

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
SANTA CATARINA - CÂMPUS JARAGUÁ DO SUL  
TÉCNICO INTEGRADO EM QUÍMICA (5ª FASE)**

BEATRIZ LIMA DOS SANTOS  
FERNANDA VAILATI VIERGUTZ  
IZABELA CABRAL GOULART  
JOÃO VICTOR MANERICH  
JULIA KRAISCH DOS SANTOS  
MATHEUS SCHMITT

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CONSERVANTE DE BIOFILMES  
ATIVOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE L.* (ORÉGANO)  
QUANDO APLICADOS EM QUEIJOS**

Jaraguá do Sul

2018

Beatriz Lima dos Santos  
Fernanda Vailati Viergutz  
Izabela Cabral Goulart  
João Victor Manerich  
Julia Kraisch dos Santos  
Matheus Schmitt

**Produção e avaliação da capacidade conservante de biofilmes ativos com óleo essencial de  
*Origanum vulgare L.* (orégano) quando aplicados em queijos.**

Projeto de pesquisa desenvolvido no eixo formativo diversificado “Conectando Saberes” do Curso Técnico em Química (Modalidade Integrado) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina – Campus Jaraguá do Sul.

Orientadora: Débora Martinez

Coordenadoras: Aline Gevaerd Krelling e Ana Paula Aparecida Duarte Souza

Jaraguá do Sul

2018

## SUMÁRIO

<b>1 TEMA</b> .....	4
<b>2 DELIMITAÇÃO DO TEMA</b> .....	4
<b>3 PROBLEMA</b> .....	4
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	5
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	5
5.1 OBJETIVO GERAL .....	5
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	5
<b>6 JUSTIFICATIVA</b> .....	5
<b>7 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	8
7.1 CONSERVANTES .....	8
7.2 IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELAS EMBALAGENS PLÁSTICAS CONVENCIONAIS (NÃO BIODEGRADÁVEIS) .....	9
7.3 BIOFILMES / EMBALAGENS ATIVAS.....	10
7.4 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	11
7.4.1 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO .....	12
7.5 ALIMENTOS PERECÍVEIS - QUEIJOS.....	13
7.6 OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM QUEIJOS .....	14
<b>8 METODOLOGIA</b> .....	15
8.1 SÍNTESE DOS BIOFILMES .....	15
8.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME.....	16
8.2.1 ASPECTOS VISUAIS .....	17
8.2.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS .....	17
8.2.3 ESPESSURA .....	17
8.2.4 ABSORÇÃO DE ÁGUA .....	17
8.3 ANÁLISE DA CAPACIDADE CONSERVANTE DOS BIOFILMES NO REVESTIMENTO DE QUEIJOS.....	18
8.3.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO .....	18
<b>9 CRONOGRAMA</b> .....	20
<b>10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	21

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Orégano mexicano (esquerda) e orégano chileno (direita).....	12
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular do timol e carvacrol.....	13
<b>Figura 3.</b> Etapas do desenvolvimento do projeto.....	15

## **1 TEMA**

Produção e avaliação da capacidade conservante de biofilmes ativos com óleo essencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) quando aplicados em queijos.

## **2 DELIMITAÇÃO DO TEMA**

Produção de biofilmes compostos por proteínas do soro de leite com a incorporação de óleo essencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) e avaliação da capacidade conservante quando aplicados em queijos.

## **3 PROBLEMA**

A maior parte dos alimentos processados possui em sua composição aditivos alimentares, dos quais destaca-se a classe de conservantes. Esses são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, de importância, pois aumentam a disponibilidade de alimentos por tempos prolongados em comparação às formulações nas quais não há o emprego de conservantes.

Embora a aplicação desses aditivos seja justificada, há evidências de efeitos adversos de seu consumo à saúde dos consumidores, entre eles sintomas de intoxicação e desenvolvimento de doenças crônicas. Essas associações são suficientes para o crescente interesse na identificação e uso de novos métodos para conservação de alimentos. Além do uso de aditivos alimentares, as embalagens também desempenham a função de proteger e conservar os alimentos, pois são importantes para evitar contaminação externa e cruzada e, por isso, são projetadas para atuar como uma barreira física entre o alimento e o ambiente.

No entanto, uma grande quantidade de resíduos provenientes do descarte de embalagens são gerados e descartados sem um tratamento ou processo de reciclagem. Neste sentido, há uma tendência para a obtenção de filmes biodegradáveis e embalagens ativas, essas, que vêm ganhando espaço na indústria de alimentos, assim como fontes naturais que possuem atividade antimicrobiana, por exemplo, os óleos essenciais.

Diante do exposto, considerando alternativas ao tema do projeto: os biofilmes ativos poderiam prolongar o tempo de conservação de alimentos perecíveis (ex.: queijos), tendo como princípio ativo o óleo essencial de *Origanum vulgare L.* (orégano)?

