amido modificado por exposição aos voláteis). 49

Figura 9. Registro fotográfico das placas submetidas aos diferentes métodos e tratamentos após 14 dias em estufa a 25°C. 50

Figura 10. Crescimento fúngico visível ao sétimo dia (D7) de incubação a 25 °C das fatias de pão inoculadas com a espécie *A. niger* e expostas aos voláteis do OE de L. sidoides livre e encapsulado. 54

Figura 11. Crescimento fúngico ao sétimo dia (D7) de armazenamento das fatias de pão não inoculadas a 25 °C, submetidas aos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado. 55

Figura 12. Levantamento de atributos de aroma referentes às fatias de pão submetidas aos tratamentos com OE livre e micropartículas por 24h. 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de eficiência de processo das micropartículas produzidas pelos materiais de parede GA e MD:AM. 39

Tabela 2. Valores de diâmetro e de *span* na distribuição do tamanho de partículas em cada material de parede avaliado (GA e MD:AM)..... 41

Tabela 3. Caracterização química do OE de *L. sidoides* livre (OE) e extraído das micropartículas encapasuladas com goma arábica (GA) e com maltodextrina e amido modificado (MD:AM). 45

Tabela 4. Dados das análises *in vitro* para verificação da atividade antifúngica do OE de *L. sidoides* e de suas micropartículas por diferentes métodos, frente à espécie *A. niger* incubada a 25 °C por 14 dias..... 47

Tabela 5. Caracterização físico-química do pão de leite de castanhas artesanal sem glúten. 52

Tabela 6. Crescimento micelial e inibição do crescimento fúngico em fatias de pão incubados por 7 dia a 25 °C e expostas aos compostos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado. 54

Tabela 7. Potencial inibitório dos compostos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado sobre fatias de pão, inoculadas e não inoculadas, incubadas a 25 °C por 7 dias. 55

Tabela 8. Resultados médios do Teste de Diferença do Controle de acordo com cada atributo das fatias de pão submetidas a diferentes tratamentos pelo período de 24 horas. 56

1. INTRODUÇÃO GERAL

Têm-se observado evidências de que a população, cada vez mais, vem buscado consumir alimentos de qualidade, procurando por aqueles com apelo saudável e natural. Esses consumidores esperam ainda que a qualidade do alimento seja mantida no intervalo de tempo entre a compra e o consumo do produto adquirido. Tais exigências não remetem somente ao conceito de alimento seguro, mas também à necessidade de minimizar alterações indesejáveis em quesitos sensoriais (KILCAST & SUBRAMANIAM, 2000).

Essas observações revelam que há um nicho de mercado com potencial a ser explorado, considerando algumas das características apontadas como tendências do segmento de alimentos e bebidas. De acordo com dados divulgados pela Mintel (2017), empresa privada de pesquisa de mercado responsável pela divulgação de informações referentes ao mercado, destacam-se os seis seguintes tópicos como tendências globais em alimentos e bebidas nos últimos anos: (i) a valorização das receitas tradicionais em formulações, (ii) a valorização do tempo através da praticidade, (iii) a procura por alimentos funcionais no período noturno com apelo calmante, (iv) alimentos saudáveis com preços acessíveis a todas as classes econômicas, (v) produtos sustentáveis que evitem o desperdício de alimentos e por fim (vi) a valorização de ingredientes e alimentos naturais (à base de plantas).

Pesquisas têm relatado a valorização e o aumento do consumo de produtos "*clean label*" (*trad.* etiqueta limpa), cujo termo, de acordo com revisão realizada por Asioli et al. (2017), pode ser entendido a partir de três conceitos: (i) em relação ao cultivo e ao manejo do alimento e à importância dos orgânicos, (ii) em como o alimento foi produzido, tendo nessa categoria como pontos negativos o uso de conservantes, aromas e corantes artificiais e pontos positivos o uso de ingredientes naturais e por fim (iii) em relação aos benefícios que o produto final carrega consigo, em termos de sabor, saudabilidade e consciência ambiental.

Frente a tais desafios, nota-se a preocupação da indústria de alimentos em se manter atualizada e se situar dentro desse terreno de tendências de mercado, buscando alternativas através de pesquisas – tanto em desenvolvimento de novos produtos quanto em adaptação de produtos existentes –, que ao mesmo tempo não comprometam seu padrão de identidade e qualidade e ainda, seu *shelf life*.

Na indústria de panificação, as principais inovações desenvolvidas nos últimos anos se deram no âmbito da melhora do aporte nutricional de produtos a base de cereais, através da adição de ingredientes funcionais que possam reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (ESWARAN, MUIR & CHEY, 2013). Em paralelo, a deterioração por agentes microbianos sempre foi um grande desafio nesse setor, sendo a principal causa das

limitações de extensão do *shelf life* desses produtos (MARÍN et al., 2002). Tal fator limitante de qualidade é também a principal causa de desperdício e perdas econômicas na indústria de panificação (LEGAN, 1993).

A fim de contornar problemas de contaminação e deterioração por agentes microbianos em pães, a indústria tem feito uso constante e demasiado de conservantes sintéticos como o ácido sórbico e propiônico (YAO & XU, 2014). Contudo, sabe-se que atualmente há uma maior demanda por parte dos consumidores por alimentos mais saudáveis e, consequentemente, isentos de aditivos químicos (NIELSEN & RIOS, 2000).

Derivados de plantas, como os extratos vegetais e óleos essenciais, assim como a quitosana, lactoferrina, bactérias do ácido lático e leveduras antagônicas, têm cada vez mais se tornado relevantes alternativas para prevenção e controle da deterioração fúngica em alimentos. Tal afirmação é pautada no fato de que as substâncias bioativas possuem numerosos mecanismos de ação já elucidados e se destacam como possíveis substitutos dos conservantes sintéticos (RIBES, FUENTES, TALENS & BARAT, 2017).

Frente a esse cenário, os óleos essenciais demonstram ser uma interessante alternativa ao uso de conservantes sintéticos em alimentos. Estudos já realizados com óleos essenciais demonstram resultados positivos em relação às inibições de micro-organismos patogênicos e deteriorantes em alimentos. Dentre essa categoria, encontra-se o óleo essencial (OE) de alecrim pimenta (*L. sidoides*), rico em timol e carvacrol, importantes compostos antimicrobianos e, por esse motivo, já são utilizados tradicionalmente em soluções orais antissépticas, em produtos para aplicação em cortes cutâneos, picadas de insetos e outros tratamentos convencionais antimicrobianos (LEMOS et al, 1990).

Apesar de serem potentes antimicrobianos naturais, deve-se ressaltar que o uso de óleos essenciais como conservantes ainda é limitado devido às suas características de aroma e sabor e também pelo desconhecimento de sua estabilidade durante a vida de prateleira de produtos alimentícios diversos (LAMBERT, SKANDAMIS, COOTE & NYCHAS, 2001).

Para os desafios citados referentes a alterações sensoriais e estabilidade, a encapsulação de óleos essenciais surge como alternativa promissora, pois auxilia na proteção de compostos bioativos presentes, torna menos influente o aroma e sabor dos óleos essenciais incorporados em alimentos, além de possivelmente reduzir a dose mínima necessária para sua aplicação como antimicrobiano no alimento de interesse (RÉ, 1998). Alguns estudos foram realizados a fim de verificar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais encapsulados na indústria de panificação (OTONI et al., 2014; TEODORO et al., 2014), contudo se faz necessária uma maior investigação desses antifúngicos naturais em pães e outros produtos do setor por diferentes aplicações.

Dessa forma, nota-se que ainda há uma grande necessidade e espaço para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas à produção e conservação de produtos de panificação que mantenham suas características físico-químicas, sensoriais e nutricionais, proporcionando o máximo período de vida de prateleira, reduzindo o desperdício no mercado de panificação, perdas econômicas e atendendo ainda à demanda dos consumidores por ingredientes e formulações mais saudáveis e naturais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Avaliar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de *Lippia sidoides* livre e microencapsulado, assim como sua influência sobre a vida útil de fatias de pão sem glúten, através da liberação de compostos voláteis dentro da atmosfera interna das embalagens.

2.2. Objetivos secundários

a) Avaliar e selecionar o material de parede mais eficiente e viável para a microencapsulação do óleo essencial de *Lippia sidoides*.
b) Analisar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial e de suas micropartículas
c) Avaliar a influência do óleo essencial de *Lippia sidoides* e de suas micropartículas sobre o crescimento fúngico e a vida útil das fatias de pão.
d) Verificar a influência sensorial do óleo essencial de *Lippia sidoides* e de suas micropartículas nos pães submetidos às embalagens com os respectivos tratamentos.

3. REVISÃO

3.1. Pão

Segundo definição da ANVISA (BRASIL, 2005), pães “são os produtos obtidos da farinha de trigo e/ou outras farinhas, adicionados de líquido, resultantes do processo de fermentação ou não e cocção, podendo conter outros ingredientes, desde que não descaracterizem os produtos”.

O pão é um alimento consumido mundialmente e uma das mais importantes fontes de energia e nutrientes para o ser humano. De acordo com dados da Euromonitor International (EUROMONITOR, 2017), 133 milhões de toneladas de pães foram consumidas no mundo em 2016, perdendo somente para a categoria de produtos lácteos como produto mais consumido (em toneladas) mundialmente. Em relação à indústria de panificação no Brasil, a produção nacional de pães em 2018 atingiu o valor de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas, o que equivale a 26,5 bilhões de reais. Ainda, estima-se que o consumo o referente ano foi de 12 kg por habitante, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados (ABIMAP, 2019).

É também um alimento nutricionalmente importante na dieta da população, sendo constituído principalmente de carboidratos, proteínas, lipídeos e fibras alimentares (TACO, 2019). Contudo, é considerado um alimento altamente susceptível a alterações físico-químicas e principalmente microbiológicas, sendo facilmente deteriorado durante seu período de vida útil (CAUVAIN & YOUNG, 2007; HERAS-MOZOS et al., 2019).

A contaminação fúngica é o principal fator de qualidade em pães, sendo a principal causa de desperdício e perdas econômicas nesse setor, devido à rejeição por parte dos consumidores ao produto deteriorado (LEGAN, 1993). Na República Tcheca, os produtos de panificação representaram 28% do total de alimentos descartados entre os anos de 2013 e 2014, sendo na maioria deles fatias ou partes de pães (SOSNA, BRUNCLIKOVA & GALETA, 2019). Na Noruega, estima-se que o descarte de pães seja de 22 kg por habitante ao ano, perdendo somente para o descarte de frutas e vegetais e restos de alimentos já preparados (STENSGAARD & HANSSEN, 2016).

A inovação nesse setor e o desenvolvimento de pesquisas pautadas em novas tecnologias de conservação de pães são opções promissoras na tentativa de redução de desperdício de produtos de panificação e consequentemente, em menores perdas econômicas (SVANES, OESTERGAARD & HANSSEN, 2019).

3.1.1. Controle de qualidade em produtos de panificação

Os fatores que influenciam a determinação do *shelf life* de um alimento são divididos em fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, que são as propriedades finais do produto, podem ser descritos: atividade de água, pH, teor de oxigênio disponível, composição nutricional, potencial de oxidação, microflora natural e micro-organismos sobreviventes, presença de enzimas e substâncias reativas e a adição de conservantes na formulação. Em contrapartida, os fatores extrínsecos são aqueles determinados durante toda a cadeia, em que podemos citar: tempo e temperatura durante o processo, temperatura de estocagem e distribuição, umidade relativa, exposição à luz, contagem microbiana no ambiente, composição atmosférica dentro da embalagem e manipulação do consumidor (KILCAST & SUBRAMANIAM, 2000).

Em produtos de panificação e confeitaria, a deterioração microbiana, química (por rancidez) e física (por perda de umidade) são os fatores críticos mais frequentes. Entretanto, a ocorrência de deterioração microbiana por bolores é a causa mais frequente no comprometimento do *shelf life* desses produtos. (O'CONNOR-SHAW & REYES, 2000).

Durante o tempo de forneamento, ocorre a destruição dos possíveis bolores presentes na massa. Contudo, o maior problema se concentra na deposição de esporos provenientes do ar, de manipuladores e de equipamentos, durante o resfriamento e embalagem desses produtos, sujeitos à recontaminação e posterior crescimento, que se torna evidente durante o tempo de transporte e armazenamento (SOARES et al., 2002; CORNEA et al., 2011).

Em casos de contaminação e deterioração em pães, os gêneros mais frequentes são: *Penicillium, Aspergillus* e *Eurotium* (LEGAN, 1993). Ainda, Dagnas e et Al. (2014) relatam que as três espécies mais frequentes em produtos de panificação são: *Eurotium repens*, *P. corylophilum* e *A. niger*.

Não somente responsável pela aparência desagradável na superfície de produtos panificados, de acordo com Nielsen & Rios (2000), o crescimento de fungos propicia também um sabor indesejável (*off flavor*) e o possível crescimento de micotoxinas e compostos alergênicos, presentes mesmo de maneira não visível e nocivos à saúde.

Para o controle de crescimento microbiano em alimentos, as técnicas geralmente utilizadas são: secagem, congelamento, refrigeração, irradiação, embalagem em atmosfera modificada e a adição de sais e agentes antimicrobianos (KERRY et al., 2006). Na área de panificação, os métodos de conservação mais utilizados são a adição de conservantes à massa e a preservação dos produtos a baixas temperaturas. (PEREIRA et al., 2002).

Predominantes na indústria de alimentos atualmente, os conservantes sintéticos pertencem à categoria de Aditivos Alimentares, determinada pela ANVISA, e a presença

deles deve ser declarada em rotulagem. Dentre a lista de conservantes, os ácidos orgânicos como o propiônico, benzoico e o sórbico são aqueles utilizados para inibir o crescimento de micro-organismos em panificação (LEGAN, 1993). Supõe-se que o mecanismo de ação desses sais orgânicos esteja envolvido na redução do pH do alimento, inibindo assim o metabolismo de enzimas que promovem a glicólise (RUSSELL, 1992).

A Resolução nº 383, de 05 de agosto de 1999 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) aprova o uso de ácido sórbico, sorbato de sódio, sorbato de potássio, e sorbato de cálcio como aditivos conservantes em concentrações até no máximo 0,1g/100g de produto (BRASIL, 1999). Em paralelo, a FDA (*Food and Drugs Administration*) permite em seu regulamento sobre produtos de panificação o uso do fosfato de cálcio e propionato de cálcio na concentração de 0,75 g / 100 g de farinha na formulação (FDA, 2020).

Apesar dos conservantes sintéticos serem largamente utilizados na indústria de panificação, os consumidores atuais demandam um menor uso de aditivos químicos e, consequentemente, um menor uso de conservantes sintéticos (NIELSEN & RIOS, 2000). Portanto, em meio a tantas preocupações que cercam a indústria de alimentos frente à utilização de conservantes sintéticos em alimentos, há uma necessidade emergente em encontrar alternativas que atendam às demandas do consumidor. De acordo com Membre, Kubaczka, & Chene (2001), a indústria de panificação tem se empenhado em reduzir a quantidade de conservantes sintéticos, pensando em soluções naturais para a extensão do *shelf life* desses produtos, com ação semelhante aos conservantes sintéticos já utilizados.

Técnicas mais saudáveis e sustentáveis de conservação vêm sendo avaliadas como alternativa aos conservantes sintéticos em pães nas últimas décadas. Dentre elas, estudos envolvendo o uso de bactérias do ácido lático, peptídeos e derivados vegetais na forma de extratos e óleos essenciais mostram resultados positivos em relação às suas aplicações em produtos de panificação, os quais podem ser adicionados à formulação ou inseridos como filmes antimicrobianos em embalagens ativas (AXEL, ZANNINI & ARENDT, 2017). Dentre tais inovações em conservantes naturais, destacam-se os óleos essenciais aplicados na preservação de pães frente às contaminações fúngicas nesse tipo de produto, sendo comprovado o seu mecanismo de ação sobre micro-organismos deteriorantes em pães (DEBONNE et al., 2018).

3.2. Óleos essenciais

De acordo com o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes da ANVISA (BRASIL, 2007), óleos essenciais “são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou

outro método adequado)", os quais podem ser comercializados isolados ou misturados entre si, nas formas retificada (destilação fracionada para concentração de compostos), concentrada (parcialmente desterpenada) e desterpenada (retirada quase que total do teor de terpenos).

Os óleos essenciais são obtidos a partir da utilização de plantas aromáticas inteiras ou de suas partes (folhas, flores, brotos, sementes, frutos, raízes, madeira ou casca) que são colhidas durante os estágios específicos de maturação da planta e armazenadas sob condições controladas de luz, temperatura e umidade (FRANZ & NOVAK, 2010). Diversos são os métodos de extração dos óleos essenciais, os quais podem ser classificados entre métodos convencionais como hidrodestilação, arraste a vapor, por solvente orgânico e prensagem a frio. Ainda, novos métodos têm sido verificados a fim de reduzir o consumo de energia, de solventes e a emissão de CO_2, como por exemplo, a extração em fluido supercrítico, por ultrassom e por micro-ondas (ASBAHANI et al., 2015).

Quanto à sua composição química, óleos essenciais são caracterizados pela presença de hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros compostos minoritários (SIMÕES et al., 2004). O óleo essencial é uma substância de alta complexidade e, dependendo do período de colheita e do método de extração, um óleo essencial pode conter até aproximadamente 100 compostos bioativos diferentes, sendo majoritariamente constituído de terpenos e terpenóides (isoprenóides) (TAJKARIMI, IBRAHIM & CLIVER, 2010), seguido de compostos aromáticos e alifáticos. Os monoterpenos, como o timol e carvacrol, são formados a partir da ligação de duas unidades de isoprenóides (C10) e representam 90% dos compostos bioativos presentes nos óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008).

A Comissão Européia autoriza a utilização de tais componentes de óleos essenciais como aromatizantes em alimentos, não representando risco à saúde do consumidor. Dentre eles, encontram-se: carvacrol, carvona, limoneno, mentol e timol (BURT, 2004). Óleos essenciais como os de alecrim, tomilho, orégano, hortelã-pimenta, entre outros são considerados seguros pela FDA, pertencendo à lista GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e podendo ser utilizados como ingredientes em alimentos (FDA, 2019).

Tão vastas quanto à quantidade de compostos presentes, inúmeras são também as propriedades dos óleos essenciais, podendo conferir ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antiviral, antimutagênica, antiprotozoária e anti-inflamatória (DIMA & DIMA, 2015). As propriedades antimicrobianas relatadas podem ser na maioria das vezes explicadas pela citotoxicidade dos óleos essenciais que, devido à sua característica lipofílica, são capazes de atravessar a parede celular e a membrana plasmática, romper estruturas de polissacarídeos e ácidos graxos, provocando danos irreversíveis na membrana celular dos micro-organismos (ULTEE et al., 2002). Bakkali e et. al (2008) ainda

ressaltam serem mais interessantes estudos que avaliem o óleo essencial em si e todos seus constituintes presentes, ao invés de avaliar apenas um composto bioativo isoladamente, considerando relevante a sinergia entre as substâncias presentes no óleo essencial frente às propriedades apresentadas.