## 4 HIPÓTESES

- O biofilme ativo com óleo essencial de orégano é eficiente na conservação de queijos.
- A adição do óleo essencial de orégano à composição do biofilme possibilita um aumento do tempo de conservação dos alimentos em comparação à adição de um conservante sintético (sorbato de potássio).
- As concentrações de 1,5 - 5,0 % de óleo essencial serão eficientes para garantir maior estabilidade oxidativa e microbiológica na conservação de queijos.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GERAL

Sintetizar biofilmes ativos compostos por proteínas do soro de leite e óleo essencial de orégano e avaliar sua capacidade como conservante de queijos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir biofilmes compostos de proteínas do soro de leite, utilizando o método *casting*;
- Produzir biofilmes ativos compostos de proteínas do soro de leite com a incorporação do óleo essencial de orégano e sorbato de potássio, separadamente (concentrações de 1,5%; 2,5% e 5,0%).
- Caracterizar os biofilmes produzidos.
- Comparar a capacidade conservante entre os biofilmes ativos com adição óleo essencial e com o conservante sintético sorbato de potássio em todas as concentrações (1,5-5,0%).
- Avaliar a capacidade conservante dos biofilmes através de análise visual do desenvolvimento de microrganismos e a determinação do índice de peróxidos em queijos.

## 6 JUSTIFICATIVA

Os produtos naturais, como extratos e substâncias bioativas, são foco de muitos estudos para o entendimento de seus efeitos e aplicações tecnológicas. Nesse sentido, destinam-se esforços tanto da comunidade científica quanto da indústria de alimentos, para a reformulação de alimentos com a inserção de compostos que possam agregar valor aos produtos. Essas ações estão associadas, em parte, às evidências do impacto de uma alimentação saudável e à busca da

população por alimentos menos processados, identificados pela menor concentração ou a ausência de aditivos alimentares sintéticos em sua formulação.

A substituição de aditivos sintéticos na composição de alimentos deve garantir a manutenção de suas propriedades sensoriais e sua vida de prateleira. Nota-se que um dos desafios na substituição de aditivos é o de atingir a eficiência da ação dos aditivos conhecidos, como os conservantes, sem o comprometimento de atributos sensoriais ou de segurança dos alimentos processados.

Além disso, alguns aditivos já apresentaram problemas ligados à saúde do consumidor. Exemplos de conservantes comumente utilizados que possuem uma série de malefícios são: sulfitos, que podem causar efeitos como dores de cabeça, palpitações, alergias, ou mesmo câncer; nitritos e nitratos que são suspeitos de causar câncer no estômago; benzoatos, suspeitos de causarem alergias, asma e erupções cutâneas; sorbatos, que incluem relatos de urticária e dermatite de contato; entre outros (SHARMA, 2015).

O *Origanum vulgare L.* (orégano) é um condimento amplamente utilizado em várias culturas. Seu óleo essencial destaca-se por sua capacidade antimicrobiana, conhecida especificamente na conservação de alimentos; possui alguns componentes ativos como o carvacrol e seu isômero, o timol, os quais são os responsáveis por sua ação antimicrobiana e antioxidante (BOTRE et al., 2010). Segundo Almeida (2015), o carvacrol e o timol interagem com a membrana celular de diversos microrganismos, o que faz com que atuem como agentes inibitórios de seu crescimento. Entre os microrganismos inibidos por essas moléculas encontram-se a *Salmonella sp* e *Staphylococcus aureus*.

Diante disso, a utilização de óleos essenciais vem ganhando visibilidade, já que os mesmos são conhecidos por suas atividades antibacteriana, antioxidante, antifúngica, antiviral, entre outros (BARBOSA, 2010). Estas propriedades garantem aos óleos essenciais a capacidade de serem utilizados como conservantes naturais, tornando-os relevantes em pesquisas ligadas à substituição dos conservantes sintéticos.

Com a possibilidade de associar a capacidade antimicrobiana do óleo essencial de orégano em embalagens, a concepção da elaboração de filmes biodegradáveis ganha importância na preservação de alimentos. Entre as vantagens que essa associação possibilita, inclui-se a manutenção de fatores ambientais, uma vez que as embalagens alternativas diminuem o descarte e a poluição derivada de embalagens plásticas convencionais. Esses materiais, em sua maior

parte, são polímeros sintéticos derivados do petróleo. Estima-se que depois da matéria orgânica, o material de embalagem com maior participação no total de RSU (Resíduos Sólidos Urbanos) coletado no Brasil são os plásticos (13,5%) (LANDIM et al., 2016), justificando assim a busca de novas tecnologias para a produção de embalagens.

A incorporação de um óleo essencial à estrutura de biofilmes permite uma interação indireta de sua ação conservante, pois os princípios ativos não se encontram na formulação do alimento. Esse fato é o diferencial em relação à ação dos conservantes convencionais empregados diretamente à composição do alimento.

Levando-se em conta esses aspectos, presume-se que a aceitação dos biofilmes no mercado, por parte dos consumidores, pode ser maior; trazendo ainda mais vantagens pelo fato do óleo ser proveniente do orégano, um condimento amplamente utilizado pela indústria alimentícia e consumido mundialmente. Além disso, a elaboração dos mesmos será a partir das proteínas derivadas do soro do leite, um subproduto gerado principalmente no processamento de queijos, e que por décadas foi dispensado pela indústria alimentícia (HARAGUCHI; DE ABREU; DE PAULA, 2006).

O biofilme poderá ser utilizado para a conservação de diversos tipos de alimentos que necessitem de uma embalagem primária (que esteja em contato com o produto), como por exemplo, os queijos. Os queijos, de uma forma geral, possuem uma elevada atividade de água, que é um fator importante para a conservação de alimentos. A atividade de água refere-se à quantidade dessa que irá reagir com microrganismos; quanto mais elevada ela for, mais rápido bactérias, leveduras e bolores serão formados (GARCIA, 2004). A conservação dos produtos relaciona-se diretamente com esses e outros fatores, dentre os quais está a composição dos alimentos (proteínas, lipídeos e carboidratos).

Essa conservação pode ser observada de diferentes formas, ainda mais no caso dos queijos que apresentam características facilmente detectáveis quando estão em processo de deterioração. Sendo assim, o efeito conservante dos biofilmes pode ser observado tanto de uma maneira visual quanto pela oxidação dos lipídeos presentes no queijo.

## 7 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 7.1 CONSERVANTES

Sabe-se que, atualmente, os aditivos alimentares estão presentes na alimentação diária de grande parte da população, sendo utilizados tanto para deixar os alimentos mais atrativos, com o uso, por exemplo, de corantes alimentícios, quanto para aumentar a sua estabilidade química e microbiológica, com a adição de conservantes. Um aditivo alimentar pode ser definido como:

Qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento (ANVISA, 1997).

Os aditivos alimentares classificam-se em aromatizantes, corantes, emulsificantes, acidulantes, etc. Leva-se em conta a função ou propriedade que o(s) composto(s) confere aos produtos. Entre os aditivos mais investigados atualmente estão os conservantes.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1997), conservante é toda substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. Estima-se que 20% dos alimentos produzidos são perdidos devido à ação de microrganismos, o que diminui o lucro das empresas responsáveis por eles (ARAÚJO, 2011). O uso de conservantes é, portanto, frequente para garantir a disponibilidade de alimentos por um tempo maior, possibilitando a exportação e o consumo de alimentos sazonais, entre outros fatores.

A eficácia de um conservante pode ser influenciada por diversos fatores intrínsecos aos alimentos, como o pH, a composição do produto, o teor de água no alimento e o grau de contaminação do alimento ou do ambiente em que foi manipulado ou armazenado (ARAÚJO, 2011). Sabe-se que existem diferentes tipos de conservantes químicos, empregados de acordo com o tipo de alimento e dos microrganismos envolvidos na sua decomposição. Entretanto, alguns conservantes apresentam toxicidade quando presentes no alimento em concentrações elevadas. Portanto, é de extrema importância a fiscalização em relação às concentrações utilizadas desse tipo de aditivo, estipulando um limite máximo para que não haja efeitos prejudiciais à saúde humana.

Como exemplos de aditivos que possuem função conservante estão os nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), os quais são empregados em produtos cárneos processados. Os nitritos e nitratos

atuam também como antioxidantes, pois inibem a oxidação de macromoléculas dos alimentos. Estas substâncias são consideradas cancerígenas, mutagênicas e tóxicas (ARAÚJO, 2011). De acordo com a ANVISA (1998), o limite máximo para o nitrato de sódio e nitrato de potássio em produtos cárneos é de 0,03 g/100 g; enquanto que para o nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e nitrito de potássio ( $\text{KNO}_2$ ) a concentração máxima permitida é de 0,015 g/100 g.

Além dos nitritos e nitratos, outros conservantes muito utilizados pela indústria são os sorbatos e seus derivados. “O sorbato é um ácido graxo monocarboxílico, encontrado naturalmente em diversas frutas e vegetais, sendo metabolizado pelo organismo para dióxido de carbono e água” (ARAÚJO, 2011). Eles são usados, normalmente, em alimentos como queijos, margarinas, produtos de panificação, bebidas, geleias e outros, sendo altamente efetivos no controle de leveduras e fungos. Sua forma ácida, ou seja, o ácido sórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2$ ), é mais solúvel em lipídeos que em água (0,16 g/100 mL), por isso seus derivados mais comuns são o sorbato de sódio, potássio e cálcio, já que eles possuem uma solubilidade em água muito maior, se comparado ao ácido (ARAÚJO, 2011). Para produtos de panificação e biscoitos a ANVISA (1999) estabelece um limite máximo de 0,1 g/100 g tanto para o ácido sórbico como para os sorbatos de sódio, potássio e cálcio. Porém esses limites podem ser alterados de acordo com a aplicação de cada conservante.

## 7.2 IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELAS EMBALAGENS PLÁSTICAS CONVENCIONAIS (NÃO BIODEGRADÁVEIS)

Sabe-se que a poluição ambiental tornou-se um dos grandes problemas com consequências atuais e para as futuras gerações. O impacto ambiental é derivado do crescimento da população e consequente elevação do consumo de bens materiais, descarte inapropriado de resíduos, dentre outros fatores. As inovações tecnológicas começaram a aparecer a partir da Primeira Revolução Industrial, no século XVIII, causando grandes impactos ambientais, sendo um deles o descarte indevido de resíduos sólidos, principalmente dos resíduos de materiais plásticos (SILVA; SANTOS; SILVA, 2013).

No geral, plásticos sintéticos são amplamente utilizados por oferecerem benefícios para o setor industrial, como o baixo custo, fácil processamento, alta aplicabilidade e durabilidade. Do ponto de vista da preservação ambiental, a durabilidade desses materiais é negativa, pois levam anos para sua degradação por não serem materiais que sofrem a ação de microrganismos (DA

SILVA, 2011). Desse modo, plásticos sintéticos derivados do petróleo permanecem na natureza por um extenso período de tempo, promovendo o aumento da poluição, seja ela visual, química ou biológica (XAVIER et al., 2006).