De acordo com Lopez-Malo et al. (2007), os óleos essenciais possuem a vantagem de serem bioativos na fase gasosa, o que os torna atrativos para serem utilizados como conservantes durante o tempo de estocagem dos produtos. Sua atividade antimicrobiana geralmente está relacionada às estruturas químicas de seus compostos, da dosagem utilizada, assim como das interações que possam ocorrer no meio em que se encontra. Ainda, devido à ampla variedade de compostos presentes nos óleos essenciais, esses possuem certa vantagem em relação a outros conservantes, pois podem agir sobre diferentes gêneros de fungos, não permitindo que esses patógenos desenvolvam resistência (CABRAL et al., 2013).

A ampla ação antimicrobiana dos óleos essenciais vem sendo comprovada em inúmeros estudos. O óleo essencial das folhas de Curcuma (*Curcuma caesia* Roxb.) apresentou relevante potencial antibacteriano, frente às espécies *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*, e potencial antifúngico, frente às espécies *A. fumigatus*, *A. niger*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*, demonstrando ser um antimicrobiano natural em potencial para a indústria farmacêutica e alimentícia (BORAH et al., 2019). Frente diferentes espécies dos gêneros *Aspergillus, Penicillium* e à espécie *Trichoderma viride*, o óleo essencial extraído do fruto da árvore Pau D'Alho (*Gallesia integrifolia*) demonstrou alta atividade fungicida em concentrações mínimas (RAIMUNDO et al., 2018).

Em alimentos, de maneira específica em panificação, a aplicação de antifúngicos naturais é um tema de extrema relevância e alguns estudos vêm sendo realizados a fim de utilizá-los como alternativa ao uso convencional de conservantes sintéticos, já demonstrando resultados satisfatórios. A utilização de atmosfera modificada associada ao vapor do óleo essencial de mostarda nas embalagens impediu a deterioração microbiana em pães pelo período de 30 dias (SUHR & NIELSEN, 2005). Os óleos essenciais de canela e cravo adicionados à formulação contribuíram para a extensão da vida útil de produtos de panificação em até 10 dias em atmosfera normal e quando submetidos em embalagem à vácuo, o aumento de vida útil foi de até 15 dias (JU et al., 2018). Alil, fenil e benzil isotiocianatos embebidos em papel filtro dentro de embalagens promoveram um aumento de 3 a 4 dias de vida útil dos pães avaliados e ainda, reduziu a produção de aflatoxinas oriundas da espécie inoculada *Aspergillus parasiticus* (SALADINO et al., 2017).

Apesar de estudos com óleos essenciais demonstrarem resultados positivos e animadores em relação às propriedades de conservação em pães, se faz necessária a

verificação do melhor modo de aplicação, ou seja, inserido na formulação ou em embalagens e ainda, considerar a influência dos óleos essenciais sobre as propriedades organolépticas dos produtos finais. Debonne et al (2018) confirmaram o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) frente às espécies *A. niger* e *P. paneum*, contudo foi constatado que a incorporação do óleo essencial à massa dos pães não colaborou para a extensão da vida útil desses produtos, como esperado. Segundo os autores, tal fato pode ser justificado pela não homogeneização do óleo essencial à massa. No mesmo estudo, foi relatado também que a adição do óleo essencial à massa dos pães contribuiu negativamente para a alteração de características como volume, cor e sabor do produto final.

Além disso, os óleos essenciais são substâncias voláteis instáveis e podem ser mais facilmente degradadas em comparação a outras substâncias, seja por oxidação, volatilização, aquecimento ou presença de luz, necessitando de maior proteção contra fatores externos (ASBAHANI et al., 2015).

O uso de embalagens ativas tem sido bastante avaliado para viabilização do uso de óleos essenciais como conservantes naturais em panificação. A aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em formato de sachês não somente apresentou relevante potencial antifúngico *in vitro*, como também foi capaz de manter sua atividade antifúngica em fatias de pão de forma, conforme demonstra o estudo de Passarinho et al (2014). Tais resultados sugerem que o óleo essencial de orégano pode ser aplicado na indústria de panificação no formato sachê (como embalagens ativas) considerando ainda que características sensoriais como textura e sabor não foram significativamente comprometidas quando houve utilização de doses menores do óleo essencial.

A fim de atingir a dose que melhor inibe o crescimento microbiano e que ao mesmo tempo esteja dentro dos limites de segurança estabelecidos por órgãos regulamentadores, sem comprometimento das propriedades organolépticas de produtos de panificação, a encapsulação de óleos essenciais surge como uma alternativa a qual pode potencializar a ação antimicrobiana de compostos bioativos, mesmo em doses mínimas (WEISS et al., 2009).

3.2.1. Encapsulação de óleos essenciais

A encapsulação consiste em um processo físico-químico ou mecânico no qual ocorre a retenção de uma determinada substância, envolta por um material de parede específico, a fim de produzir partículas menores com diâmetros que variam em unidades de milímetros a nanômetros (BURGAIN, GAIANI, LINDE & SCHER, 2011).

Diversos são os métodos para obtenção dos encapsulados os quais podem ser descritos em três diferentes categorias: (i) métodos físicos como a secagem por atomização (conhecida também por *spray drying*), liofilização e precipitação com fluido supercrítico, (ii) métodos físico-químicos como a coacervação, lipossomas e gelificação iônica, (iii) métodos químicos como polimerização interfacial e complexação de inclusão molecular (TYAGI et al., 2011).

A encapsulação pelo método de *spray drying* é reconhecido pela sua rapidez e custo relativamente baixo, além de ser facilmente reprodutível e melhor adaptada para aplicações industriais em larga escala (BURGAIN, GAIANI, LINDE & SCHER, 2011). Tal procedimento consiste na pulverização de uma mistura líquida, previamente homogeneizada em solução, emulsão ou suspensão, em uma corrente de gás de secagem a quente, promovendo a evaporação do componente líquido, produzindo partículas pequenas e secas as quais são recuperadas ao final do processo (OZKAN et al., 2019).

De acordo com Bhandari (1998), a microencapsulação por *spray drying* é comumente empregada para compostos voláteis como os óleos essenciais devido à sua capacidade de proteção contra reações de degradação. Outros autores ainda ressaltam que tecnologias de nano e microencapsulação podem solucionar problemas relacionados à instabilidade física de importantes moléculas ativas, controlando ainda sua velocidade de liberação no meio externo e aumentando a solubilidade dos compostos ativos nos alimentos (JAFARI, ASSADPOOR, BHANDARI, & HE, 2008; ALOUI et al., 2014).

A eficiência do processo de microencapsulação por *spray drying* é determinada por diversos fatores como condições de processo e principalmente pelas características do material de parede, o qual deve ser selecionado de acordo com as propriedades desejadas de cada material durante todo o processo (JYOTHI et al., 2010).

Diversos materiais de parede podem ser utilizados no processo de microencapsulação por *spray drying* em alimentos, os quais geralmente são selecionados de acordo com fatores físico-químicos, econômicos e ainda, desejando-se a máxima retenção de óleo essencial após o processo de secagem. O material de parede pode ser derivado de carboidratos (como maltodextrina, amido modificado, goma arábica e ciclodextrinas) e proteínas (JAFARI et al., 2008). Dentre os carboidratos comumente utilizados em processos de *spray drying*, a maltodextrina é um amido hidrolisado com sabor e aroma neutros, boa proteção contra oxidação de compostos voláteis e possuindo ainda baixo custo em comparação a outros materiais. Contudo, possui baixa ação emulsificante e por isso é comumente associada a outros materiais encapsulantes ou emulsificantes (GHARSALLAOUI et al., 2007; KRISHNAN, KRISHIRSAGAR & SINGHAL, 2005).

Ao contrário da maltodextrina, a goma arábica é um hidrocoloide com bom poder emulsificante e solúvel em água em altas concentrações, sendo altamente recomendada na

encapsulação de óleos essenciais (BERTOLINI, SIANI & GROSSO, 2001). Apesar de possuir propriedades excelentes, a goma arábica possui como fatores limitantes seu alto custo e disponibilidade (MCNAMEE, O'RIORDA & O'SULLIVAN, 1998). Frente a esse cenário, o amido modificado vem sendo avaliado em estudos como uma alternativa a utilização da goma arábica como material de parede, possuindo propriedade emulsificante satisfatória. Tal material se difere de outros amidos pelo fato de possuir uma molécula lipofílica incorporada em sua cadeia, fornecendo uma maior capacidade de retenção de voláteis durante a atomização (ROCHA, FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2012).

Assim, determinando os materiais de parede e otimizando as condições de processo, a microencapsulação de óleos essenciais é capaz de aumentar a estabilidade de seus compostos. Nesse contexto, a encapsulação de óleos essenciais pode afetar positivamente sua ação, pois a liberação mais lenta, determinada pela difusão de voláteis através do material de parede, pode favorecer a ação antimicrobiana em relação ao óleo livre que difunde rapidamente (DA VEIGA, DA SILVA-BUZANELLO, CORSO & CANAN, 2019).

A microencapsulação de uma mistura de terpenos, extraídos de óleos essenciais de Melaleuca e D-limoneno, apresentou uma maior capacidade antibacteriana em menores concentrações e, além disso, não alterou as propriedades organolépticas dos sucos de pêra e laranja avaliados (DONSÌ, ANNUNZIATA, SESSA & FERRARI, 2011). O óleo essencial de orégano nanoencapsulado demonstrou inibir significativamente a contaminação fúngica em queijo Minas padrão (BEDOYA-SERNA, DACANAL, FERNANDES & PINHO, 2018) assim como o óleo essencial de tomilho microencapsulado demonstrou ser um conservante em potencial em produtos cárneos, sendo capaz de impedir alterações microbianas, químicas e sensoriais indesejáveis em hambúrguer de carne bovina (GHADERI-GHAHFAROKHI, BARZEGAR, SAHARI & AZIZI, 2016).

A nanoencapsulação de óleos essenciais em alimentos também é avaliada através da sua utilização em embalagens ativas. A aplicação de filmes de metilcelulose, adicionados de nanoemulsões de óleo essencial de orégano e cravo, reduziu a contagem de bolores e leveduras em fatias de pão pelo período de 15 dias (OTONI et al., 2014).

3.2.2. Óleo essencial de alecrim pimenta (*Lippia sidoides)*

A espécie *L. sidoides*, da família Verbenaceae, é um arbusto ramificado de até 2 m de altura, popularmente conhecida como alecrim pimenta e predominantemente encontrada na região do semiárido do Nordeste brasileiro (MATOS, 1998).

As partes aéreas da planta são tradicionalmente utilizadas, por via oral ou tópica, como antisséptico e antimicrobiano em tratamentos convencionais de infecções de pele, boca, garganta e intestino. Para tais aplicações, é utilizada a infusão das folhas ou também de extratos fluidos e óleos essenciais da planta (BRASIL, 2014).

Em relação à sua composição química, a quantificação de compostos em óleos essenciais de *L. sidoides*, pelo método de cromatografia gasosa, tem relatado a presença significativa dos seguintes compostos: ε-cariofileno, ρ-cimeno, carvona, β-mirceno, α-terpineno, 1,8 cineol e timol, sendo esse último o composto majoritário nos óleos essenciais avaliados (FONTENELLE et al., 2007; MAJOLO et al, 2018; COSTA et al, 2018; FERREIRA et al., 2018). Outros estudos relatam também a presença do carvacrol, isômero do composto timol, como outro composto majoritário nos óleos essenciais (BOTELHO et al, 2007; GUIMARAES, 2014). Variações nas quantificações e no perfil de compostos nos óleos essenciais podem ser justificadas pela presença de diferentes genótipos e idade das plantas utilizadas em cada estudo (DOS SANTOS, 2015). Ressalta-se que o timol e carvacrol são vastamente avaliados como conservantes naturais em estudos, devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas comprovadas ao longo dos anos (MARCHESE et al., 2016; ZHANG et al., 2018).

O uso popular do óleo essencial de *L. sidoides* como um antimicrobiano natural vem sendo afirmado através de estudos publicados nas áreas de saúde humana, saúde animal, agricultura e alimentação, os quais comprovam a sua influência sobre o crescimento ou a presença de diferentes espécies de micro-organismos patogênicos e deteriorantes. O óleo essencial de *L. sidoides* foi efetivo na inibição da espécie fúngica *Curvularia lunata*, a qual pode ocasionar danos e podridões em plantações de milho (FERREIRA et al., 2018).

Como antimicrobiano na indústria de alimentos, principal foco do presente estudo, são recentes e ainda escassos os estudos envolvendo a aplicação do óleo essencial de *L. sidoides*. Contudo, os resultados já publicados são animadores e impulsionam a realização de novas pesquisas na área com o óleo essencial.

Em alimentos, o óleo essencial de *L. sidoides* vem recentemente sendo estudado através de sua incorporação em revestimentos comestíveis de produtos hortícolas, sendo confirmada a sua potencial atividade antifúngica em mamão frente à espécie *Colletotrichum gloeosporioides* (ZILLO et al.,2018), em morango frente à espécie *C. acutatum* (OLIVEIRA et al., 2019) e à espécie *Rhyzopus stolonifer* (OLIVEIRA[2] et al., 2019), prolongando assim a vida útil dessas frutas no período pós-colheita.

Ainda, o óleo essencial de *L. sidoides* apresenta atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* superior, quando comparado ao timol isolado, frente algumas cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos e resistentes a determinados antibióticos,

demonstrando ser uma alternativa de aplicação como conservante na indústria de alimentos (COSTA et al., 2018).

Recentemente, a encapsulação do óleo essencial de *L. sidoides* vem sendo avaliada por diferentes métodos. A formação de um nanogel do óleo essencial de *L. sidoides* incorporado em quitosana e goma de cajueiro possibilitou uma liberação mais controlada dos compostos voláteis e atividade larvicida superior em comparação ao óleo essencial livre nas mesmas condições (ABREU, OLIVEIRA, PAULA & PAULA, 2012). O óleo essencial de *L. sidoides* encapsulado pelo método de emulsão-difusão apresentou estabilidade pelo período de 60 dias, tornando assim o óleo essencial bioativo por um maior período (PINTO et al., 2016).

Através da técnica de *spray drying*, o extrato de *L. sidoides* microencapsulado em goma arábica e maltodextrina possibilitou uma retenção eficaz do composto majoritário timol e ainda, atividade antifúngica frente algumas espécies do gênero *Candida* (FERNANDES, CANDIDO & OLIVEIRA, 2012). Resultados semelhantes de retenção e atividade antifúngica também foram encontrados em micropartículas obtidas pelo processo de microencapsulação por *spray drying* do óleo essencial de *L. sidoides* (FERNANDES et al., 2008), demonstrando assim que o óleo essencial e suas micropartículas podem ser uma interessante alternativa de conservação a ser explorada como insumo na indústria farmacêutica e alimentícia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

O OE de *L. sidoides* foi obtido industrialmente através do processo de arraste a vapor das folhas da planta e cedido gentilmente pela Agropaulo (Fortaleza –CE - Brasil). Goma arábica (Instant Gum® BA, Nexira, França), maltodextrina (Mor-rex® 1910, Ingredion, EUA), amido modificado (Capsul®, marca Ingredion, EUA) e polisorbato 80 (Tween 80®, Merck, Alemanha) foram utilizados no processo de secagem por *spray drying*. O meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA) granulado (Merck, Alemanha) foi utilizado nas análises microbiológicas *in vitro*.

4.2. Isolamento e identificação molecular de *A. niger*

Teve-se como objetivo isolar e identificar a espécie fúngica mais frequente em pães artesanais, sem adição de conservantes e em fim de vida útil, fabricados e comercializados na empresa Quinoa, localizada no município de Piracicaba (SP). Para isso, foram coletadas seis unidades de um mesmo lote do pão artesanal concedido pelo fabricante já fatiadas e em perfeito estado de embalagem. As amostras de pães foram armazenadas em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) em duas diferentes temperaturas, sendo três embalagens armazenadas a 18 °C e outras três embalagens armazenadas a 28 °C, até 7 dias após a respectiva data de fabricação descrita na embalagem.

As amostras foram avaliadas quanto ao crescimento visível de fungos na superfície das fatias de pão, considerando a frequência do aparecimento de espécies fúngicas. Os pães armazenados em ambas as temperaturas apresentaram crescimento fúngico logo ao segundo dia de armazenamento e, ao final do sétimo dia de armazenamento já apresentavam quantidades aparentes de colônias por toda a superfície (Figura 1). As colônias predominantes nos pães apresentavam aspecto escuro, esverdeado e aveludado.

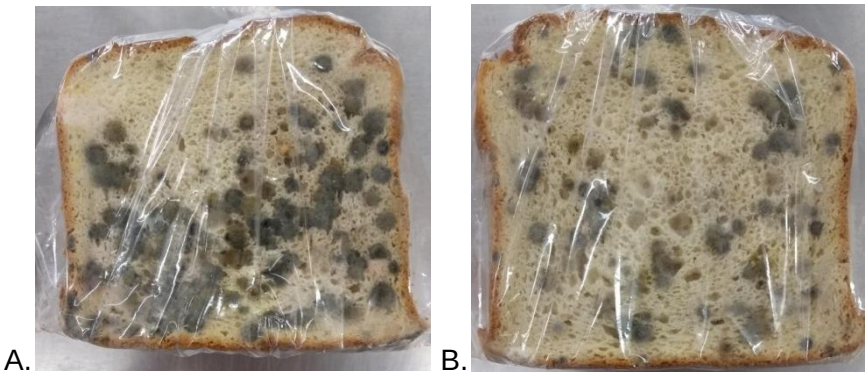


Figura 1. Presença de colônias de fungos na superfície de pães armazenados a 18 °C (A) e a 28 °C (B) após 7 dias de armazenamento.

Após o período de armazenamento, foram contabilizadas as colônias fúngicas de características semelhantes e a espécie fúngica mais frequente foi coletada a partir do método de isolamento direto, onde estruturas fúngicas foram transferidas para placas de Petri contendo meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA), incubadas em estufa a 25 °C pelo período de 7 dias, analisadas quanto aos aspectos macroscópicos, como coloração e formato da colônia (Figura 2), e posteriormente identificada molecularmente. A amostra da espécie fúngica selecionada para o estudo, já isolada e identificada, foi acondicionada e preservada através de repique contínuo em placas de Petri com meio BDA, como descrito por Guimaraes (2011), para posteriores preparos de inóculo.

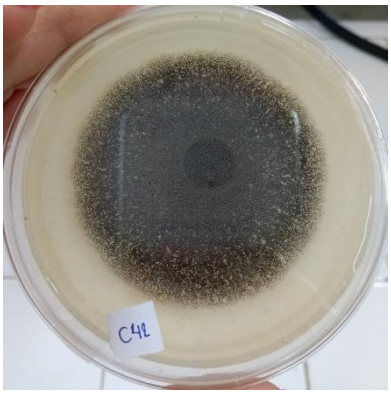


Figura 2. *A. niger* após isolamento direto dos pães.

A placa com o isolado foi posteriormente enviada à empresa WemSeq Biotecnologia (Curitiba-PR) para identificação molecular, pelo método de extração de DNA, purificação enzimática e sequenciamento.