Tratando-se da conservação de alimentos, os materiais de uso comum são filmes plásticos de polímeros sintéticos, devido à versatilidade, propriedades de barreira física que controla a permeabilidade aos gases e contaminações externas aos produtos. Entretanto, assim como os outros polímeros sintéticos, eles também causam problemas ambientais, o que faz com que a indústria procure meios de cessá-los. Uma opção é a conscientização da população em relação a ações que visam o descarte correto desses materiais, como a reciclagem, além da busca por alternativas diferenciadas que não ocasionem complicações futuras, como a substituição dos derivados do petróleo por novas matérias-primas, formando os plásticos biodegradáveis.

### 7.3 BIOFILMES / EMBALAGENS ATIVAS

O uso do plástico na produção de diversos tipos de embalagens só teve crescimento em 1960, sendo a matéria prima mais empregada no mercado atualmente, por conta de sua versatilidade e baixo custo. “É utilizado, por exemplo, como embalagem descartável em alimentos e bebidas (com destaque à embalagem de politereftalato de etileno - PET), e sacos de lixo” (ABAM, 2006 apud NAIME, 2010).

Nos últimos anos novos tipos de tecnologia vêm sendo desenvolvidas com intuito de trazer benefícios para os produtos, as chamadas embalagens ativas que interagem com o alimento de modo a alterar características indesejáveis (SOARES, 1998, apud NAIME, 2010). Esse sistema é utilizado em um grande número de produtos alimentícios, como pizzas, queijos, carnes, frutas desidratadas, dentre outros.

Um dos tipos de embalagens ativas que se destacam são os filmes antimicrobianos. “A tecnologia baseia-se no fato de que, na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos, o crescimento microbiano é superficial, daí um maior contato entre o produto e o agente antimicrobiano.” (MORAES et al., 2007). Boa parte desses filmes é produzido a partir de matérias naturais, já que, dessa forma, a embalagem torna-se biodegradável.

Os aditivos utilizados em filmes antimicrobianos não são diretamente inseridos nos produtos alimentícios, e sim liberados de forma gradual e controlada. Desse modo, os compostos estão presentes em quantidades menores e apenas na superfície do produto, onde, de modo geral,

os microrganismos aeróbios se desenvolvem. Um dos aditivos que vêm ganhando espaço atualmente são os óleos essenciais.

#### 7.4 ÓLEOS ESSENCIAIS

Óleos essenciais são compostos complexos naturais e voláteis, caracterizados por apresentarem um forte odor e serem constituídos por metabólitos secundários (compostos orgânicos que não participam diretamente em processos de crescimento e reprodução dos organismos) de plantas aromáticas, sendo desenvolvidos desde a Idade Média até os dias atuais (BARBOSA, 2010).

A composição química de cada óleo essencial pode variar, isso se deve principalmente pelas alterações na produção dos metabólitos secundários. Segundo Aleixo (2014), a produção desses metabólitos é interferida por diversos fatores, dentre eles o desenvolvimento da planta e a sazonalidade, o índice pluviométrico, a temperatura, a altitude, entre outros.

De acordo com o autor, alguns componentes estão presentes em elevadas concentrações (20% a 70%) nos óleos essenciais, sendo denominados de componentes majoritários. Alguns exemplos de compostos majoritários nos óleos essenciais são o carvacrol, o timol, o terpinen-4-ol e o aldeído cinâmico. Existem outras substâncias que contribuem para a composição dos óleos, porém encontradas em menores quantidades.

Os óleos essenciais possuem diversas aplicações, como na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos; sendo empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias e em composições farmacêuticas, além de serem comercializados na sua forma bruta ou beneficiada. Entre as principais matérias primas para sua produção estão as flores, folhas, cascas, rizomas e frutos (BIZZO et al., 2009).

Estes óleos são produtos voláteis obtidos principalmente por processos físicos, bem como: destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida, entre outros. Os óleos essenciais podem ser encontrados de maneira isolada ou misturada entre si, desterpenados, retificados ou concentrados (BOTRE et al., 2010).

Segundo Barbosa (2010), embora os óleos essenciais tenham seus efeitos antimicrobianos já conhecidos, seu mecanismo de ação contra microrganismos não é compreendida com grande detalhe. Há consenso de que grande maioria dos compostos aromáticos e fenólicos presentes

nestes exercem seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, o que provoca alterações nas suas funções e na sua estrutura.

Devido ao elevado número de diferentes grupos de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é provável que a atividade antimicrobiana desses não seja atribuída a apenas um mecanismo em específico; entretanto esses causam vários efeitos às células, como alterações da membrana citoplasmática, entre outros. Pela grande diversidade de mecanismos, nem sempre esses atingem alvos separados, ou seja, alguns mecanismos podem ocorrer em consequência de outros (BURT, 2004).

#### 7.4.1 ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO

O orégano é uma planta da família Lamiaceae, herbácea, muito ramificada que normalmente é utilizada como condimento e na medicina; recebendo diversas atribuições, bem como antibacteriano, antifúngico, anti-inflamatório, antioxidante, anticancerígeno, emoliente e digestivo. Ambas as características são atribuídas ao carvacrol, um dos principais compostos químicos presentes no orégano (ZANANDREA et al., 2004).

O regulamento técnico para especiarias, RDC n. 276 da ANVISA, reconhece o uso do orégano no Brasil por meio de duas espécies, além do já mencionado orégano chileno (*Origanum vulgare Linnaeus*), o orégano mexicano (*Lippia graveolens Kunth*), ambos na forma de talos e folhas (BOTRE et al., 2010), como ilustrado na Figura 1.

**Figura 1** - Orégano mexicano (esquerda) e orégano chileno (direita).



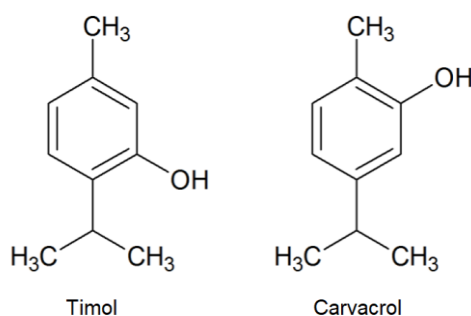
Fonte: Acervo pessoal.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare L.* é proveniente da alta concentração de compostos fenólicos em sua composição.

*O. vulgare* subsp. *hirtum* (commercially known as Greek oregano) and *C. capitatus* (known as Spanish oregano) are characterized by the dominant occurrence of carvacrol (74.56 and 81.46% of the total oil, respectively) (KARPOUHTSIS et al, 1998)<sup>1</sup>.

Essa significativa quantidade de carvacrol no óleo essencial de *Origanum vulgare L.* é o que confere a este suas atividades antimicrobianas. Além dele, outros compostos fenólicos, como seu isômero de posição timol (Figura 2), são responsáveis pelos danos causados à parede celular dos microrganismos. Estes danos são o que corresponde ao mecanismo de ação desses compostos contra os microrganismos (BOTRE et al., 2010).

**Figura 2** - Estrutura molecular do timol e do carvacrol.



Fonte: Elaborado pelos autores (BOTRE et al., 2010).

O timol se difere do carvacrol pela posição do grupo hidroxila sobre o anel fenólico, ambas as substâncias desintegram a membrana externa de certos microrganismos, o que torna sua membrana permeável (HELANDER et al., 1989).

## 7.5 ALIMENTOS PERECÍVEIS - QUEIJOS

O desenvolvimento de microrganismos em alimentos possui uma relação direta às suas características intrínsecas como umidade, atividade de água, pH e composição química. Alimentos como queijos possuem algumas especificações em relação a esses aspectos, o que os

<sup>1</sup> “O óleo essencial de *O. vulgare* subsp. *hirtum* (comercialmente conhecido como orégano grego) e o de *C. capitatus* (conhecido como orégano espanhol) foram caracterizados pela predominância da ocorrência de carvacrol (74,56 e 81,46% do total de óleo, respectivamente).”

torna um objeto de análise interessante quando levada em conta análises conservativas dos mesmos.

Segundo Perry (2004), o alto índice de consumo e distribuição de queijos deve-se principalmente ao domínio e simplicidade das tecnologias empregadas em seu processamento e à acessibilidade à maior parte dos consumidores.

Diferentes tipos de queijo podem receber diversas classificações, que têm como base determinadas características. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), na Portaria nº 146 de 1996, classifica o queijo por meio de duas características, sendo elas os teores de umidade e de matéria gorda no extrato seco, ambas em porcentagem, assim, em relação à umidade, há queijos que vão de baixa umidade (até 35,9 %) à alta umidade (acima de 55 %) (BRASIL, 1996).

A variedade de queijos é imensa, porém um dos tipos mais comuns é o queijo minas frescal. O queijo minas frescal é de origem brasileira e fabricado a partir do leite de vaca pasteurizado, possui pouca acidez, pH entre 5,0 e 5,3 (com fermento) e pH entre 6,1 e 6,3 (com ácido láctico), sua durabilidade é baixa (em torno de 9 dias sob refrigeração), sendo classificado como queijo macio, semi-gordo (17 - 19% gordura) e de alta umidade (55 - 58%) (PERRY, 2004).

O queijo minas frescal, devido sua elevada umidade e seu alto teor de nutrientes, possui um elevado potencial para sofrer deteriorações/contaminações de origem microbiana. Os principais contaminantes presentes neste, englobam microrganismos do grupo coliformes, bactérias como a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus*, e ainda, leveduras e alguns bolores. (HOFFMANN; SANTOS, 2010).

## 7.6 OXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM QUEIJOS

Como mencionado, os queijos possuem diferentes índices de gorduras, podendo adquirir diferentes classificações; as gorduras são compostos instáveis e podem vir a sofrer o processo de peroxidação. Peroxidação (oxidação dos lipídeos) é a principal causa da degradação da qualidade dos alimentos e provoca o aparecimento de odores desagradáveis, destrói vitaminas sensíveis e pode gerar compostos tóxicos (GUTERRES, 2013). O índice de peróxido serve para determinar a concentração de peróxidos. Quando gorduras (compostos instáveis) são conservados em condições desfavoráveis (em relação à temperatura, luz, umidade, entre outros) adquirem, como

produto das diversas reações que ali ocorrem, um aspecto rançoso (isso dá-se devido ao aparecimento dos odores e sabores estranhos); tais reações caracterizam o chamado ranço ou rancidez oxidativa (ARAÚJO, 2011).

Os ácidos graxos, segundo Campos (1999) “designam qualquer ácido monocarboxílico alifático que possa libertar-se por hidrólise a partir de óleos ou gorduras naturais” (apud GUTERRES, 2013). Poli-insaturados são suscetíveis à peroxidação lipídica devido às ligações duplas presentes nas cadeias de hidrocarbonetos. Essa situação ocorre devido à peroxidação lipídica que se realiza através da reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado (LIMA; ABDALLA, 2001).

## 8 METODOLOGIA

Segundo Godoy (1995), as pesquisas quantitativas preocupam-se com a medição objetiva e quantificação dos resultados enquanto que pesquisas qualitativas, não buscam enumerar ou medir os estudos realizados.