A identificação molecular foi realizada utilizando 50 mg de células para extração de DNA. Para isso, o kit UltraClean Tissue and Cells DNA Extraction kit (MoBio, EUA) foi utilizado, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, foi realizada uma Reação

em Cadeia da Polimerase (PCR Convencional). Para amplificação da região a ser estudada, foram utilizados os primers ITS 1/4. A amostra foi então analisada pela técnica de eletroforese em gel de agarose. As reações foram purificadas enzimaticamente com ExoI/SAP (Thermo Fischer, EUA), conforme recomendação do fabricante. O sequenciamento Sanger, foi realizado através da conversão dos eletroforetogramas em sequência de bases com o programa Sequencing Analysis v 5.4 (Thermo Fischer, EUA).

De acordo com os resultados de sequenciamento, a amostra analisada apresenta 99% de similaridade (594/595 bases) com o gênero ascomicota Aspergillus e a espécie *A. niger*, conforme comparação da sequência obtida do banco de dados nr do NCBI (National Center for Biotechnology Information): *Aspergillus niger* 18S Ribossomal 1 RNA gene.

4.3. Microencapsulação do óleo essencial de *L. sidoides*

No presente estudo, também foi verificado o potencial antifúngico das micropartículas do OE de *L. sidoides,* a fim de verificar sua capacidade inibitória e também sua influência sobre as propriedades organolépticas dos pães. Para isso, a microencapsulação do OE foi realizada através do método físico de *spray drying* (KURIOKASE, SATHIREDDY & PRIYA, 2015) no Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate - ITAL (Instituto de Tecnologia de Alimentos), em Campinas (SP).

4.3.1. Preparo da emulsão

Dois diferentes materiais de parede foram avaliados, sendo a amostra identificada como GA constituída de 100% goma arábica e a amostra identificada como MD:AM constituída de maltodextrina e amido modificado na proporção de 3:1. Após completa dispersão do material de parede em água utilizando um rotor-estator Ultra-Turrax® (IKA t18 Basic, IKA Instruments Ltd) a 15.500 rpm durante 5 minutos, o OE foi adicionado ao sistema na proporção de 15% em relação ao teor de sólidos totais. O emulsificante Tween 80 foi adicionado na proporção de 1% da massa total da emulsão, que apresentou ao final do processo 30% de sólidos totais.

4.3.2. Secagem por spray drying

Com o auxílio de uma bomba peristáltica, a emulsão preparada foi inserida ao sistema para início do processo de secagem em spray dryer (Mini Spray Dryer B-290, Buchi, Suíça), a uma temperatura de secagem de 140 ± 2°C, temperatura de saída de 77 ± 2°C e

velocidade de alimentação aproximada de 8 mL/ min. O atomizador utilizado foi do tipo duplo fluido com abertura de 0,7 mm. As micropartículas obtidas no processo foram armazenadas em refrigeração (8°C ± 2°C) e protegidas da luz, evitando assim possíveis alterações.

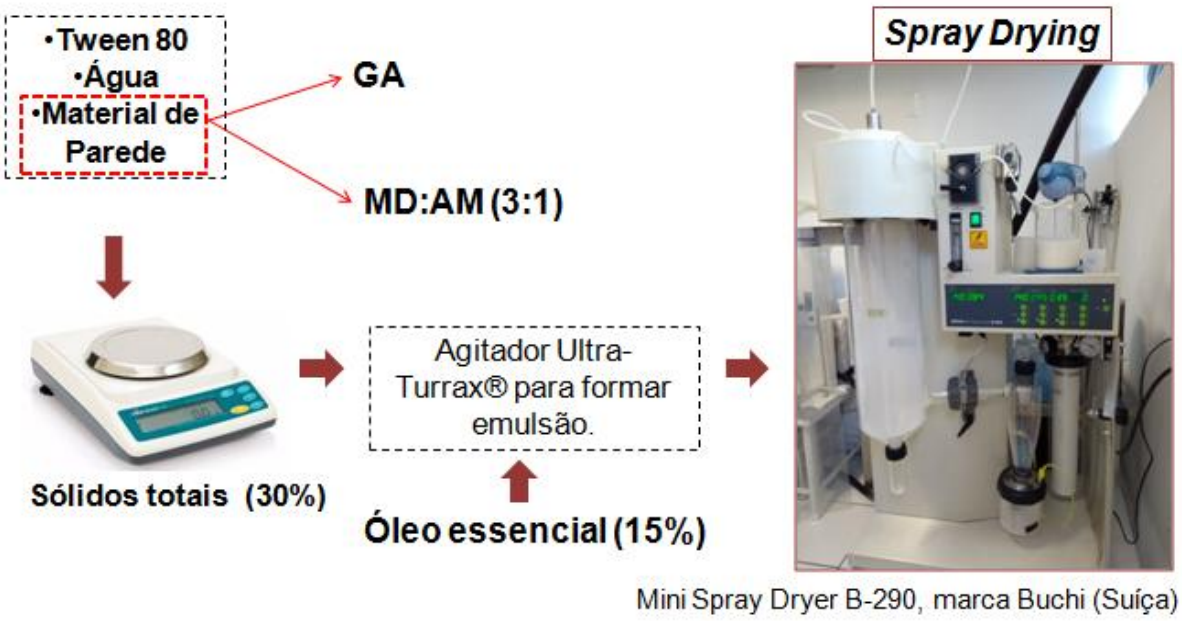


Figura 3. Esquema da secagem por *spray dryer* para obtenção das micropartículas.

4.4. Caracterização das micropartículas

4.4.1. Rendimento

Os resultados de rendimento do processo foram calculados através da relação da quantidade em gramas de microencapsulado obtido ao final do processo e a quantidade total de matéria-prima utilizada no preparo da emulsão inicial, como demonstrado abaixo (Equação 1):

$$Rendimento\ (\%) = \frac{Quantidade\ microencapsulado\ (g)}{Quantidade\ total\ base\ seca\ (g)} \times 100 \qquad \text{(Eq. 1)}$$

4.4.2. Teor de umidade

A análise de teor de umidade foi realizada por titulação Karl Fischer em equipamento Methrom (Suíça), onde entre 0,2 a 0,3 gramas das amostras foram adicionadas em uma

mistura de formamida e metanol na proporção 1:1 (BRUTTEL & SCHLINK, 2003). A análise de cada amostra de micropartículas foi realizada em triplicata.

4.4.3. Retenção de óleo nas micropartículas

A quantificação de OE retido nas micropartículas foi determinada através da hidrodestilação em aparelho *Clevenger*, segundo metodologia adaptada (BHANDARI et al., 1992). Alíquotas de 10 gramas das micropartículas adicionadas a 100 mL de água destilada foram colocadas em um balão volumétrico em aquecimento durante 2 horas. O volume de óleo destilado recuperado foi multiplicado pela densidade do OE para obtenção do valor em massa (gramas) e foi armazenado refrigerado em frasco âmbar para posterior caracterização química (CG/MS). As destilações ocorreram em triplicata. A retenção do óleo nas micropartículas foi determinada pela quantidade de óleo nas mesmas em relação ao óleo total inicial, adicionado à emulsão (Equação 2).

$$Retenção\ de\ óleo = \frac{óleo\ total\ recuperado\ nas\ micropartículas\ (g)}{Óleo\ inicial\ (em\ g\ \ na\ emulsão)} \times 100 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

4.4.4. Eficiência de encapsulação (EE)

Para determinação da eficiência de encapsulação do óleo foi determinado o teor de óleo superficial através do método adaptado de extração com hexano (CARNEIRO et al, 2013). Foram adicionados 2,5 gramas do pó encapsulado em um filtro de papel (*Whatman* n°40) em funil acoplado a um béquer, lavando-se 5 vezes as micropartículas com 10 mL de hexano. A quantidade de óleo superficial foi determinada pela quantificação da massa de óleo remanescente, ou seja, pela diferença de peso final e inicial do béquer após completa evaporação do hexano em capela de exaustão.

A partir dos valores de óleo total e óleo superficial contidos nas micropartículas, foi possível realizar o cálculo da EE (Equação 3):

$$EE\ (\%) = \frac{Teor\ de\ óleo\ total\ na\ micropartículas\ (g) -\ Teor\ de\ óleo\ superficial\ (g)}{Teor\ de\ óleo\ inicial\ na\ emulsão\ (g)} \times 100 \qquad \text{(Eq.3)}$$

4.4.5. Distribuição e tamanho das micropartículas

A distribuição de tamanho de partículas de OE foi mensurada por um equipamento de difração a laser (LA-950 V2, Horiba, Japão). Para cada amostra de micropartículas, foram analisadas 8 repetições, em uma faixa de medição de 0,01 a 3000 micrômetros.

Os resultados foram expressos como diâmetro em volume de esfera equivalente adotando o valor de diâmetro de De Broukere D[4,3] como diâmetro médio das amostras de micropartículas e ainda, o valor de Span (índice de polidispersidade) representado na fórmula abaixo (Equação 4):

$$Span = (D90 - D10) / D50 \qquad \text{(Eq. 4)}$$

Onde: D50 é o valor de mediana da distribuição, definido como o diâmetro onde metade dos valores obtidos está abaixo deste valor. Da mesma forma, 90% da distribuição encontra-se abaixo do valor de D90 e 10% dos dados obtidos está abaixo do D10. O valor Span representa a largura da distribuição, ou seja, seu índice de polidispersividade (amplitude).

4.5. Identificação e semi-quantificação dos compostos voláteis por CG/MS e CG/FID

A caracterização química do OE puro e do OE recuperado das micropartículas de GA e MD:AM ocorreu em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-2010 plus, Shimadzu, Japão), injetando 1 µL das amostras (auto-injetor Ai20, Shimadzu, Japão) em uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0,25 mm, d.i. x 0,25 µm). As condições empregadas foram: injetor a 220 °C (modo split 1:150 por 1,0 min) e gás de arraste hélio a 0,6 mL/min. A programação de temperatura ocorreu iniciando a 60 °C, com incremento de 3°C/min até 240 ºC, permanecendo nesta temperatura por 5 min; interface a 240°C, fonte de ionização por elétrons +70 eV, 35- 350 m/z. Uma solução de n-alcanos C7-C30 foi injetada no GC-MS sob as mesmas condições da amostra, com a finalidade de se obter os índices de retenção de temperatura programada (IR) dos compostos voláteis. A identificação tentativa dos analitos foi realizada comparando-se os IR calculados e os espectros de massa obtidos para a amostra com os espectros de massa e IR da literatura (NIST - National Institute of Standards and Technology, 2008). A identificação de um composto foi aceita quando houve no mínimo 85 % de similaridade entre os espectros obtidos e o espectro da literatura e houve uma variação máxima nos IR de ±10. Para as análises semi-quantitativas (% relativa de área) dos componentes dos óleos essenciais foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de ionização em chama GC/FID

(GC-2010 plus, Shimadzu, Japão) sob as mesmas condições de análise descritas para o GC/MS. Para esta última análise, os fatores de resposta diferencial do detector de ionização em chama foram considerados como iguais a 1. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em quadruplicata.

4.6. Atividade antifúngica *in vitro*

4.6.1. Método por diluição em ágar

Para o método por diluição em ágar, alíquotas do OE foram homogeneizadas em meio BDA, de acordo com metodologia adaptada de Robledo et al. (2018). Desta maneira, adicionando-se alíquotas apropriadas do óleo a 20 mL do meio de cultura contido em cada placa de Petri vedada com papel filme, foi possível avaliar o potencial antifúngico do OE nas seguintes doses: 0 (controle), 200, 300, 400 e 500 µL/L de meio de cultura, doses estas definidas através de pré-testes realizados. Para melhor homogeneização do OE ao ágar, o mesmo foi previamente solubilizado em Tween 80®, na proporção de 1:1 e posteriormente adicionado ao ágar ainda fundente. Para o tratamento controle considerou-se a adição da quantidade de Tween 80® utilizado para solubilização da dosagem máxima do OE utilizada nos testes. Os tratamentos foram analisados em quintuplicata e os experimentos realizados três vezes.

4.6.2. Método por exposição aos voláteis

O método por exposição aos compostos voláteis foi realizado através da utilização de alíquotas do OE de *L. sidoides* depositadas em discos de papel filtro estéreis (20 mm^2) fixados na parte interna superior das tampas das placas, permitindo a difusão dos compostos voláteis na atmosfera interna da placa de Petri invertida e vedada com papel filme, conforme realizado por Oliveira et al (2019). As mesmas doses utilizadas no método por diluição em ágar foram avaliadas, entretanto, o volume de OE em cada tratamento foi obtido de acordo com o volume de ar livre dentro das placas.

Também através dessa metodologia, foi verificada a capacidade inibitória das micropartículas, as quais foram depositadas em um pequeno recipiente de plástico (Ø: 30 mm e altura: 2 mm) posicionado na parte interna das tampas das placas, as quais foram também invertidas. A quantidade de micropartículas adicionada em cada placa foi calculada de acordo com o valor de óleo total quantificado nas micropartículas anteriormente para enfim obter as mesmas concentrações avaliadas nos experimentos com o OE livre. Para o

tratamento controle, considerou-se a utilização de micropartículas sem o OE nas placas de Petri. Os tratamentos foram analisados em quintuplicata e os experimentos realizados três vezes.

Figura 4. Ilustração das placas submetidas às diferentes metodologias de atividade antifúngica *in vitro*.

4.6.3. Preparo do inóculo

A espécie *A. niger* foi cultivada em meio BDA a 25 °C por 7 dias, para então seus esporos (com o auxílio de uma haste metálica) serem transferidos para uma solução aquosa estéril com dimetilsulfóxido a 5% e posterior agitação em tubo. A contagem de esporos foi padronizada para 10^6 esporos/mL da suspensão através da utilização de uma câmara de Neubauer. Cinco microlitros da suspensão de esporos foram depositados em disco de papel filtro estéril (Ø: 6 mm) posicionado no meio BDA de cada placa, as quais foram seladas e incubadas a 25 °C por 14 dias.

4.6.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Porcentagem de Inibição

Ao final do período de incubação, foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a dose na qual nenhum crescimento fúngico aparente foi observado. A cada dois dias, foi também mensurado com o auxílio de um paquímetro o halo de crescimento micelial (diâmetro) em duas medidas perpendiculares de cada repetição avaliada nos tratamentos, para então ser calculada a porcentagem de inibição referente a cada dose de OE e das micropartículas ao final do período, através da equação (Eq. 5):

$$Porcentagem\ de\ inibição\ (\%) = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100 \qquad \text{(Eq. 5)}$$

Onde:

Dc é o diâmetro formado na placa controle (cm)

Dt é o diâmetro formado na placa do tratamento (cm)

4.7. Atividade inibitória do desenvolvimento fúngico em fatias de pão contidas em embalagens, através da exposição aos voláteis do óleo essencial de *L. sidoides* livre e suas micropartículas

4.7.1. Elaboração e caracterização dos pães

Os pães utilizados para os experimentos foram obtidos de um fabricante local (Quinoa, Piracicaba/SP), sendo escolhido para esse experimento o Pão de Leite de Castanhas, sem glúten e sem adição de conservantes. Os ingredientes em ordem decrescente são: bebida de castanha de caju, farinha de arroz integral, fécula de batata, ovo, óleo de girassol, farinha de grão de bico, polvilho doce, clara de ovo, açúcar demerara orgânico, fermento biológico seco, sal, goma xantana, vinagre de maçã. A fabricação dos pães ocorreu na própria cozinha industrial da empresa e os pães retirados do forno de maneira asséptica, resfriados e em seguida transportados até o Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP, Piracicaba/SP). Os pães que foram utilizados para inoculação com a solução de esporos (10^6 esporos/mL) foram submetidos previamente à exposição em luz UV em fluxo laminar por 30 minutos, visando reduzir assim a ocorrência de bolores contaminantes.

Por se tratar de uma formulação não convencional de pão de forma, sem adição de farinha de trigo, foi realizada a determinação de pH, o teor de umidade e a atividade de água dos pães após o forneamento e resfriamento, para caracterização desse pão. A análise de umidade foi realizada em estufa a 105 °C por 24h, de acordo com metodologia 44-15.02 padronizada (BRIDGES, 2009) e os resultados expressos em porcentagem. A determinação do pH dos pães formulados foi realizada com o auxílio de um potenciômetro (Quimis, Q799-D2, São Paulo, Brazil) e a atividade de água foi realizada em triplicata utilizando o equipamento Aqualab (Aqualab CX 2T Decagon devices Inc., Pullman, WA, EUA), de acordo com as metodologias realizadas anteriormente por Toledo et al (2017) em biscoitos do tipo *cookies*.

4.7.2. Exposição das fatias de pão aos compostos voláteis

A atividade antifúngica do OE de *L. sidoides* e das micropartículas cujo material de parede apresentar melhor desempenho e viabilidade foi verificada através da exposição das fatias aos seus compostos voláteis. Para isso, foram considerados os tratamentos: controle (sem exposição aos voláteis), OE e MD:AM, ambos em uma dose 5 vezes superior à CIM encontrada nos experimentos *in vitro* (1500 μL/L de ar contido na embalagem). Considerando que nos experimentos *in vitro* as micropartículas sem OE, utilizadas nos tratamentos controle, não apresentaram influência na inibição do crescimento fúngico nos experimentos *in vivo* não houve adição das micropartículas sem OE no tratamento controle. As doses de OE e de micropartículas foram calculadas da mesma maneira que no experimento *in vitro*, em proporção ao volume de ar livre na embalagem. O cálculo de ar livre foi realizado a partir da subtração do volume da embalagem pelo volume específico das fatias de pão, o qual foi determinado pelo método de deslocamento de sementes de painço (MANNURAMATH, YENAGI & ORSAT, 2015).

Para cada tratamento, 4 fatias de pão foram acondicionadas em um recipiente de polipropileno (1000 cm^3), selados com filme plástico e incubados em estufa BOD a 25 °C por 7 dias sem fotoperíodo, como representado na Figura 5. Para os tratamentos inoculados, foram depositados 5µL da suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) no centro de cada fatia, para posterior análise do crescimento micelial a cada dois dias durante o período de armazenamento, conforme metodologia descrita no experimento *in vitro*. O experimento foi repetido duas vezes.

Considerou-se também a avaliação dos mesmos tratamentos com fatias de pão não inoculadas e nesse caso, a incidência de crescimento fúngico foi avaliada através da porcentagem de área nas fatias que apresentavam crescimento fúngico visível a olho nu: - (nenhum crescimento); + (<25%); ++ (25 a 50%); +++ (50 a 75%) e ++++ (>75%), de acordo com metodologia adaptada de Clemente, Aznar & Nerín (2019). O experimento foi repetido duas vezes.

Figura 5. Recipiente com fatias de pães submetidas ao tratamento com OE livre pelo período de 7 dias.

4.8. Influência sensorial do óleo essencial livre e encapsulado

A fim de verificar a percepção sensorial dos consumidores e a influência de substâncias voláteis do OE nas características organolépticas de pães, foi realizado um teste de diferença do controle (BATTOCHIO et al., 2006). Os pães foram acondicionados dentro das embalagens, sem exposição aos voláteis (padrão), com o OE e com as micropartículas inseridas nas embalagens e foram armazenados por 24 h até o momento da análise sensorial. A partir de uma escala de 10 pontos (10 = extremamente diferente, 0 = nenhuma diferença), o teste permitiu quantificar a diferença dos tratamentos em relação à amostra controle (padrão), através dos valores de DMS (Diferença Mínima Significativa). Os consumidores foram questionados quanto à diferença sensorial em relação aos atributos aroma, cor, aparência e aspecto global das amostras.

A análise sensorial ocorreu em acordo com as exigências pré-estabelecidas pela Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da ESALQ/USP (CAAE: 13790819.9.0000.5395). Um relatório final foi enviado à comissão ao final do projeto.

4.9. Análise estatística

A análise de dados ocorreu utilizando-se o delineamento experimental inteiramente casualizado. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 5% de significância a fim de verificar a diferença entre os materiais de parede, assim como para verificar a diferença entre os tratamentos utilizados nos resultados *in vitro* e nos pães. Para

a análise sensorial, os dados do teste de diferença do controle foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de médias de Dunett. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R® (versão 3.5.3).

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das micropartículas

Os valores de eficiência de microencapsulação em relação a cada material de parede utilizado estão descritos na Tabela 1. Os valores de rendimento de processo também são apresentados e foram os que mais diferiram entre os materiais de parede utilizados, tendo sido MD:AM o que forneceu uma maior recuperação das micropartículas. Fernandes et. Al (2008) relataram que a utilização de 100% de goma arábica como material encapsulante do OE de *L. sidoides* aumentou demasiadamente a viscosidade da emulsão, o que resultou na formação de depósitos parcialmente secos após o processo de secagem, com maior material retido na câmara de secagem e consequentemente menor recuperação final do pó.

Tabela 1. Dados de eficiência de processo das micropartículas produzidas pelos materiais de parede GA e MD:AM.

	Óleo Total (%)	**Óleo Superficial (%)**	**Eficiência de encapsulação (%)**	**Rendimento de processo (%)**	**Umidade (%)**
GA	82,91 ± 3,5a	1,48 ± 0,8a	73,05 ± 6,3a	42%	9,61 ± 0,83a
MD:AM	82,91 ± 3,5a	1,82 ± 0,5a	70,79 ± 4,1a	55,8%	6,79 ± 0,10a

Fonte: dados originais de pesquisa.

Apesar dos valores de retenção de óleo total serem semelhantes, o material de parede constituído somente de goma arábica (GA) apresentou melhor eficiência de encapsulação (73,05%), o que é justificado pela menor quantidade de óleo superficial nas micropartículas. A goma arábica é um agente encapsulante muito efetivo, pois é capaz de produzir emulsões estáveis em diferentes condições de pH e, portanto, capaz de formar filmes eficientes e promover maior retenção de óleos essenciais durante o processo de secagem (KRISHNAN, BHOSALE & SINGHAL, 2005). Em outro estudo, valores superiores de retenção foram encontrados conforme aumentou-se a proporção de goma arábica em relação à maltodextrina na microencapsulação do OE de *L. sidoides* (FERNANDES et al., 2008), chegando a até 52% de retenção de óleo total nas micropartículas. A eficiência de encapsulação alcançou o valor de até 92% na microencapsulação do OE de orégano com o aumento da concentração de goma arábica como material encapsulante. Em paralelo, a associação da mesma com amido modificado na microencapsulação do OE de orégano promoveu bons resultados de eficiência e isso pode ser justificado graças às propriedades de formação de filmes de ambos os materiais (COSTA et al., 2013).

A associação de maltodextrina e amido modificado como agente encapsulante também tem demonstrado resultados satisfatórios. Na microencapsulação do OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) a utilização desses materiais forneceu a mesma retenção de óleo total em comparação ao amido modificado isolado e eficiência superior à goma arábica isolada (FERNANDES et al., 2014). Tal afirmação corrobora com os dados encontrados no presente estudo, pois o uso de amido modificado associado à maltodextrina como material de parede forneceu a mesma retenção de óleo total nas micropartículas em comparação à goma arábica isolada, chegando a valores próximos de eficiência de encapsulação.

As micropartículas obtidas pelos diferentes materiais de parede apresentaram diferentes valores de umidade, tendo o material de parede GA fornecido uma umidade maior (9,61%) em comparação às micropartículas produzidas pela associação de maltodextrina e amido modificado (6,79%). A umidade de micropartículas do OE de *L. sidoides* apresentou valores entre 4 e 5%, variando de acordo com diferentes condições de processo (FERNANDES et al., 2008). Outro estudo reportou uma possível correlação da umidade das micropartículas com a taxa de viscosidade das emulsões (BHANDARI et al., 1992), o que justificaria o valor superior de umidade das micropartículas formadas a partir da goma árabica.

5.1.1. Distribuição de tamanho das micropartículas

Como observado na Tabela 2, a utilização de GA como material de parede no processo de encapsulação promoveu a formação de partículas de diâmetro médio de 14,58 µm enquanto o material de parede constituído de MD:AM forneceu diâmteros de partículas menores de 10,58 µm. Fernandes et al. (2008) verificaram que a microencapsulação do OE de *L. sidoides*, utilizando a goma arábica como material de parede, forneceu micropartículas de diâmetro médio de 13,81 µm. De acordo com Jafari et al. (2008), emulsões com maior viscosidade, provenientes de materiais de parede como a goma arábica, podem estar relacionadas à formação de micropartículas de maior diâmetro e maior eficiência de encapsulação.

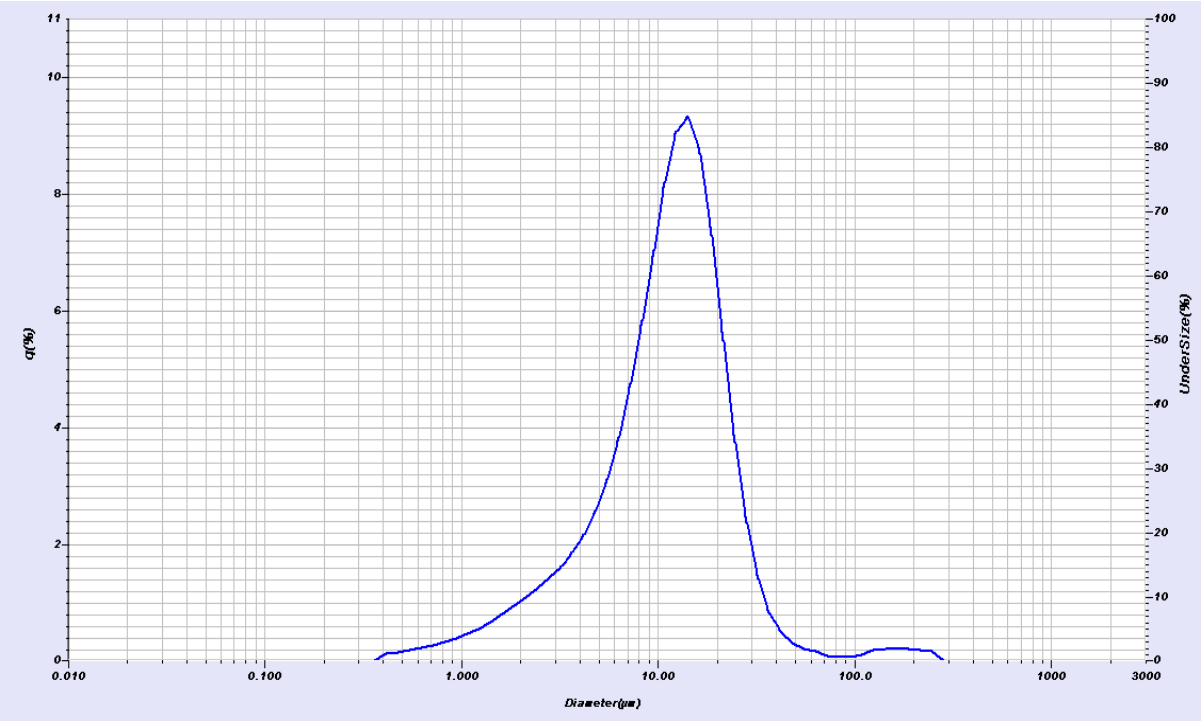
Tabela 2. Valores de diâmetro e de *span* na distribuição do tamanho de partículas em cada material de parede avaliado (GA e MD:AM).

Material de parede	D[4,3] (µm)	D10 (µm)	D50(µm)	D90(µm)	*Span*
GA	14,58 ± 1,48a	3,33 ± 0,04a	11,73 ± 0,18a	23,53 ± 0,66a	1,72a
MD:AM	10,58 ± 1,01b	3,60 ± 0,01a	8,82 ± 0,30b	16,42 ± 0,44b	1,45a

Fonte: dados originais de pesquisa.

Outro parâmetro importante avaliado foi o *span*, valor que representa o índice de polidispersividade nas amostras. No presente estudo, o valor de *span* foi maior nas micropartículas provenientes do material de parede goma arábica (*Span* de GA = 1,72), no entanto ambos os valores apresentaram uma alta dispersão, ou seja, uma heterogeneidade no tamanho das micropartículas. Em condições semelhantes de processo, micropartículas de ácido ascórbico obtidas por spray drying apresentaram valor de *span* igual a 1,45 (ALVIM et al., 2016) Altos valores de dispersão podem ser justificados pela utilização do atomizador do tipo duplo fluido no processo de secagem (PAGLIONE et al., 2019). Ambas as amostras provenientes dos materiais de parede demonstraram uma distribuição do tamanho de partículas unimodal, como observado nos gráficos abaixo (Figura 6).

A)



B)

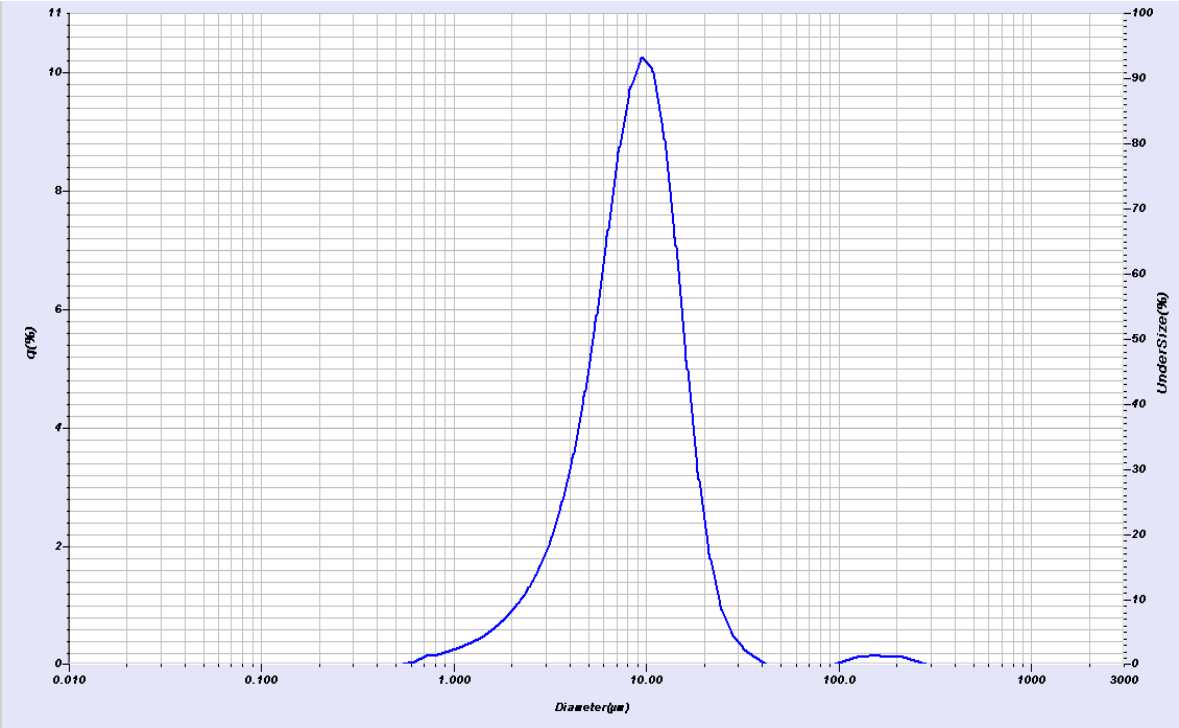


Figura 6. Gráficos de dispersão representando o diâmetro das partículas (eixo x) e os volumes de diâmetro em % (eixo y), sendo A) referente a GA e B) referente a MD:AM.

5.2. Composição química dos óleos essenciais

A caracterização química de óleos essenciais microencapsulados geralmente é realizada a fim de verificar se durante o processo de secagem houve alteração na composição de voláteis presentes no OE original, os quais possuem diferentes pesos moleculares e temperaturas de volatilização. A verificação da retenção de compostos voláteis presentes no OE proveniente das micropartículas pode explicar diferenças significativas nas propriedades originais de óleos essenciais, como por exemplo, uma potencialização ou redução em sua atividade antimicrobiana.

Na análise de GC/MS e GC/FID, foram identificados e semi-quantificados 27 componentes nas amostras analisadas (Tabela 3). O teor de timol, composto majoritário na amostra de OE puro avaliada, foi de 59,40%. Outras concentrações de timol em OE de *L. sidoides* foram encontradas por outros autores, variando entre 49,46% e 92,68% (OLIVEIRA et al., 2019; FONTENELLE et al., 2007; COSTA et al., 2018; MAJOLO et al., 2018; VERAS et al., 2012). Dos Santos et al. (2015) encontraram modificações nos teores de timol, carvacrol e outros compostos majoritários em diferentes óleos essenciais de *L. sidoides* e puderam relatar que fatores como região, condições de cultivo, idade e genótipo da planta podem influenciar significativamente as concentrações de compostos dos óleos essenciais dessas plantas. Na amostra de OE livre, outros compostos majoritários também foram identificados como: cimeno (12,60%), trans-cariofileno (12,20%), gama-terpineno (3,62%), alfa-terpineno (1,59%), mirceno (1,55%), alfa-tujeno (1,18%) e copaeno (1,02%). A Figura 7 representa a variação no teor de compostos majoritários do OE puro e referente a cada material de parede utilizado.

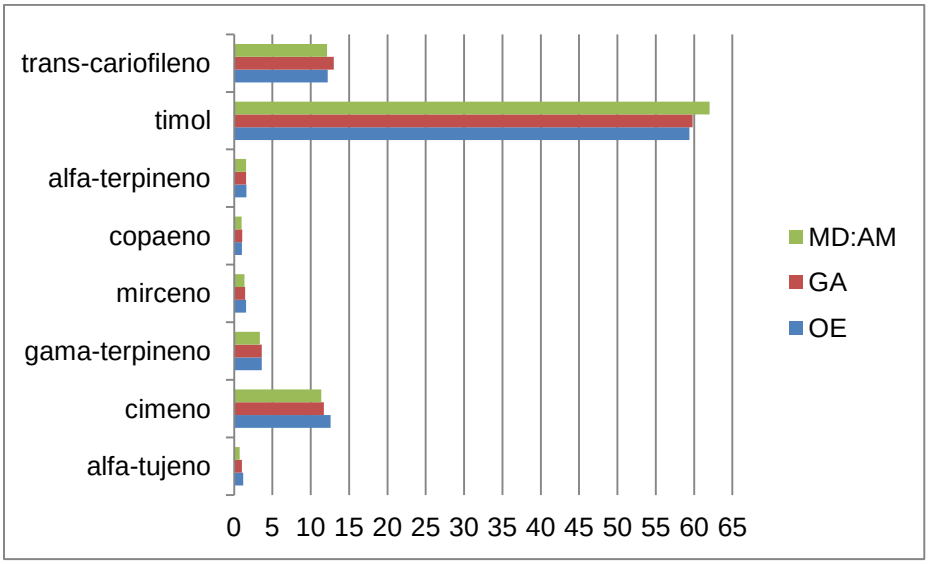


Figura 7. Relação de compostos majoritários identificados e semi-quantificados (% relativa da área) no OE de *L. sidoides* livre e nos óleos extraídos das micropartículas com goma arábica (GA) e com maltodextrina e amido modificado (MD:AM).

Em relação ao processo de microencapsulação pelos diferentes materiais encapsulantes, as caracterizações de compostos dos óleos essenciais recuperados das micropartículas mostraram-se semelhantes à realizada com o OE livre, o que demonstra que o processo de microencapsulação não modificou o perfil químico do OE original. Entretanto, sutis diferenças ($p>0,05$) na retenção de alguns compostos voláteis foram relatadas (Tabela 3). Importante ressaltar que o timol, composto com maior porcentagem no OE de *L. sidoides*, foi encontrado em maior concentração no óleo recuperado das micropartículas com maltodextrina e amido modificado (62,01%), valor significativamente superior até mesmo ao encontrado no OE livre (59,40%). Tal diferença na taxa percentual de timol pode ser justificada porque outros compostos majoritários como cimeno, gama e alfa terpineno apresentaram menor porcentagem nas amostras constituídas de MD:AM, ou seja, houve perda desses compostos e consequentemente um aumento na proporção de timol nas micropartículas constituídas desse material. O composto timol, assim como seu isômero carvacrol, é um monoterpeno fenólico que vem sendo avaliado como um importante agente antimicrobiano, com propriedades antifúngicas e antioxidantes relevantes (SANCHEZ-GARCIA et al, 2008). Sabe-se ainda que terpineno e ρ-cimeno são compostos precursores dos monoterpenos timol e carvacrol (ALIGIANNIS et al., 2001) e, portanto, a identificação e quantificação dessas substâncias se faz importante.

Tabela 3. Caracterização química do OE de *L. sidoides* livre (OE) e extraído das micropartículas encapasuladas com goma arábica (GA) e com maltodextrina e amido modificado (MD:AM).