O presente projeto será desenvolvido por análises de variáveis em método qualitativos e quantitativos, pois, assim como pretende-se realizar análises dos aspectos visuais da ação conservante dos biofilmes, visa-se também a determinação do índice de peróxido nos queijos.

**Figura 3** – Etapas do desenvolvimento do projeto.



Fonte: Elaborado pelos autores.

### 8.1 SÍNTESE DOS BIOFILMES

A produção dos biofilmes será feita através do método *casting* com a utilização do isolado proteico de soro de leite (WPI) adquirido comercialmente com alto grau de pureza (> 95%). Este método baseia-se na solubilização de uma macromolécula em um solvente, seguida da aplicação

desta solução filmogênica em um suporte e posteriormente a evaporação do solvente utilizado (DE MORAES, 2013).

O método será realizado através da metodologia descrita por Yoshida e Antunes (2009). Nesse processo, o isolado proteico, 6,5% (m/v), é disperso em água destilada, sendo homogeneizado até atingir a solubilidade total. Após a homogeneização é adicionado 3,0% (m/v) de glicerol, que atuará na solução como agente plastificante. Em seguida, a solução filmogênica é aquecida à temperatura de 90 °C por 30 minutos em banho-maria, com intuito de promover a desnaturação da proteína. Com o término do aquecimento, a solução é levada para o banho de gelo, sendo resfriada até atingir a temperatura ambiente. Após o resfriamento ajusta-se seu pH para 7, com o auxílio de hidróxido de sódio 0,1 M ou ácido acético 0,1 M.

Ao final será padronizado o volume da mistura para ser disposta em uma superfície, como placas de Petri, que serão submetidas a um processo de secagem nas condições ambientais de temperatura (20 - 25 °C) por 24 horas, garantindo assim uma secagem lenta dos filmes. Após a secagem, eles serão removidos com o auxílio de uma espátula e armazenados em dessecadores, sendo separados por folhas de papel de seda.

Objetiva-se realizar uma comparação entre o biofilme padrão (sem adição de princípios ativos) e os dois tipos de biofilmes ativos (um com a adição do óleo essencial de orégano e outro com o sorbato de potássio). Para a síntese dos biofilmes com óleo essencial e sorbato de potássio (ambos adquiridos comercialmente de empresas especializadas) o processo seguirá o mesmo método utilizado para o biofilme padrão (controle), diferindo apenas pela etapa de adição do óleo essencial, ou o sorbato de potássio. Ambos serão adicionados à solução filmogênica antes do processo de mistura com aquecimento (90 °C) por 30 minutos em banho-maria.

As concentrações dos princípios ativos (óleo essencial e sorbato de potássio) serão de 1,5%, 2,5% e 5,0%; sendo estas concentrações estimadas na eficiência do óleo essencial na inibição do crescimento microbiano *in vitro*, o que possibilitará o estudo de seus efeitos como conservante em queijos.

## 8.2 CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME

Para a caracterização do biofilme, serão analisados: (a) aspectos visuais; (b) resistência mecânica; (c) espessura do biofilme; (d) absorção de água.

### 8.2.1 ASPECTOS VISUAIS

Os biofilmes serão avaliados pelos seus aspectos visuais e táteis, visando escolher criteriosamente apenas os mais homogêneos, que possuam uma coloração uniforme, sem a presença de bolhas, rupturas ou zonas quebradiças (AMPESSAN; GIAROLA, 2016), que podem afetar os resultados finais do experimento.

### 8.2.2 PROPRIEDADES MECÂNICAS

A avaliação das propriedades mecânicas de tração será realizada segundo o método da American Society for Testing and Material (ASTM D 882- 10, 2010 apud OLIVEIRA, 2013), utilizando um Analisador de Textura (texturômetro). A resistência à tração, a qual é a máxima tensão suportada pelo filme até o momento de sua ruptura, será calculada segundo a Equação 1:

$$RMT = \frac{Fm}{A}$$

**Equação 1.** (ASTM D 882- 10, 2010 apud OLIVEIRA, 2013).

Onde:

RMT = resistência máxima à tração na ruptura (MPa);

Fm = força máxima no momento da ruptura do filme (N);

A = área da secção transversal do filme (m<sup>2</sup>).

### 8.2.3 ESPESSURA

Para a determinação da espessura dos biofilmes, será utilizado um micrômetro digital, com resolução de 0,001 mm e será calculada através da média aritmética de dez medidas realizadas sobre a área do filme (OLIVEIRA, 2013).

### 8.2.4 ABSORÇÃO DE ÁGUA

Além das demais análises que serão realizadas para a caracterização, a absorção de água que o biofilme vier a possuir também será observada, e se dará através da pesagem do mesmo. As pesagens serão realizadas em intervalos de tempo, ou seja, o biofilme produzido terá sua massa inicial pesada, e a cada 5 dias a pesagem se repetirá, até o 15º dia, para analisar como o mesmo se relaciona com a umidade do meio. As análises serão feitas em biofilmes armazenados em temperatura ambiente (25 °C) e também em biofilmes submetidos à refrigeração (4 °C).