Compostos	IR calculado	OE	GA	MD:AM
Alfa-tujeno	926	1,18 ± 0,010a	1,00 ± 0,007b	0,74 ± 0,044c
Alfa-pineno	933	0,41 ± 0,003a	0,36 ± 0,002b	0,33 ± 0,007c
Canfeno	948	0,02 ± 0,001a	0,02 ± 0,001a	0,02 ± 0,001ª
Sabineno	972	0,04 ± 0,001a	0,02 ± 0,001b	0,01 ± 0,001c
Beta-pineno	977	0,14 ± 0,001a	0,13 ± 0,001b	0,12 ± 0,002c
Mirceno	990	1,55 ± 0,011a	1,45 ± 0,012b	1,37 ± 0,015c
Alfa-felandreno	1005	0,09 ± 0,001a	0,09 ± 0,001a	0,09 ± 0,001a
3-careno	1011	0,17 ± 0,001a	0,16 ± 0,001b	0,15 ± 0,001c
Alfa-terpineno	1017	1,59 ± 0,013a	1,56 ± 0,013b	1,54 ± 0,006b
Cimeno	1027	12,60 ± 0,725a	11,72 ± 0,061b	11,36 ± 0,036b
Limoneno	1030	0,62 ± 0,007a	0,64 ± 0,010a	0,59 ± 0,007b
Cis-ocimeno	1036	0,10 ± 0,001a	0,10 ± 0,005a	0,09 ± 0,001b
Trans-beta-ocimeno	1046	0,17 ± 0,001a	0,16 ± 0,001b	0,15 ± 0,002c
Gama-terpineno	1059	3,62 ± 0,028a	3,60 ± 0,018a	3,37 ± 0,030b
Hidrato de cis-sabineno	1067	0,12 ± 0,002a	0,02 ± 0,006b	0,01 ± 0,001c
Terpinoleno	1089	0,16 ± 0,001c	0,17 ± 0,001b	0,18 ± 0,006ª
Ipsdienol	1155	0,55 ± 0,039a	0,43 ± 0,067b	0,27 ± 0,029c
Terpinen-4-ol	1178	0,57 ± 0,075b	0,64 ± 0,111a,b	0,81 ± 0,120ª
Alfa-terpineol	1201	0,05 ± 0,006c	0,06 ± 0,001b	0,09 ± 0,008ª
Anisol	1235	0,96 ± 0,010b	1,01 ± 0,007a	1,00 ± 0,038ª
Timol	1307	59,40 ± 0,542b	59,80 ± 0,252b	62,01 ± 0,086a
Copaeno	1379	1,02 ± 0,012b	1,07 ± 0,008a	0,97 ± 0,017c
Trans-cariofileno	1427	12,20 ± 0,124b	12,98 ± 0,112a	12,13 ± 0,045b
Aloromadendreno	1443	0,80 ± 0,014a	0,74 ± 0,001b	0,71 ± 0,010c
Alfa-humuleno	1457	0,49 ± 0,011c	0,51 ± 0,002b	0,53 ± 0,002ª

Tabela 3. Continuação

Lepidozeno	1499	0,84 ± 0,126a,b	0,94 ± 0,003a	0,76 ± 0,014b
Gama-canadineno	1526	0,55 ± 0,011b	0,60 ± 0,002a	0,60 ± 0,024ª

Fonte: dados originais de pesquisa.

Legenda: resultados semi-quantitativos expressos em porcentagem relativa de área dos componentes dos óleos essenciais das amostras. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste de ANOVA e Tukey com p≥0,05

A quantificação de compostos presentes no óleo recuperado das micropartículas produzidas com goma arábica (GA) apresentou apenas ligeiras variações de concentração de cada composto, possuindo uma caracterização química similar ao OE puro analisado. Contudo, é importante ressaltar que, apesar da goma arábica ser um excelente material emulsificante e encapsulante de compostos terpênicos, possui a desvantagem de formar uma membrana semi-permeável ao oxigênio e assim ser mais susceptível às reações de oxidação (BERTOLINI, SIANI & GROSSO, 2001). Por esse motivo, a maltodextrina é comumente associada a outro material emulsificante como a goma arábica, pois fornece boa estabilidade oxidativa (GHARSALLAOUI et al., 2007). Tais relatos devem ser considerados na escolha de um material de parede no processo de microencapsulação por *spray drying*, a fim de garantir maior estabilidade dessas micropartículas.

5.3. Atividade antifúngica *in vitro*

5.3.1. Atividade inibitória *in vitro* do óleo essencial

O OE de *L. sidoides* possui atividade antifúngica comprovada frente a algumas espécies fúngicas como: *C. albicans*, *C. acutatum*, *R. stolonifer* e *F. oxysporum* (FONTES et al., 2012; FONTENELLE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2019). No presente estudo, o OE de *L. sidoides* apresentou atividade inibitória *in vitro* frente à espécie *A. niger*, incubada a 25 °C pelo período de 14 dias, por dois métodos de avaliação, diluído diretamente no meio de cultura ou pela exposição de seus compostos voláteis na atmosfera interna das placas (Tabela 4).

Tabela 4. Dados das análises *in vitro* para verificação da atividade antifúngica do OE de *L. sidoides* e de suas micropartículas por diferentes métodos, frente à espécie *A. niger* incubada a 25 °C por 14 dias.

Método	Doses (µL/L)	CM (cm)	PI (%)	CIM (µL/L)
Diluição em ágar (OE)	0	8,4 ± 0,0[a]	0,00 ± 0,0	300 < CIM < 400
	200	8,4 ± 0,0[a]	0,00 ± 0,0	
	300	2,74 ± 1,4[b]	67,42 ± 16,7	
	400	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
	500	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
Exposição aos voláteis (OE)	0	8,4 ± 0,0[a]	0,00 ± 0,0	300 < CIM < 400
	200	6,59 ± 1,46[b]	22,30 ± 16,29	
	300	1,23 ± 0,74[c]	85,35 ± 8,8	
	400	0,00 ± 0,0[d]	100 ± 0,0	
	500	0,00 ± 0,0[d]	100 ± 0,0	
Exposição aos voláteis (GA)	0	8,4 ± 0,0[a]	0,00 ± 0,0	200 < CIM < 300
	200	2,5 ± 0,61[b]	70,54 ± 7,2	
	300	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
	400	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
	500	*	*	
Exposição aos voláteis (MD:AM)	0	8,4 ± 0,0[a]	0,00 ± 0,0	200 < CIM < 300
	200	2,6 ± 0,53[b]	69,29 ± 5,9	
	300	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
	400	0,00 ± 0,0[c]	100 ± 0,0	
	500	*	*	

Fonte: dados originais de pesquisa.
Legendas:
CM: crescimento micelial ao final do período de 14 dias; PI: porcentagem de inibição; CIM: concentração inibitória mínima.
* para as análises de exposição aos voláteis com GA e MD:AM não foi avaliada a atividade inibitória na dose de 500 µL/L.
Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste de ANOVA e Tukey com p≤0,05

Em ambos os métodos, a CIM observada esteve entre as doses de 300 e 400 µL/L quando se utilizou o OE livre. Entretanto, os valores de crescimento micelial nas doses de 200 e 300 µL/L foram significativamente menores quando houve a utilização do OE por exposição dos compostos voláteis, o que resultou em uma porcentagem de inibição aproximadamente 18% maior em placas expostas aos voláteis na dose de 300 µL/L. Clemente, Aznar & Nerín (2019) observaram a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de mostarda e canela por ambos os métodos citados e relataram que a espécie *A. niger* foi uma das únicas espécies avaliadas a apresentar diferença significativa de inibição comparando-se os métodos de diluição em ágar e exposição aos voláteis nas placas, onde se pôde concluir que melhores resultados de inibição foram encontrados por difusão de vapor nas placas. Resultados semelhantes de inibição foram encontrados frente à espécie *A. niger*, onde o OE de citronela (*Cympobogon nardus*) apresentou atividade fungistática da espécie com porcentagem de inibição de 80% na dose de 400 µL/L, após 7 dias (DE BILLERBECK et al., 2001). Pelo método de diluição em ágar, o composto timol

(maior constituinte do OE de *L. sidoides*) apresentou CIM de 250 µL/L frente à mesma espécie fúngica (GUARDA, RUBILAR & GALOTTO, 2011).

O tratamento controle (sem adição de OE) apresentou crescimento micelial entre o primeiro e o segundo dia de incubação e o crescimento total nas placas ocorreu em 6 dias de análise. Para verificação de crescimento micelial nos outros tratamentos, o período de incubação das análises se estendeu até 14 dias (Figura 8).

No método por diluição em ágar, as placas com a concentração de 200 µL/L apresentaram início de crescimento no quarto dia de análise, enquanto que no método por exposição aos voláteis, o tratamento com 200 µL/L de OE iniciou seu crescimento somente no sexto dia de análise. Observa-se então que a utilização do OE em fase gasosa demonstrou ser mais efetiva, já a partir da menor dose avaliada nos experimentos. Resultados semelhantes foram encontrados em um estudo com OE de mostarda preta (*Brassica nigra*) onde a aplicação do OE por exposição aos voláteis apresentou concentrações inibitórias consideravelmente menores em comparação àquelas encontradas por diluição em ágar (MEJÍA-GARIBAY, PALOU & LOPEZ-MALO, 2015).

A avaliação antifúngica de óleos essenciais através de ensaios de diluição em ágar geralmente pode apresentar resultados inferiores de capacidade inibitória devido à hidrofobicidade dos óleos essenciais, dificultando assim a solubilidade no meio de cultura (DEBONNE et al., 2018). Isso ocorre devido à inserção de moléculas lipofílicas em um meio aquoso, promovendo a formação de micelas e limitando assim a ação dos óleos essenciais sobre os micro-organismos (NADJIB et al., 2014). Ainda, é relatado que compostos como carvacrol, alil-isotilcianato e timol, principal constituinte do OE de *L. sidoides*, são substâncias altamente voláteis e por esse motivo, presume-se que sejam mais ativos quando utilizados em fase gasosa (JANATOVA et al., 2015).

Frente a essas observações, ressalta-se a necessidade de mais estudos de avaliação de óleos essenciais frente a outras espécies fúngicas por metodologias de exposição aos voláteis, visto que menores concentrações são requeridas para se obter uma inibição significativa, o que acarretaria em um menor comprometimento sensorial em alimentos em comparação à adição direta de óleos essenciais em alimentos. Por esse motivo, para as avaliações de atividade antifúngica das micropartículas *in vitro* e nos pães, considerou-se somente o método de exposição aos voláteis.

5.3.2. Atividade inibitória *in vitro* das micropartículas

As micropartículas de OE de *L. sidoides* provenientes de diferentes materiais de parede apresentaram efeitos inibitórios semelhantes entre si frente à espécie *A. niger* pelo

período de 14 dias. Ao fim do período de incubação, o fungo no tratamento controle apresentou crescimento sobre toda a área da placa enquanto que nos tratamentos com as micropartículas somente na dose de 200 µL/L houve crescimento micelial, que foi de 2,5 e 2,6 cm para GA e MD:AM, respectivamente (Figuras 8 e 9). Não houve diferença significativa entre os valores de crescimento micelial em placas expostas às micropartículas de GA e MD:AM após 14 dias.

Em comparação ao tratamento com OE livre, pelo mesmo método de exposição aos voláteis, os valores de crescimento micelial nos tratamentos com 200 e 300 µL/L das micropartículas GA e MD:AM apresentaram valores significativamente menores. A CIM observada com as micropartículas situou-se entre 200 e 300 µL/L, valor inferior ao encontrado nas avaliações de atividade antifúngica *in vitro* do OE livre, observando-se então que o processo de microencapsulação do OE pode ter potencializado a sua ação inibitória nas placas.

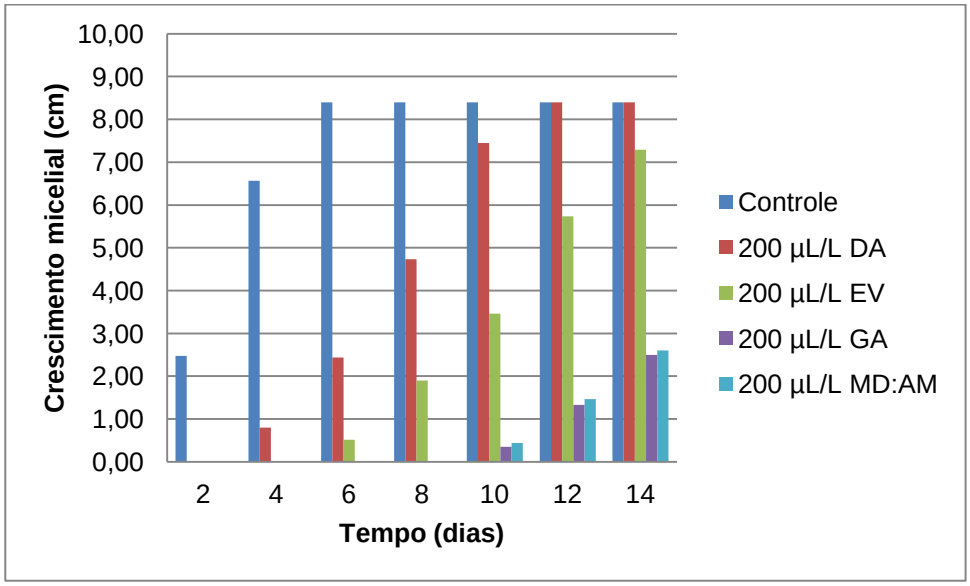


Figura 8. Crescimento micelial de *A. niger* aos 14 dias após incubação a 25 °C, em tratamentos de exposição ao OE de *L. sidoides* (200 µL/L) por diferentes métodos: DA (OE diluído em ágar); EV (OE por exposição aos voláteis); GA (micropartículas constituídas de goma arábica por exposição aos voláteis); MD:AM (micropartículas constituídas de maltodextrina e amido modificado por exposição aos voláteis).

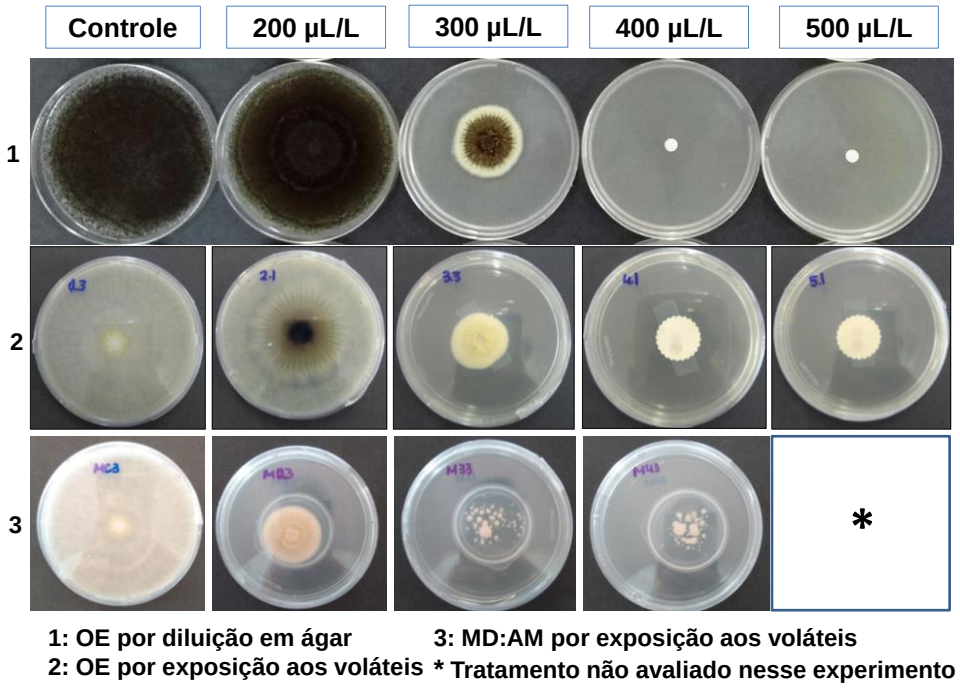


Figura 9. Registro fotográfico das placas submetidas aos diferentes métodos e tratamentos após 14 dias em estufa a 25 °C.

Os resultados similares, ou até mesmo superiores das micropartículas em comparação ao OE livre na atividade antifúngica *in vitro* por exposição aos voláteis podem ser explicados pela caracterização química de ambos (CG/MS) comentada em tópicos anteriores, pois o processo de microencapsulação preservou a composição química do OE e ainda, possibilitou a transformação de gotículas de OE em micropartículas, aumentando a biodisponibilidade de seus compostos ativos (ESFANJANI & JAFARI, 2016). Além disso, a microencapsulação pode ter contribuído para a liberação gradativa dos compostos voláteis presentes no óleo essencial, explicando assim a extensão do efeito antifúngico das micropartículas durante o período analisado (TEODORO et al., 2014).

A atividade antifúngica do OE de *L. sidoides* microencapsulado pelo processo de *spray-drying* foi anteriormente verificada por Fernandes et. al (2008). Frente espécies fúngicas do gênero *Candida*, as micropartículas de OE de *L. sidoides* demonstraram atividade inibitória superior ao cetoconazol e quanto maior a proporção de goma arábica/ maltodextrina no material de parede maior foi a sua inibição *in vitro*. No presente estudo, a utilização de amido modificado como emulsificante alternativo à utilização de goma arábica trouxe resultados relevantes, pois as micropartículas de ambos os materiais de parede apresentaram poder inibitório semelhante. Também frente à espécie *A. niger*, nanopartículas de quitosana incorporando OE de cravo demonstraram capacidade antifúngica *in vitro* superior ao OE livre, tendo as micropartículas na concentração de 1,5 mg/mL inibido

completamente o crescimento dessa espécie fúngica (HASHEMINEJAD, KHODAIYAN & SAFARI, 2019).

O OE de *Lippia graveolens* microencapsulado em β-ciclodextrina apresentou atividade antibacteriana superior ao mesmo OE livre. Os autores sugerem que melhores efeitos inibitórios foram encontrados nas micropartículas, pois a microencapsulação promove um aumento da proporção de compostos antimicrobianos (voláteis) em relação a outros compostos presentes nos óleos essenciais (ARANA-SANCHEZ et al., 2010). Gonçalves et al. (2017) verificaram que o OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) encapsulado por coacervação complexa apresentou atividade inibitória frente à espécie *A. niger* na concentração de apenas 0,027 mg de óleo por mL de meio de cultura utilizado, sendo a CIM encontrada aproximadamente 10 vez inferior à CIM encontrada para o OE livre.

A verificação da atividade inibitória das micropartículas de óleos essenciais pelo método de exposição aos voláteis é ainda pouco avaliada em estudos, entretanto Soliman et al. (2013) analisaram a capacidade antifúngica da fase gasosa dos óleos essenciais de canela, tomilho e cravo, assim como de suas micropartículas, e puderam relatar que o processo de microencapsulação não comprometeu a atividade antifúngica, frente às espécies *A. niger* e *Fusarium verticillioides*, possuindo os óleos essenciais livres e as micropartículas porcentagens de inibição semelhantes.

A partir dos resultados encontrados nesse estudo e em estudos anteriores envolvendo a avaliação de micropartículas e óleos essenciais livres, pôde-se constatar que a microencapsulação de óleos essenciais é capaz de manter ou até mesmo aumentar a capacidade antimicrobiana dos óleos essenciais, atingindo algumas vezes tais objetivos a partir de doses inferiores àquelas utilizadas em óleos essenciais livres. Tal fenômeno pode ser justificado pelo fato da microencapsulação ser um processo que fornece uma barreira funcional do material encapsulado contra reações físicas e químicas nos óleos essenciais, mantendo assim suas características por um período maior e possibilitando a liberação controlada das substâncias voláteis (BAKRY et al., 2016).

5.4. Atividade inibitória do desenvolvimento fúngico em fatias de pão contidas em embalagens, através da exposição aos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e microencapsulado

5.4.1. Caracterização dos pães

O pão de leite de castanhas é produzido pela empresa Quinoa (Piracicaba/SP), sendo um de seus principais itens de comercialização por ser um produto artesanal, sem

glúten e com formulação diferenciada, constituída unicamente de ingredientes naturais. Contudo, possui uma vida útil limitada por não possuir conservantes sintéticos e a aplicação de óleos essenciais ou de suas micropartículas como conservantes pode ser uma interessante alternativa, considerando que os óleos essenciais são antimicrobianos naturais.

As análises físico-químicas do pão de leite de castanhas foram realizadas logo após o forneamento e resfriamento, a fim de caracterizar o produto em seu período inicial, anterior ao armazenamento (Tabela 5).

Tabela 5. Caracterização físico-química do pão de leite de castanhas artesanal sem glúten.

	Aw (interna)	**Aw (casca)**	**pH (interno + casca)**	**Umidade interna + casca (%)**
Valor após fabricação (D0)	0,97	0,90	5,87 ± 0,06	34,37 ± 2,0

Fonte: dados originais de pesquisa.

Legenda: Aw – atividade de água a 25 °C; pH – potencial hidrogeniônico

Rosenkvist & Hansen (1998) descreveram que pães convencionais e pão integral compõem a categoria de produtos de panificação de baixa acidez, onde o valor de pH varia entre 5,6 e 5,7. Para o pão de leite de castanhas sem glúten avaliado, o pH das amostras apresentou média de 5,87.

Dentre os produtos de panificação, Simpson (1995) os categoriza de acordo com a atividade de água, sendo divididos em: baixo teor de água (aw < 0,6), intermediário (aw entre 0,6 e 0,85) e alto teor de água (aw > 0,85). O pão de leite de castanhas apresenta alto teor de água, com umidade de 34,37% em base seca e aw entre 0,90 e 0,97. A variação na atividade de água ocorreu, pois na casca do pão a atividade de água é inferior à encontrada na parte interna, no miolo do pão.

A deterioração por micro-organismos é um dos problemas que mais afetam os produtos de panificação e ocorrem principalmente naqueles que apresentam maior teor de água. Ainda, em valores de atividade de água acima de 0,94 praticamente todas as espécies de bolores, leveduras e bactérias apresentam condições favoráveis de crescimento (SMITH et al., 2004), explicando assim o porquê produtos com essa característica apresentam vida útil mais limitada.

5.4.2. Atividade antifúngica do óleo essencial livre e encapsulado nos pães

Inicialmente, foi verificada a ação inibitória da CIM encontrada *in vitro* (300 µL/L) das micropartículas de OE de *L. sidoides*, as quais foram inseridas em um recipiente fechado com as fatias de pão inoculadas para difusão dos compostos voláteis. Contudo, os pães submetidos ao tratamento correspondente a CIM observada *in vitro* apresentaram crescimento micelial já em 3 dias de armazenamento, com tamanhos de halo semelhantes aos formados nas fatias pertencentes ao tratamento controle, não apresentando assim a atividade antifúngica esperada. De acordo com Lee et al (2018), a atividade antimicrobiana de óleos essenciais por difusão de compostos voláteis tende a ser menor quando aplicada em matrizes alimentares, em comparação à sua atividade inibitória *in vitro*.

Partindo-se então dos resultados preliminares com a CIM de 300 µL/L, outros testes foram realizados com uma dose 5 vezes superior a CIM encontrada, ou seja, 1500 µL/L de ar livre dentro das embalagens. Doses extremamente elevadas e maiores que as determinadas não foram avaliadas a fim de evitar maiores influências sensoriais e minimizar riscos de toxicidade pela elevada concentração de OE no sistema. Ainda assim, mesmo a dose de 1500 µL/ L não foi capaz de inibir completamente o crescimento fúngico da espécie inoculada nas fatias de pão, entretanto foi a que proporcionou menores halos de crescimento em comparação às amostras controle. Portanto, a dose de 1500 µL/L foi selecionada para dar continuidade nos testes e, adicionalmente outro tratamento com a mesma dose de OE livre foi avaliado, a fim de comparar sua eficiência em relação às micropartículas. Considerando que nos experimentos *in vitro* a utilização das micropartículas sem a presença de OE não interferiu no crescimento micelial das repetições do tratamento controle, nos experimentos realizados nas fatias de pão as mesmas não foram inseridas no tratamento controle.

Os valores de crescimento micelial, assim como da porcentagem de inibição ao final do período, são apresentados na tabela abaixo (Tabela 6). Como relatado anteriormente, a dose de micropartículas de OE de *L. sidoides* utilizada não foi capaz de impedir totalmente o crescimento fúngico nas fatias de pão, contudo apresentou uma porcentagem de inibição de 31,28%, demonstrando assim que as micropartículas apresentaram uma ação inibitória, mesmo que fraca, nas fatias de pão. Em paralelo, a difusão de compostos voláteis do OE livre dentro do recipiente apresentou um maior desempenho inibitório, considerando que o crescimento micelial ao final do período de 7 dias foi significativamente menor em comparação às amostras do tratamento controle, com uma porcentagem de inibição de 72,13%. Observou-se visualmente que os tratamentos tanto com óleo livre como encapsulado proporcionaram uma diminuição da incidência de fungos contaminantes que

surgiam no decorrer do tempo de incubação (Figura 10), mostrando, portanto uma atividade antifúngica sobre outras espécies fúngicas contaminantes de pães.

Tabela 6. Crescimento micelial e inibição do crescimento fúngico em fatias de pão incubados por 7 dia a 25 °C e expostas aos compostos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado.

Tempo (dias)	Crescimento micelial (cm)		
	Controle	OE livre (1500 µL/ L)	Micropartículas (1500 µL de óleo retido/ L)
0	0 ± 0,00[a]	0 ± 0,00[a]	0 ± 0,00[a]
3	1,06 ± 0,86[a]	0 ± 0,00[a]	0,94 ± 0,68[a]
5	2,13 ± 0,95[a]	0,5 ± 0,12[b]	1,63 ± 1,48 [a,b]
7	2,94 ± 0,85[a]	0,82 ± 0,63[b]	2,02 ± 1,03 [a,b]
P.I. (%) em 7 dias	0	72,13	31,28

Fonte: dados originais de pesquisa.

Legenda: OE (óleo essencial); PI: porcentagem de inibição calculada no último dia de armazenamento.

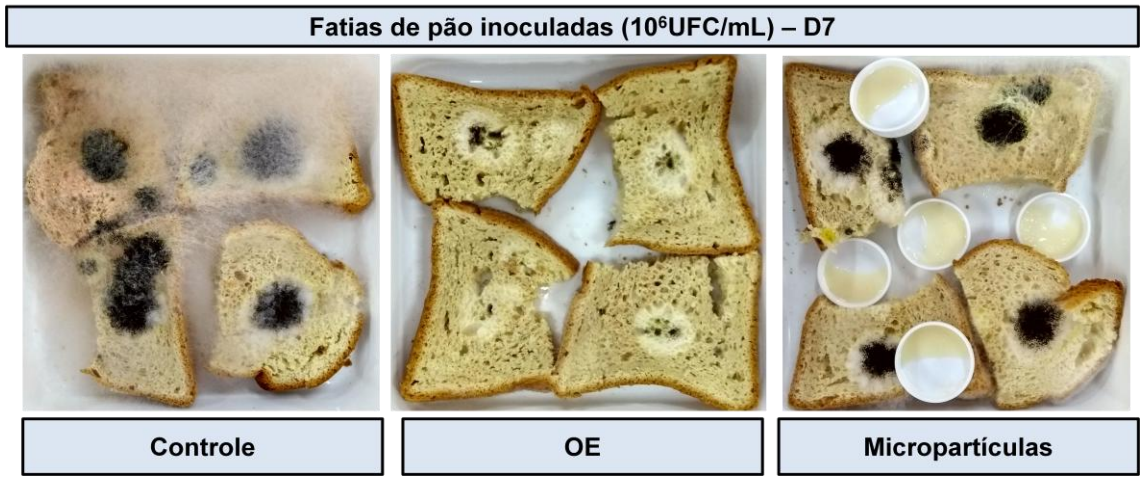


Figura 10. Crescimento fúngico visível ao sétimo dia (D7) de incubação a 25 °C das fatias de pão inoculadas com a espécie *A. niger* e expostas aos voláteis do OE de L. sidoides livre e encapsulado.

A verificação visual de crescimento fúngico nas fatias de pão também foi realizada. As fatias de pão não inoculadas e inoculadas (10^6 UFC/mL) com a espécie *A. niger* foram analisadas quanto à presença visual e ocorrência de espécies fúngicas sobre as fatias de pães, sendo então considerada a porcentagem de área contaminada nas fatias (Tabela 7). Através desses parâmetros relata-se que as fatias não inoculadas e expostas aos compostos voláteis do OE livre apresentaram menor incidência de crescimento fúngico, o qual ocorreu no sétimo dia de armazenamento aproximadamente (Figura 11). Contudo, as fatias de pão submetidas à difusão de voláteis das micropartículas, mesmo que não

inoculadas, apresentaram porcentagem de contaminação semelhante às fatias de pão do tratamento controle, o que demonstra que as micropartículas de fato apresentaram fraca ou nenhuma ação conservante sobre essa matriz alimentar quando expostas à atmosfera interna das embalagens. Foi possível observar também que nas fatias não inoculadas outras espécies fúngicas cresceram durante o período de armazenamento.

Tabela 7. Potencial inibitório dos compostos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado sobre fatias de pão, inoculadas e não inoculadas, incubadas a 25 °C por 7 dias.

Tempo (dias)	Inoculado 10^6UFC/mL			Não inoculado		
	Controle	OE livre (1500 µL/ L)	Micropartículas (1500 µL de óleo retido/ L)	Controle	OE livre (1500 µL/ L)	Micropartículas (1500 µL de óleo retido/ L)
0	-	-	-	-	-	-
3	+	-	+	+	-	+
5	+++	+	++	++	-	++
7	++++	+	+++	+++	+	+++

Fonte: dados originais de pesquisa.
Legenda: - (nenhum crescimento); + (<25%); ++ (25 a 50%); +++ (50 a 75%) e ++++ (>75%)

Figura 11. Crescimento fúngico ao sétimo dia (D7) de armazenamento das fatias de pão não inoculadas a 25 °C, submetidas aos voláteis do OE de *L. sidoides* livre e encapsulado.

5.5. Influência sensorial do óleo essencial livre e encapsulado

A fim de minimizar a influência do OE sobre as características organolépticas dos pães, optou-se pela verificação de atividade antimicrobiana dos compostos voláteis do OE no ar livre presente nas embalagens e assim, não havendo aplicação direta na massa. No entanto, a metodologia sensorial de diferença do controle foi aplicada ao final do estudo, a fim de verificar se a presença dos voláteis do OE e das micropartículas dentro das

embalagens possui influência sobre características organolépticas como cor, aparência e aroma dos pães após 24 h de exposição.

O teste de diferença do controle foi realizado no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', localizada na cidade de Piracicaba (SP). Foram recrutados 54 consumidores (76% gênero feminino e 24% gênero masculino) com faixa etária entre 18 e 50 anos de idade. Os participantes foram questionados a respeito do consumo de pães de forma e pães sem glúten, onde 98% da população avaliada consomem ao menos uma vez ao mês pão de forma e apenas 13% consomem ao menos uma vez ao mês pães sem glúten.

O aroma das amostras avaliadas foi o atributo que mais as diferiu da amostra padrão, sendo óleo essencial livre (OE) o tratamento que apresentou maior diferença de aroma e possivelmente de sabor nas fatias de pão (Tabela 8). Outros atributos como cor, aparência e aspecto geral das fatias de pão não apresentaram diferença significativa nas amostras contendo o OE livre e as micropartículas dentro das embalagens.

Tabela 8. Resultados médios do Teste de Diferença do Controle de acordo com cada atributo das fatias de pão submetidas a diferentes tratamentos pelo período de 24 horas.

Tratamento	**Atributos**			
	Cor	**Aparência**	**Aroma**	**Aspecto geral**
Controle	1,09 $^{n/s}$	0,78 $^{n/s}$	1,30 $^{n/s}$	1,26 $^{n/s}$
OE	1,76 $^{n/s}$	2,15 $^{n/s}$	8,33 **	5,22 $^{n/s}$
Micropartículas	2,11 $^{n/s}$	2,74 $^{n/s}$	6,39 *	4,31 $^{n/s}$

Fonte: dados originais de pesquisa.

Legenda: * diferença estatística com p>0,05; ** diferença estatística com p>0,01.

Durante a avaliação sensorial, uma ordenação de aceitação das amostras também foi solicitada, sendo mais aceito pelos participantes o tratamento controle (semelhante ao padrão), seguido do tratamento com as micropartículas e por último o tratamento com o OE livre. Os consumidores caracterizaram o aroma das fatias de pão submetidas ao OE livre como "forte", "artificial" e "ardido", relatando assim que a amostra desse tratamento não possuía o aroma característico de pão. Em relação ao tratamento com as micropartículas, foi relatado um aroma diferente do aroma característico de pão, entretanto os consumidores descreveram tal aroma como "agradável" e "fresco".

Os participantes foram ainda questionados a respeito de atributos percebidos nas amostras que considerassem diferentes da amostra padrão. Dentre as 51 citações (Figura 12), os atributos mais frequentes foram: cítrico, orégano, condimento (incluindo tempero e especiarias), óleo essencial, eucalipto, alecrim e ervas. Atributos de aroma mais

relacionados ao aroma de pão foram também citados como “fermentado” e “panetone”, contudo a maioria dos atributos relacionava-se às características de aroma do OE.

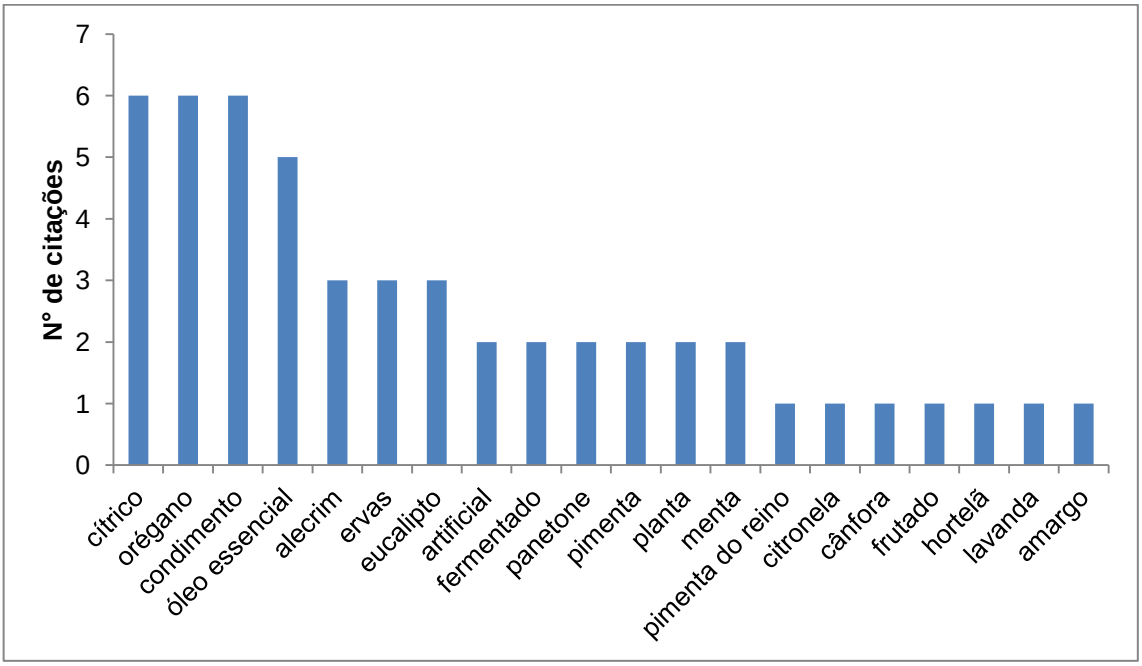


Figura 12. Levantamento de atributos de aroma referentes às fatias de pão submetidas aos tratamentos com OE livre e micropartículas por 24h.

Do mesmo modo, vegetais prontos para consumo os quais foram mergulhados em soluções contendo óleos essenciais de orégano, manjericão, erva-cidreira e tomilho apresentaram atributos de sabor mais ácidos e aroma intenso de ervas (GUTIERREZ, RODRIGUEZ, BARRY-RYAN & BOURKE, 2008).

Outros estudos sensoriais com pães e fatias de pães submetidos ao vapor de óleos essenciais foram realizados. Krisch e et. al (2013) relataram que a exposição de pães aos vapores do OE de manjerona e sálvia (30µL por placa com fatia) afetou consideravelmente a aceitação das amostras, tendo apresentado sabor e odor estranhos e inaceitáveis para os consumidores. Um teste triangular foi aplicado a fim de verificar a diferença sensorial entre amostras de pão submetidas ao vapor do OE de orégano e capim-limão, no qual os pães tratados com a menor concentração (125 µL /L) de OE obtiveram aceitação até o 11º dia de tratamento. No entanto, foram descritas características de sabor picante no pão tratado com OE de orégano e sabor cítrico no pão tratado com OE de capim-limão (CÍSAROVÁ et al., 2020).

Em contrapartida, resultados positivos foram encontrados na avaliação sensorial de outros óleos essenciais em pães. Fatias de pão sem glúten expostas ao OE de canela apresentaram pontuações de aceitação de sabor e aroma significativamente iguais àquelas obtidas no tratamento controle (GUTIERREZ et al., 2011). Amostras de pães submetidas ao

vapor do OE de capim-limão (500 e 1000 µL/L) não apresentaram diferença estatística de aceitação, sendo o tratamento com 500 µL/L o mais aceito pelos provadores (MANI-LÓPEZ, VALLE-VARGAS, PALOU, & LÓPEZ-MALO, 2018).

O aroma intenso dos óleos essenciais pode interferir negativamente nas características organolépticas das matrizes alimentares e ultrapassar o limiar de aceitação dos consumidores (LV, LIANG, YUAN & LI, 2011). Ainda, é relatado que o impacto dos óleos essenciais nas características sensoriais de um produto dependerá fortemente da compatibilidade de aromas entre ambos sendo, por exemplo, o OE de limão melhor aceito que outros óleos essenciais, quando aplicado em alimentos de caráter cítrico (ESPINA, GARCÍA-GONZALO & PAGÁN, 2014).

A associação de dois ou mais óleos essenciais para redução dos impactos sensoriais nas matrizes alimentares é uma alternativa interessante, visto que os óleos essenciais podem ainda apresentar efeito sinergístico na ação antimicrobiana em alimentos. O uso do OE de mostarda isolada em fatias de pão resultou em uma baixa aceitação sensorial, contudo quando associado ao OE de canela a influência sensorial nos pães foi consideravelmente reduzida, sendo ainda capaz de inibir o crescimento fúngico durante o período de armazenamento (CLEMENTE, AZNAR & NERÍN, 2019).

Em relação ao produto avaliado nesse estudo, pão de leite de castanhas sem glúten, a presença dos compostos voláteis do OE e das micropartículas nas embalagens influenciou significativamente em suas propriedades organolépticas, comprometendo os atributos originais de aroma de pão e agregando novos atributos de aroma referentes aos óleos essenciais, como citado anteriormente.