### 8.3 APLICAÇÃO E ANÁLISES DA CAPACIDADE CONSERVANTE DOS BIOFILMES NO REVESTIMENTO DE QUEIJOS

Para analisar as propriedades de barreira contra a deterioração dos alimentos devido ao meio externo, serão feitas análises com os biofilmes produzidos, quando esses forem aplicados como revestimento de queijos – atuando como embalagem primária dos produtos. Para isso, uma amostra do alimento será embalada com os filmes produzidos, que serão divididos em: biofilme comum (amostra controle); tratamentos com óleos essencial, os quais serão os biofilmes com a incorporação 1,5%; 2,5 %; e 5,0 % de óleo essencial; biofilme com a incorporação do sorbato de potássio nas concentrações de 1,5%; 2,5%; e 5,0%. Todas os tratamentos e análises serão realizadas em triplicata.

O alimento utilizado será o queijo minas frescal, devido a sua elevada umidade e tempo de armazenamento relativamente curto. Esse terá seus aspectos visuais analisados, durante o tempo de armazenamento de 15 dias, para que o processo de deterioração envolvido possa ser observado. Além disso, será feito a determinação do índice de peróxido nos queijos, já que essa também é uma forma de notar a capacidade dos biofilmes na conservação de alimentos.

Os dados obtidos serão organizados e analisados, dentre os quais incluem as imagens diárias (a partir de registros fotográficos) para a análise da aparência dos produtos (cor, desenvolvimento aparente de microrganismos - bolores e leveduras e outros aspectos) durante o período de armazenamento de 15 dias à  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ). Desta maneira, será possível indicar se houve ou não uma conservação, ou prolongamento da estabilidade microbiológica, com o uso de biofilmes ativos como revestimento de queijos. Em caso positivo, será possível estimar as concentrações ativas do óleo essencial incorporado à estrutura do biofilme para indicar sua função conservante no alimento.

#### 8.3.1 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PERÓXIDO

O índice de peróxido das amostras será analisado a cada 3 dias por um período de 15 dias, como indicador da estabilidade oxidativa dos alimentos (queijos). A análise será realizada segundo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). O método baseia-se na determinação de peróxidos, em miliequivalentes (meq), por 1000 g de amostra. Os peróxidos oxidam o iodeto de potássio (KI) nas condições reacionais. As substâncias determinadas são classificadas como peróxidos, compostos primários da oxidação de lipídeos insaturados. Na

prática, uma amostra do queijo será pesada e diluída em solução de ácido acético-clorofórmio (3:2). Após a diluição, será adicionada à amostra uma solução saturada de KI e a mistura mantida em repouso ao abrigo da luz por um minuto. Em seguida, será adiciona-se água à amostra e realizada uma titulação solução de tiosulfato de sódio, sob constante agitação até que a coloração amarela da solução desapareça. A solução de amido indicadora será adicionada para prosseguir com a titulação até que a coloração azul (novo indicador) desapareça por completo. Um teste em “branco” (na ausência da amostra) é realizado nas mesmas condições experimentais.

Após a titulação será possível calcular o índice de peróxido em meq por 1000 g da amostra segundo a Equação 2:

$$\frac{(A - B) \cdot N \cdot f \cdot 1000}{P} = \text{índice de peróxido em meq por 1000 g da amostra}$$

**Equação 2.** (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Onde:

A = volume (mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação da amostra

B = volume (mL) da solução de tiosulfato de sódio 0,1 (ou 0,01 N) gasto na titulação do branco

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

f = fator da solução de tiosulfato de sódio

P = peso da amostra em gramas (g)

## 9 CRONOGRAMA

As atividades previstas para o desenvolvimento do projeto estão indicadas no Quadro 1.

**Quadro 1** - Cronograma para o desenvolvimento das atividades do projeto de pesquisa.

Atividades	Meses					
	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	
Produção do biofilme padrão		X				
Produção do biofilme com adição de compostos ativos: óleo essencial de orégano e sorbato de potássio		X	X			
Caracterização dos biofilmes		X	X	X		
Análise da conservação de queijos		X	X	X	X	
Elaboração do relatório final		X	X	X	X	
Entrega do relatório final						X
Apresentação						X

## 10 REFERÊNCIAS

- ALEIXO, Glécia de Cássia. **Efeitos dos Óleos Essenciais e Compostos Majoritários Sobre Endósporos de *Clostridium botulinum* inoculados em mortadela**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG, p. 58, 2014.
- ALMEIDA, Regiamara Ribeiro. **Mecanismos de Ação dos Monoterpenos Aromáticos: Timol e Carvacrol**. Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso - Curso de Química, Universidade Federal de São João del-Rei, São João del-Rei - MG, p. 22, 2015.
- AMPESAN, Gabriel Augusto. GIAROLA, Danilo Antonio. **Estudo das propriedades mecânicas de filmes de proteína de soro de leite modificados com óleo de coco**. Paraná: Revista Ciências Exatas e Naturais - Recen, v. 18, n. 2, dez. 2016. Semestral. Disponível em: <<https://revistas.unicentro.br/index.php/RECEN/article/view/3858/pdf>>. Acesso em: 25 maio 2018.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540**. SVS/MS, 27 de out. 1997.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 1004**. SVS/MS, 11 de dez. 1998.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 383**. 05 de ago. 1999.
- ARAÚJO, Júlio Maria de Andrade. **Química de alimentos: teoria e prática**. 5a. ed. Viçosa, MG: UFV, p.601, 2011.
- BARBOSA, Lidiane Nunes. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação**. Dissertação (mestrado). Instituto de Biociências – Universidade Estadual Paulista, Botucatu – SP, p. 107, 2010.
- BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana Maria C; REZENDE, Claudia M. **Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas**. Química nova, v.32., n.3, p. 588-594, jan./abr.. 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº146**. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Brasília, 07 de mar. 1996.
- BOTRE, Diego Alvarenga; SOARES, Nilda de Fatima Ferreira; ESPITIA, Paula Judith Perez; DE SOUSA, Solange; RENHE, Isis Rodrigues Toledo. **Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta**. Revista Ceres, Viçosa - MG, v. 57, n. 3, p. 283-291, mai./jun. 2010.
- BURT, Sara. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review**. International Journal of Food Microbiology, Utrecht - The Netherlands, v. 94, n. 3, p. 223-253, aug. 2004.
- DA SILVA, Everton Menezes. **Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de pinhão**. Trabalho de Diplomação em Engenharia Química - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, p. 37, dez. 2011.
- DE MORAES, Jaqueline Oliveira. **Produção e caracterização de filmes de amido-glicerol-fibras de celulose elaborados por tape-casting**. Tese (doutorado) (Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, p. 176, 2013.