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito inibitório da exposição aos voláteis do OE de *L. sidoides* sobre o crescimento fúngico em pães

De acordo com informações do fabricante, os pães de leite de castanhas, sem adição de conservantes e armazenado a temperatura ambiente (± 25 °C) possuem uma vida útil de 3 dias. A exposição das fatias de pão aos compostos voláteis do OE de *L. sidoides* livre promoveu um aumento de aproximadamente 3 dias de vida útil (sem crescimento fúngico visível) nas fatias de pão não inoculadas e ainda, uma redução no crescimento de *A. niger* inoculado nas fatias durante o período de armazenamento. Císarová et al. (2020) observaram que frente às espécies de *Aspergillus sp.* inoculadas em pães, os óleos essenciais testados obtiveram uma redução de 50% da população microbiana nas doses que variaram entre 70,26 a 488,90 µL/ L enquanto que a redução de 90% da população microbiana foi encontrada entre as doses de 134,12 a 866,27 µL/ L. Passarinho et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica do OE de orégano incorporado em sachês em embalagens com fatias de pão e relataram que, apesar de não haver uma diferença significativa entre os tratamentos ao final do período de armazenamento, a contagem de bolores e leveduras foi menor nas amostras expostas aos voláteis do OE. Pães inoculados com três espécies fúngicas, entre elas *A. niger*, não apresentaram nenhum crescimento fúngico durante 30 dias quando foram submetidos ao vapor do OE de mostarda preta (*Brassica nigra*) na dose de 47µL/L (MEJÍA-GARIBAY et al., 2015). A inserção de 1µL do óleo de mostarda por placa contendo fatias de pão incubadas a 25 °C por 7 dias apresentou uma redução significativa do crescimento fúngico em comparação ao tratamento controle. No mesmo estudo, o tratamento com OE em fatias não inoculadas não apresentou crescimento fúngico em até 10 dias de armazenamento, enquanto que nesse mesmo dia as fatias do tratamento controle já estavam completamente tomadas por bolores (CLEMENTE, AZNAR & NERÍN, 2019).

A dose utilizada para conservação das fatias de pão no presente estudo foi relativamente alta em comparação às doses citadas na literatura. Contudo, é importante ressaltar que mesmo nos experimentos *in vitro* do presente estudo doses mais elevadas (300 e 400µL/L) foram requeridas a fim de atingir a completa inibição de *A. niger* nas placas. Krisch et al. (2013) avaliaram a atividade antifúngica dos óleos essenciais de manjerona e sálvia (30 µL/ placa) frente as espécies *A. niger, P. chrysogenum e Rhizopus* spp. em fatias de pães e relataram que os óleos essenciais são capazes de inibir e reduzir significativamente o crescimento de todos os bolores investigados pelas fatias de pão tratadas com vapor dos óleos essenciais. No entanto, os autores ressaltam que *A. niger* foi o

inóculo mais resistente, apresentando apenas um ligeiro aumento de 1 a 2 dias de vida útil nos pães, dependendo do OE utilizado.

No presente estudo, os resultados da avaliação antifúngica em pães mostram que os óleos essenciais apresentaram atividade inibitória somente quando aplicados em doses superiores às avaliadas nos experimentos *in vitro*. A mesma observação é relatada em outros estudos verificando a ação dos vapores de óleos essenciais em produtos de panificação, os quais relatam que as doses ótimas encontradas nos experimentos *in vitro* não apresentaram o mesmo desempenho *in vivo* (Clemente, Aznar & Nerín, 2019; Císarová et al., 2020).

Rattanachaikunsopon & Phumkhachorn (2010) observaram que maiores concentrações de carvacrol e cimeno foram necessárias para inibir o crescimento bacteriano em matrizes alimentares com maior complexidade de nutrientes e ricas em lipídeos. Os autores argumentam que pelo fato de óleos essenciais serem hidrofóbicos, os mesmos tendem a interagir com moléculas lipídicas na matriz alimentar, reduzindo assim sua interação com moléculas hidrofílicas, onde há condições favoráveis ao crescimento microbiano. Carboidratos presentes em matrizes alimentares também podem influenciar na redução da capacidade antimicrobiana de óleos essenciais (GUTIERREZ, BARRY-RYAN & BOURKE, 2008).

Além disso, a estrutura aerada das fatias de pão pode ter permitido a penetração da suspensão de esporos, dificultando assim a ação dos voláteis presentes na atmosfera das embalagens, os quais possuem ação mais limitada à superfície dos pães. Lee et al. (2018) relatam as mesmas limitações quando submeteram folhas de radiche ao vapor de diferentes óleos essenciais. Os autores afirmam que, apesar dos experimentos *in vitro* demonstrarem uma efetiva atividade antifúngica dos óleos essenciais por exposição aos voláteis, quando submetidos ao sistema *in vivo* a suspensão de inóculo pode ter sido internalizada ou infiltrada nas folhas de radiche, sendo então reduzido o efeito dos gases sobre o mesmo. Pães submetidos aos voláteis do OE de capim-limão (750µL/ L) tiveram uma considerável redução do crescimento micelial de *Penicillium expansum* na casca dos pães pelo período de 21 dias, contudo foi observado que a espécie fúngica encontrou condições favoráveis de crescimento na parte interna (miolo) dos pães nesse mesmo período (MANI-LÓPEZ, VALLE-VARGAS, PALOU, & LÓPEZ-MALO, 2018).

6.2. Influência da microencapsulação sobre o efeito inibitório do OE de *L. sidoides* nas fatias de pão

A encapsulação de óleos essenciais vem sendo realizada para aplicação em embalagens de alimentos, como uma alternativa ao uso do OE livre, o qual é mais susceptível a reações de oxidação pela presença de oxigênio, luz, umidade e altas temperaturas (RIBEIRO-SANTOS, ANDRADE E SANCHES-SILVA, 2017).

No presente estudo, as fatias de pão inoculadas que foram submetidas ao tratamento com as micropartículas não apresentaram uma extensão de vida útil durante o período de armazenamento e nas condições avaliadas. Também nas fatias não inoculadas, a incidência de crescimento fúngico foi semelhante às fatias submetidas ao tratamento controle, sem adição de nenhum conservante. O desempenho das micropartículas nas fatias de pão difere dos resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, no qual as micropartículas depositadas na tampa das placas de Petri apresentaram um efeito inibitório satisfatório e CIM inferior a 300 µL/L, sendo tal dose inibitória inferior à encontrada pelo método de exposição aos voláteis utilizando-se o OE livre (inferior a 400 µL/L).

Até o momento, nenhum estudo foi realizado a fim de verificar a influência dos voláteis provenientes das micropartículas do OE de *L. sidoides* na atmosfera interna das embalagens. Contudo, diferentes métodos e outros óleos essenciais vêm sendo avaliados em produtos de panificação. Donsí et al. (2016) relataram que poucos estudos foram realizados até o momento com aplicações de nanoemulsões de óleos essenciais em matrizes alimentares, contudo demonstram que os métodos de aplicações já reportados podem ser divididos em: adição direta, pulverização sobre a superfície, recobrimentos com as nanoemulsões incorporadas aos biopolímeros de embalagens e difusão em matrizes alimentares porosas.

Gonçalves et al. (2017) avaliaram a ação antimicrobiana de micropartículas de OE de tomilho (*Thymus vulgaris*) em solução de álcool de cereais pulverizada sobre a superfície de bolos e puderam constatar que o tratamento com as micropartículas foi capaz de aumentar em até 15 dias a vida útil do produto, período semelhante ao encontrado para a solução com mesma dose de OE livre pulverizado. A adição de micropartículas de OE de alecrim na concentração de 1,5% em massas de pão promoveu uma maior redução na contagem de bolores e leveduras em relação ao tratamento com OE e ao tratamento controle durante o período de armazenamento de 8 dias (TEODORO et al., 2014).

Uma hipótese para a resposta inibitória fraca das micropartículas sobre as fatias de pão é a de que a liberação gradativa dos compostos voláteis proporcionada pelo processo de microencapsulação do OE possa ter impossibilitado que a concentração de antimicrobianos na atmosfera interna dos recipientes fosse alta o suficiente para agir sobre o

inóculo durante sua fase lag (inicial), momento crucial para a inibição efetiva do micro-organismo.

A efetiva liberação de compostos voláteis provenientes de materiais encapsulados como os óleos essenciais depende diretamente de fatores como: características físico-químicas do material encapsulante, pressão de vapor dos compostos voláteis do OE em questão, mecanismo de ação do antimicrobiano frente ao micro-organismo e principalmente a umidade dentro das embalagens dos alimentos, a qual pode ser um fator determinante para liberação de compostos voláteis encapsulados (DEL TORO-SÁNCHEZ et al., 2010).

Contudo, grande parte dos estudos avalia a liberação de compostos das micropartículas quando inseridas em meio líquido ou incorporadas em filmes plásticos em embalagens. Uma investigação mais aprofundada a respeito da liberação dos compostos voláteis das micropartículas na atmosfera interna de embalagens durante o período de armazenamento se faz necessária, assim como a verificação da retenção de compostos voláteis nas matrizes alimentares após um determinado período de exposição ao OE.

7. CONCLUSÃO

O OE de *L. sidoides* apresentou atividade antifúngica *in vitro* frente à espécie *A. niger*, pelo método de diluição em ágar assim como pelo método de exposição aos compostos voláteis. A microencapsulação por *spray drying* do OE não alterou seu perfil químico e não comprometeu a atividade antifúngica *in vitro*, considerando ainda que as micropartículas apresentaram CIM inferior à encontrada com o OE livre. A associação de maltodextrina e amido modificado, assim como a goma arábica, apresentaram taxas semelhantes de eficiência de encapsulação e características das micropartículas, contudo o custo e a disponibilidade limitada da goma arábica foi um fator decisivo na escolha das micropartículas de maltodextrina/amido modificado para os experimentos *in vivo*. Contrariamente aos resultados encontrados nos experimentos *in vitro*, os compostos voláteis das micropartículas liberados nos recipientes com fatias de pão não foram capazes de aumentar sua vida útil, contudo uma inibição significativa do crescimento foi observada nas fatias expostas ao vapor do OE livre. As micropartículas, e principalmente o OE livre, apresentaram uma influência sensorial sobre o pão na dosagem avaliada, conferindo características de aroma relacionadas ao OE, diferenciando-se assim do aroma original de pão. Para futuros trabalhos, sugere-se uma investigação mais detalhada a respeito da liberação dos compostos voláteis do OE livre e das micropartículas nas embalagens durante o período de armazenamento dos pães. Sugere-se ainda a avaliação de outros métodos de aplicação das micropartículas do OE de *L. sidoides* em matrizes alimentares assim como a verificação de outras técnicas de encapsulação de óleos essenciais para utilização como conservantes em embalagens de pães.

REFERÊNCIAS

ABIMAP. Associação Brasileira das Indústrias de Biscoitos, Massas Alimentícias e Pães & Bolos Industrializados. Disponível em: https://abimapi.com.br/estatistica-paes-bolos.php. Acesso em: 04 de fevereiro de 2020.

ABREU, F. O., OLIVEIRA, E. F., PAULA, H. C., & DE PAULA, R. C. Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. **Carbohydrate polymers**, v. 89, n. 4, p. 1277-1282, 2012.

ALIGIANNIS, N., KALPOUTZAKIS, E., MITAKU, S., CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species.**Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALOUI, H., KHWALDIA, K., LICCIARDELLO, F., MAZZAGLIA, A., MURATORE, G., HAMDI, M. Efficacy of the combined application of chitosan and locust bean gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by Aspergillus flavus in dates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 170, p. 21–28. 2014.

ALVIM, I. D., STEIN, M. A., KOURY, I. P., DANTAS, F. B. H., & CRUZ, C. L. D. C. V. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT-food science and technology**, v. 65, p. 689-694, 2016.

ARANA-SÁNCHEZ, A., ESTARRÓN-ESPINOSA, M., OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N., PADILLA-CAMBEROS, E., SILVA-VÁZQUEZ, R., & LUGO-CERVANTES, E. . Antimicrobial and antioxidant activities of Mexican oregano essential oils (Lippia graveolens HBK) with different composition when microencapsulated in β-cyclodextrin.**Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 585-590, 2010.

ASBAHANI, A.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; ADDI, E.H.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, ed. 1–2, 2015.

ASIOLI, D.; WITZEL-ASCHEMANN, J.; CAPUTO, V.; VECCHIO, R.; ANNUNZIATA, A.; NAES, T.; VARELA, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behaior and discussion of industry implications. **Food Research International**, v. 99, Parte 1, p. 58-71, 2017.

AXEL, C.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. Mold spoilage of bread and its biopreservation: A review of current strategies for bread shelf life extension. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57:16, p. 3528-3542, 2017.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review, **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, ed. 2, 2008.

BAKRY, A. M., ABBAS, S., ALI, B., MAJEED, H., ABOUELWAFA, M. Y., MOUSA, A., & LIANG, L. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2016.

BATTOCHIO, J. R. et al. Sensorial Profile of Wholewheat Bread. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

BEDOYA-SERNA, C. M.; DACANAL, G.C.; FERNANDES, A.M.; PINHO, S.C. Antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano (Origanum vulgare) essential oil: in vitro study and application in Minas Padrão cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 929-935, 2018.

BERTOLINI, A.C., SIANI, A.C. AND GROSSO, C.R.F. Stability of monoterpenes encapsulated in gum arabic by spray-drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.2, p.780-785, 2001.

BHANDARI, B. R., DUMOULIN, E. D., RICHARD, H. M. J., NOLEAU, I., & LEBERT, A. M. Flavor encapsulation by spray drying: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 1, p. 217-221, 1992.

BHANDARI, B.R.; D'ARCY, B.R.; BICH, L.L.T. Lemon oil to β-Cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β-Cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v.46, p.1494–1499, 1998.

BORAH, A.; PAW, M.; GOGOI, R.; LOYING, R.; SARMA, N.; MUNDA, S.; PANDEY, S. K.; LAL, M. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial and in-vitro cytotoxic efficacy of essential oil of Curcuma caesia Roxb. leaves: An endangered medicinal plant of North East India, **Industrial Crops and Products**, v. 129, 2019.

BOTELHO, M.A. et al . Antimicrobial activity of the essential oil from *L. sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biolological Research**, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC nº 383, de 05 de agosto de 1999. "Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de Alimentos 7-Produtos de Panificação e Biscoitos. Diário Oficial da União, Brasilia, 09 de agosto de 1999. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br. Acesso em: 11 de janeiro de 2020.

BRASIL. Portaria RDC nº 263, de 23 de setembro de 2005. Aprova Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.Disponívelem:http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0263_22_09_2005.html.Acesso em: 11 de janeiro de 2020.

BRASIL. RDC Nº 2, DE 15 DE JANEIRO DE 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b. Acesso em: 11 de janeiro de 2020.

BRASIL. **Monografia da espécie *L. sidoides* (Alecrim pimenta)**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. 2014.

BRIDGES, A. N. N. E. AACC International Approved Methods of Analysis--Highlights of the 2009 Meetings of the Codex Committee for Methods of Analysis and Sampling. **Cereal Foods World (CFW)**, v. 54, n. 3, p. 136, 2009.

BRUTTEL, Peter; SCHLINK, Regina. Water determination by Karl Fischer titration. **Metrohm monograph**, v. 8, n. 026, p. 50003, 2003.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, **Journal of Food Engineering**, v. 104, ed. 4, p. 467-483, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CAUVAIN, S.P., YOUNG, L.S. Bread Spoilage and Staling. In: Technology of Breadmaking, 2ed. Springer International Publishing, NY. 272-292. 2007.

CABRAL, L.; PINTO, V.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. **International Journal of Food Microbiology**,v. 166, ed. 1, p. 1-14, 2013.

CARNEIRO, H. C., TONON, R. V., GROSSO, C. R., & HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.

CÍSAROVÁ, M.; HLEBA, L.; MEDO, J.; TANČINOVÁ, D.; MAŠKOVÁ, Z.; ČUBOŇ, J. KOVÁČIK, A.; FOLTINOVÁ, D.The in vitro and in situ effect of selected essential oils in vapour phase against bread spoilage toxicogenic aspergilli. **Food Control**, p. 107007, 2020.

CLEMENTE, I.; AZNAR, M.; NERÍN, C.. Synergistic properties of mustard and cinnamon essential oils for the inactivation of foodborne moulds in vitro and on Spanish bread. **International journal of food microbiology**, v. 298, p. 44-50, 2019.

CORNEA, C.P.; CIUCA,M; VOAIDES,C.; GAGIU, V.; POP, A. Incidence of fungal contamination in a Romanian bakery: A molecular approach. **Romanian Biotechnological Letters**. v. 16, p. 5863–5871, 2011.

COSTA, J. M. G.; BORGES, S. V.; HIJO, A. A. C. T; SILVA, E. K.; MARQUES, G. R.; CIRILLO, M. A.; AZEVEDO, V. M. D. Matrix structure selection in the microparticles of essential oil oregano produced by spray dryer. **Journal of microencapsulation**, v. 30, n. 8, p. 717-727, 2013.

COSTA, R.A.; CAVALCANTE, T.T.A.; MELO, C.T.V; BARROSO, D.L.A.; MELO, H.M.; CARVALHO, M.G.; JÚNIOR, F.E.A.C. Antioxidant and antibacterial activities of essential oil of *L. sidoides* against drug-resistant *Staphylococcus aureus* from food. **African Journal of Biotechnology,** v.17, p.232-238, 2018.

DAGNAS, S.; ONNO, B.; MEMBRÉ, J. Modeling growth of three bakery product spoilage molds as a function of water activity, temperature and pH, **International Journal of Food Microbiology**, v. 186, p. 95-104, 2014.

DE BILLERBECK, Virginia G. et al. Effects of Cymbopogon nardus (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of Aspergillus niger. **Canadian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 9-17, 2001.

DEBONNE, E.; VAN BOCKSTAELE, F.; DE LEYN, I.; DEVLIEGHERE, F.; EECKHOUT, M.. 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**, v. 87, p. 368-378, 2018.

DEBONNE, E.; BOCKSTAELE, F. V.; SAMAPUNDO, S.; EECKHOUT, M.; DEVLIEGHERE, F. The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products, **Journal of Essential Oil Research**, v.30, Ed. 5, p. 309-318, 2018.

DEL TORO-SÁNCHEZ, C.L., AYALA-ZAVALA, J.F., MACHI, L., SANTACRUZ, H.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β-cyclodextrin capsules. **Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry,** v. 67, p. 431–441, 2010.

DIMA, C. & DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity, **Current Opinion in Food Science**, v. 5, 2015.

DONSÌ, F.; ANNUNZIATA, M.; SESSA, M.; FERRARI, G. Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods, **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, ed. 9, p. 1908-1914, 2011.

DOS SANTOS, C.P., DE OLIVEIRA, T.C., PINTO, J.A.O., FONTES, S.S., CRUZ, E.M.O., DE FÁTIMA, ARRIGONI-BLANK, M.,INNECCO, R. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *L. sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**. v. 76, p. 416–421, 2015.

ESFANJANI, A. F.; JAFARI, S. M.. Biopolymer nano-particles and natural nano-carriers for nano-encapsulation of phenolic compounds. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 532-543, 2016.

ESPINA, L.; GARCÍA-GONZALO, D.; PAGÁN, R. Impact of essential oils on the taste acceptance of tomato juice, vegetable soup, or poultry burgers. **Journal of food science**, v. 79, n. 8, p. S1575-S1583, 2014.

ESWARAN, S., MUIR, J., & CHEY, W. D. Fiber and functional gastrointestinal disorders. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 108, p. 718 - 727. 2013.