GARCIA, Denise Marques. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, p. 50, 2004.

GODOY, Arilda Schmidt. **Introdução à pesquisa qualitativa e suas possibilidades.** São Paulo: Rae Artigos, v. 35, n. 2, abr. 1995.

GUTERRES, Paula Cristina Matos. **Caracterização do Queijo de Mistura com Adição de Orégãos.** 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Alimentícia, Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco, Castelo Branco, Portugal, f. 75, 2013.

HARAGUCHI, Fabiano Kenji; DE ABREU, Wilson César; DE PAULA, Heberth. **Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana.** Revista de Nutrição, v.19, n.4, p.479-488, 2006.

HELANDER, Ilkka M.; ALAKOMI, Hanna-Leena; LATVA-KALA, Kyösti; MATTILA-SANDHOLM, Tiina; POL, Irene; SMID, Eddy J.; GORRIS, Leon G. M.; WRIGHT, Atte Von. **Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, Wageningen - The Netherlands, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, ago. 1998. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf980154m>>. Acesso em: 07 jun. 2018.

HOFFMANN, Fernando Leite; SANTOS, Vidiany Aparecida Queiroz. **Evolução da microbiota contaminante me linha de processamento de queijos Minas Frescal e ricota.** Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.) [online], São Paulo, vol. 69, n. 1, p. 38-46, mar. 2010.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** São Paulo, 2008.

KARPOUHTSIS, Ioannis; PARDALI, Evagelia; FEGGOU, Efi; KOKKINI, Stella; SCOURAS, Zacharias G.; MAVRAGANI-TSIPIDOU, Penelope. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Thessaloniki - Greece, v. 46, n. 3, p. 1111-1115, feb. 1998. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970822o>>. Acesso em: 07 jun. 2018.

LANDIM, Ana Paula Miguel; BERNARDO, Cristiany Oliveira; MARTINS, Inayara Beatriz Araujo; FRANCISCO, Michele Rodrigues; SANTOS, Monique Barreto; DE MELO, Nathália Ramos. **Sustentabilidade quanto às embalagens de alimentos no Brasil. Polímeros** [online]. ISSN 0104-1428, vol.26, n.spe, p.82-92, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0104-1428.1897>>. Acesso em: 29 mai. 2018.

LIMA, Émersom Silva; ABDALLA, Dulcineia Saes Parra. **Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, set. 2001.

MORAES, Allan Robledo Fialho; GOUVEIA, Luis Eduardo Reis ; SOARES, Nilda de Fátima Ferreira; SANTOS, Manoela Maciel de Souza; GONÇALVES, Maria Paula Junqueira Conceição. **Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, v. 27, n. 1, p. 33-36, ago. 2007.

NAIME, Natália. **Embalagens ativas de fonte renovável.** Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, p. 115, 2010.

OLIVEIRA, Sandra Prestes Lessa Fernandes. **Avaliação da Aplicação de Óleo Essencial de Orégano em Filme de Proteína de Soro do Leite**. Dissertação - Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNOPAR, Londrina - PR, f. 54 2013.

PERRY, Katia S. P. **Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos**. Química Nova, Belo Horizonte - MG, v. 27, n. 2, p. 293-300, mar./abr. 2004

SHARMA, Sanjay. **Food Preservatives and their harmful effects**. International Journal of Scientific and Research Publications, v. 5, n. 4, abr. 2015.

SILVA, Claudionor Oliveira; SANTOS, Gilbertânia Mendonça; SILVA, Lucicleide Neves. **A degradação ambiental causada pelo descarte inadequado das embalagens plásticas: estudo de caso**. Revista do Centro de Ciências Naturais e Exatas, UFSM, Santa Maria - RS, v. 13, n. 13, p. 2683-2689, ago. 2013.

XAVIER, Lúcia Helena; CARDOSO, Rosangela; MATOS, Rosa Maria; ADISSI, Paulo José. **Legislação ambiental sobre destinação de resíduos sólidos: o caso das embalagens plásticas pós-consumo**. XIII SIMPEP - Bauru - SP, nov. 2006.

YOSHIDA, Cristiana Maria Pedroso; ANTUNES, Aloísio José. **Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas - SP, v. 29, n. 2, p. 420-430, abr./jun. 2009.

ZANANDREA, Ilisandra; M., Andréa B.; L., Juliane; B., Veridiana K.; S., Juliano D. **Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas**. Revista Brasileira de Farmacognosia, Universidade Federal de Pelotas, v. 14, p. 15, mar. 2004.