Euromonitor International. 2017. Ingredients in Bread: Fresh Recipes for a Stale Industry. Disponível em: https://blog.euromonitor.com/ingredients-bread-industry/. Acesso em: 18 de janeiro de 2020.

FDA. Estados Unidos. Food and Drug Administration. **Code of Federal Regulations. Bakery Products.** Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=136.110. Acesso em: 15 de janeiro de 2020.

FDA. **Substances Generally Recognized as Safe.** Sec. 182.20 Essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Code of Federal Regulations, 21CFR182.20, Title 21, Volume 3. 2020.

FERNANDES, L. P., TURATTI, I. C., LOPES, N. P., FERREIRA, J. C., CANDIDO, R. C., & OLIVEIRA, W. P Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of L. sidoides essential oil. **Drying Technology**, v. 26, n. 12, p. 1534-1542, 2008.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying microencapsulation of L. sidoides extracts in carbohydrate blends. **Food and bioproducts processing**, v. 90, n. 3, p. 425-432, 2012.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil, **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524-532, 2014.

FERREIRA, T.P.S.; MOURÃO, D.S.C.; SANTOS, G.R.; GUIMARÃES, L.G.L.; PIRES, E.C.F.; SANTOS, W.F.; AGUIAR, R.W.S. Fungistatic activity of essential oil of *L. sidoides* Cham. against *Curvularia lunata*. **African Journal of Agricultural Research.** v.13, p. 704-713, 2018.

FONTENELLE, R. O. S.; MORAIS, S. M.; BRITO, E. H. S.; KERNTOPF, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; TOMÉ, A. R.; QUEIROZ, M. G. R.; NASCIMENTO, N. R. F.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *L. sidoides* Cham., **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, ed. 5, p. 934–940, 2007.

FONTES, M.G.; COSTA-CARVALHO, R.R.; COELHO, I.L.; ARAÚJO, E.R.; CARVALHO FILHO, J.L.S.; LARANJEIRA, D.; BLANK, A.F.; MELO, J.O.; ALVES, P.B. Effect of essential oils from plants of the genus Lippia on Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici. In: **III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants and III Conference of National Institute of Science and 1198**. p. 35-40. 2012.

FRANZ C, NOVAK J. Sources of essential oils**. Handbook of Essential Oils:Science, Technology, and Applications**, p.39-73, 2010.

GAGNETEN, M., CORFIELD, R., MATTSON, M. G., SOZZI, A., LEIVA, G., SALVATORI, D., & SCHEBOR, C. Spray-dried powders from berries extracts obtained upon several processing steps to improve the bioactive components content. **Powder technology**, v. 342, p. 1008-1015, 2019.

GHADERI-GHAHFAROKHI, M.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M.A.; AZIZI, M.H. Nanoencapsulation approach to improve antimicrobial and antioxidant activity of thyme essential oil in beef burgers during refrigerated storage. **Food Bioprocess Technology,** ed. 9(7), p.1187-1201, 2016.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food research international**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GONÇALVES, N. D., DE LIMA PENA, F., SARTORATTO, A., DERLAMELINA, C., DUARTE, M. C. T., ANTUNES, A. E. C., & PRATA, A. S. Encapsulated thyme (Thymus vulgaris) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food research international**, v. 96, p. 154-160, 2017.

GUARDA, A., RUBILAR, J. F., MILTZ, J., & GALOTTO, M. J. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. **International journal of food microbiology**, v. 146, n. 2, p. 144-150, 2011.

GUIMARAES, L.C. **Métodos de preservação de fungos potencialmente toxigênicos**. 2011. Dissertação de mestrado em Ciência dos Alimentos. Universidade Ferderal de Lavras. 2011.

GUIMARÃES, L. G. L.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, R. M.; ZACARONI, A. B.; DOS SANTOS, G. R. Óleo essencial de *L. sidoides* nativas de Minas Gerais: Composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 267-275, 2014.

GUTIERREZ, J., RODRIGUEZ, G., BARRY-RYAN, C., & BOURKE, P. Efficacy of plant essential oils against foodborne pathogens and spoilage bacteria associated with ready-to-eat vegetables: antimicrobial and sensory screening. **Journal of food protection**, v. 71, n. 9, p. 1846-1854, 2008.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International journal of food microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

GUTIÉRREZ, L., BATLLE, R., ANDÚJAR, S., SÁNCHEZ, C., & NERÍN, C. Evaluation of antimicrobial active packaging to increase shelf life of gluten-free sliced bread. **Packaging Technology and Science**, v. 24, n. 8, p. 485-494, 2011.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F.; SAFARI, M. Improving the antifungal activity of clove essential oil encapsulated by chitosan nanoparticles. **Food chemistry**, v. 275, p. 113-122, 2019.

VERAS, H.N.H.; RODRIGUES, F.F.G.; COLARES, A.V.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M. BOTELHO, M.A.; COSTA, J.G.M. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of L. sidoides and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, ed. 3, p. 508-512, 2012.

HERAS-MOZOS, R.; MURIEL-GALET, V.; LÓPEZ-CARBALLO, G.; CATALÁ, R.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GAVARA, R. Development and optimization of antifungal packaging for sliced pan loaf based on garlic as active agent and bread aroma as aroma corrector, **International Journal of Food Microbiology**, v. 290, 2019.

JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E., BHANDARI, B., HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, ed. 41(2),p. 172–183. 2008.

JAFARI, S. M., ASSADPOOR, E., HE, Y., BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.

JANATOVA, Anezka et al. Long-term antifungal activity of volatile essential oil components released from mesoporous silica materials. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 216-220, 2015.

JU, J., XU, X., XIE, Y., GUO, Y., CHENG, Y., QIAN, H., & YAO, W. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. **Food chemistry**, v. 240, p. 850-855, 2018.

JYOTHI, N. V. N., PRASANNA, P. M., SAKARKAR, S. N., PRABHA, K. S., RAMAIAH, P. S., & SRAWAN, G. Y. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. **Journal of microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187-197, 2010.

KERRY, J. P., O'GRADY, M. N.; HOGAN, S. A. Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle- based products. A review. **Meat Science**. v. 74, p.113–130. 2006.

KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). The stability and shelf-life of food. 2000.

KRISCH, J., RENTSKENHAND, T., HORVÁTH, G., & VÁGVÖLGYI, C. Activity of essential oils in vapor phase against bread spoilage fungi. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 57, n. 1, p. 9-12, 2013.

KRISHNAN, S.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate polymers**, v. 61, n. 1, p. 95-102, 2005.

KURIOKASE, A.B..; SATHIREDDY, P.; PRIYA, S.P. A Review on Microcapsules. **Global Journal of Pharmacology**, v. 9, p. 28-39, 2015.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.; NYCHAS, G.-J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LÊ, S., HUSSON, F. SensoMineR: A package for sensory data analysis. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, n. 1, p. 14-25, 2008.

LEE, G.; KIM, Y.; KIM, H.; BEUCHAT, L. R.; RYU, J. Antimicrobial activities of gaseous essential oils against Listeria monocytogenes on a laboratory medium and radish sprouts. **International journal of food microbiology**, v. 265, p. 49-54, 2018.

LEGAN, J.D. Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 32, p. 33-53, 1993.

LEMOS, T. L. G., MATOS, F. D. A., ALENCAR, J. W., CRAVEIRO, A. A., CLARK, A. M., MCCHESNEY, J. D. Antimicrobial activity of essential oils of Brazilian plants. **Phytotherapy Research**, v. 4, n. 2, p. 82-84, 1990.

LOPEZ-MALO, A., BARRETO-VALDIVIESO, J., PALOU, E.; SAN, F. Aspergillus flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. **Food Control**. v.18, p.1358–1362. 2007.

LV, F., LIANG, H., YUAN, Q., & LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 3057-3064, 2011.

MAJOLO, C.; PILARSKI, F.; CHAVES, F. C. M.; BIZZO, H. R.; CHAGAS, E. C. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.30, ed.5, p.388-397, 2018.

MANI LÓPEZ, E., VALLE VARGAS, G. P., PALOU, E., LÓPEZ MALO, A. Penicillium expansum inhibition on bread by lemongrass essential oil in vapor phase. **Journal of food protection**, v. 81, n. 3, p. 467-471, 2018.

MANNURAMATH, M.; YENAGI, N.; ORSAT, V. Quality evaluation of little millet (Panicum miliare) incorporated functional bread. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 12, p. 8357-8363, 2015.

MARCHESE, A.; ORHAN, I.E.; DAGLIA, M.; BARBIERI, R.; DI LORENZO, A.; NABAVI, S.F.; GORTZI, O.; IZADI, M.; NABAVI, S.M. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature, **Food Chemistry**, v. 210, 2016.

MARÍN, S., GUYNOT, M. E., NEIRA, P., BERNADO, M., SANCHIS, V., RAMOS, A. J. Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak-acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 203-211, 2002.

MATOS, F.J.A.; OLIVEIRA,F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.79, p 84-87, 1998.

MCNAMEE, B. F.; O'RIORDA, E. D.; O'SULLIVAN, M. Emulsification and microencapsulation properties of gum arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 4551-4555, 1998.

MEJÍA-GARIBAY, B.; PALOU, E.; LOPEZ-MALO, A. Composition, diffusion, and antifungal activity of black mustard (Brassica nigra) essential oil when applied by direct addition or vapor phase contact. **Journal of food protection**, v. 78, n. 4, p. 843-848, 2015.

MEMBRE, J. M., KUBACZKA, M., CHENE, C. Growth rate and growth-nogrowth interface of Penicillium brevicompactum as functions of pH and preservative acids. **Food Microbiology**, v.18, p.531-538. 2001.

MINTEL. **Global Food & Drink Trends 2017**. Londres. 2017.

NADJIB, B. M., AMINE, F. M., ABDELKRIM, K., FAIROUZ, S., & MAAMAR, M. Liquid and vapour phase antibacterial activity of Eucalyptus globulus essential oil: susceptibility of selected respiratory tract pathogens. **American Journal of Infectious Diseases**, v. 10(3), p. 105. 2014.

NIELSEN, V.; RIOS, R. 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**, v. 60, ed. 2, p. 219-229. 2000.

O'CONNOR-SHAW, R. E.; REYES, V. G. *In*: Encyclopedia of Food Microbiology. p. 410–416. Robinson, R. J., Batt, C. A., Patel, P. D., Eds., Academic Press, London, Reino Unido. 2000.

OLIVEIRA, J., GLORIA, E. M., PARISI, M. C. M., BAGGIO, J. S., SILVA, P. P. M., AMBROSIO, C. M. S., SPOTO, M. H. F. Antifungal activity of essential oils associated with carboxymethylcellulose against Colletotrichum acutatum in strawberries. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 261-267, 2019.

OLIVEIRA, J.; PARISI, M.C.M.; BAGGIO, J.S.; SILVA, P.P.M.; PAVIANI, B.; SPOTO, M.H.F.; GLORIA, E.M. Control of Rhizopus stolonifer in strawberries by the combination of essential oil with carboxymethylcellulose, **International Journal of Food Microbiology**,v. 292, 2019.

OTONI, C. G.; PONTES, S. F. O.; MEDEIROS, E. A. A.; SOARES, N. F. F. 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.** v. 62 (22), p. 5214-5219, 2014.

OZKAN, G. FRANCO, P. MARCO, I. XIAO, J. CAPANOGLU, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications, **Food Chemistry**, v. 272, p. 494-506, 2019.

PAGLIONE, I.S.; GALINDO, M. V.; MEDEIROS, J. A. S.; YAMASHITA, F.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F.; SAKANAKA, L. S.; SHIRAI, M. A. Comparative study of the properties of soy protein concentrate films containing free and encapsulated oregano essential oil. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 22, p. 100419, 2019.

PASSARINHO, A. T. P., DIAS, N. F., CAMILLOTO, G. P., CRUZ, R. S., OTONI, C. G., MORAES, A. R. F., & SOARES, N. D. F. F. Sliced Bread Preservation through Oregano Essential Oil-Containing Sachet. **Journal of Food Process Engineering**, v. 37, n. 1, p. 53-62, 2014.

PEREIRA, M. C.; SOUZA, S. M. C.; CUNHA, R. L.; ANGÉLICO, C. L. Conservação de produtos de panificação pela adição de condimentos em pó. **Ciências agrotécnicas**, Lavras. Edição Especial, p.1514-1520, 2002**.**

PINTO, N. D. O. F., RODRIGUES, T. H. S., PEREIRA, R. D. C. A., E SILVA, L. M. A., CÁCERES, C. A., DE AZEREDO, H. M. C., MUNIZ, C.R., BRITO, E.S. & CANUTO, K. M. Production and physico-chemical characterization of nanocapsules of the essential oil from L. sidoides Cham. **Industrial Crops and Products**, v. 86, p. 279-288, 2016.

R CORE TEAM (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

RAIMUNDO, K. F.; BORTOLUCCI, W. C.; GLAMOČLIJA, J.; SOKOVIĆ, M.; GONÇALVES, J. E.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; GAZIM, Z. C. Antifungal activity of Gallesia integrifolia fruit essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, Supplement 1, p. 229-235, 2018.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Assessment of factors influencing antimicrobial activity of carvacrol and cymene against Vibrio cholerae in food. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 110, n. 5, p. 614-619, 2010.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, n.6, p. 1195-1236, 1998.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; SANCHES-SILVA, A.. Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. **Current Opinion in Food Science**, v. 14, p. 78-84, 2017.

RIBES, S.; FUENTES, A.; TALENS, P.; BARAT, J. M.; FERRARI, G.; DONSÌ, F. Influence of emulsifier type on the antifungal activity of cinnamon leaf, lemon and bergamot oil nanoemulsions against Aspergillus niger. **Food Control**, v. 73, Part B, p. 784-795, 2017.

ROBLEDO, N.; VERA, P.; LÓPEZ, L.; YAZDANI-PEDRAM, M.; TAPIA, C.; ABUGOCH, L. Thymol nanoemulsions incorporated in quinoa protein/chitosan edible films; antifungal effect in cherry tomatoes. **Food chemistry**, v. 246, p. 211-219, 2018.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 37-42, 2012.

ROSENKVIST, H.; HANSEN, A. The antimicrobial effect of organic acid sourdough and nisin against Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis isolated from wheat bread. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 621-631, 1998.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 73, p. 363–370, 1992.

SALADINO, F., QUILES, J. M., LUCIANO, F. B., MAÑES, J., FERNÁNDEZ-FRANZÓN, M., & MECA, G. Shelf life improvement of the loaf bread using allyl, phenyl and benzyl isothiocyanates against Aspergillus parasiticus. **LWT-Food Science and Technology**, v. 78, p. 208-214, 2017.

SANCHEZ-GARCIA, M. D., OCIO, M. J., GIMENEZ, E., & LAGARON, J. M. Novel polycaprolactone nanocomposites containing thymol of interest in antimicrobial film and coating applications. **Journal of Plastic Film & Sheeting**, v. 24, n. 3-4, p. 239-251, 2008.

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, RS: Ed. da UFSC, 2004.

SIMPSON, B. K. Modified atmosphere packaging of bakery and pasta products. **Principles of Modified-atmosphere and sous vide Product Packaging**, p. 207, 1995.

SMITH, J. P., DAIFAS, D. P., EL-KHOURY, W., KOUKOUTSIS, J., & EL-KHOURY, A. Shelf life and safety concerns of bakery products—a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 1, p. 19-55, 2004.

SOARES, N. F. F., RUTISHAUSER, D. M., MELO, N., CRUZ, R. S.; ANDRADE, N. J.. Inhibition of microbial growth in bread through active packaging. **Packaging Technology and Science**. v.15. p. 129–132, 2002.

SOLIMAN, E. A., EL-MOGHAZY, A. Y., EL-DIN, M. M., & MASSOUD, M. A. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. **Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences**, v. 3, n. 01, p. 48, 2013.

SOSNA, D.; BRUNCLÍKOVÁ, L.; GALETA, P. Rescuing things: Food waste in the rural environment in the Czech Republic, **Journal of Cleaner Production**, v. 214, 2019.

STENSGAARD, A.; HANSSEN, O.J. Food waste in Norway 2010–2015. Final Report from the ForMat-Project; OR 17.16; Ostfold Research: Kråkerøy, Noruega, 2016.

SUHR, K. & NIELSEN, V. Inhibition of Fungal Growth on Wheat and Rye Bread by Modified Atmosphere Packaging and Active Packaging Using Volatile Mustard Essential Oil. **Journal of Food Science**.V. 70, Nr. 1, 2005.

SVANES, E.; OSTERGAARD, S.; HANSSEN, O.J. Effects of Packaging and Food Waste Prevention by Consumers on the Environmental Impact of Production and Consumption of Bread in Norway. **Sustainability**. 11(1): 43, 2019.

TACO (2019). **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** – TACO. Ed. 4, NEPA-UNICAMP, Campinas. Disponível em: http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf Acesso em: 11 de janeiro de 2020.

TEODORO, R. A. R.; FERNANDES, R.V.B.; BOTREL, D.A.; BORGES, S.V.; SOUZA, A.U. Characterization of Microencapsulated Rosemary Essential Oil and Its Antimicrobial Effect on Fresh Dough. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 9, p. 2560–2569, 2014.

TAJKARIMI, M., IBRAHIM, S., CLIVER, D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**, Ed. 21, p.1199-1218. 2010.

TYAGI, V.V.; KAUSHIK, S.C. ; TYAGI, S.K.; AKIYAMA, T. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, V. 15, Ed. 2, P. 1373-1391, 2011.

TOLEDO, N. M. V.; NUNES, L. P.; SILVA, P. P. M.; SPOTO, M. H. F; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Influence of pineapple, apple and melon by-products on cookies: physicochemical and sensory aspects. **International journal of food science & technology**, v. 52, n. 5, p. 1185-1192, 2017.

ULTEE, A.; BENNIK, M.H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus* **Applied Environmental Microbiology Journal**, ed.68, p. 1561-1568, 2002.

VEIGA, R. D. S. D., APARECIDA DA SILVA-BUZANELLO, R., CORSO, M. P., & CANAN, C. Essential oils microencapsulated obtained by spray drying: a review. **Journal of Essential Oil Research**, p. 1-17, 2019.

WEISS, J., GAYSINKSY, S., DAVIDSON, M., MCCLEMENTS, J. Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. In G. V. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, & K. Buckle (Eds**.**), **IUFoST world congress book: *Global issues in food science and technology*** (p. 425-479). Amsterdam: Elsevier Inc. 2009.

YAO, W. R.; XU, X. M. Separation, identification and inhibition of spoilage moulds in bakery products. **Science and Technology of Food Industry**, v.11, p. 148–150. 2014.

ZHANG, D.; GAN, R.; GE, Y.; YANG, Q.; GE, J.; LI, H.; CORKE, H. Research progress on the antibacterial mechanisms of carvacrol:a mini review. **Bioactive Compounds in Health and Disease,** v.1, p. 71-81, 2018.

ZILLO, R. R., SILVA, P. P. M., OLIVEIRA, J., GLÓRIA, E. M., SPOTO, M. H. F. Carboxymethylcellulose coating associated with essential oil can increase papaya shelf life. **Scientia Horticulturae**, v. 239, p. 70-77, 2018.