

UNIVERSIDADE ANHANGUERA DE SÃO PAULO  
DIRCEU ISSAMU RODRIGUES FUJISAWA

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO  
PRÓPOLIS TIPIFICADA E ÓLEO ESSENCIAL VEGETAL PARA USO  
COMO CONSERVANTE NATURAL EM ALIMENTOS

SÃO PAULO

2014

UNIVERSIDADE ANHANGUERA DE SÃO PAULO  
DIRCEU ISSAMU RODRIGUES FUJISAWA

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO  
PRÓPOLIS TIPIFICADA E ÓLEO ESSENCIAL VEGETAL PARA USO  
COMO CONSERVANTE NATURAL EM ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Universidade Anhanguera de São Paulo,  
como exigência do curso de Mestrado  
Profissional em Farmácia: Produtos  
Naturais e Sintéticos Bioativos.  
Orientador: Prof. Dr.: Sérgio de Mendonça

SÃO PAULO

2014

F971p Fujisawa, Dirceu Issamu Rodrigues

Potencial antifúngico de duas formulações contendo própolis tipificada e óleo essencial vegetal para uso como conservante natural em alimentos. / Dirceu Issamu Rodrigues Fujisawa. – São Paulo, 2014. 87 f ; graf.; tab.; 30 cm

Dissertação (Mestrado Profissional em Farmácia: Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Área de concentração: Microbiologia) – Coordenadoria de Pós- graduação, Universidade Anhanguera de São Paulo, 2014.

Orientador: Professor Doutor Sérgio de Mendonça

1. Alimentos. 2. Conservante natural. 3. Própolis. I.Título. II. Universidade Anhanguera de São Paulo.

CDD 616.01

DIRCEU ISSAMU RODRIGUES FUJISAWA

POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE DUAS FORMULAÇÕES CONTENDO PRÓPOLIS  
TIPIFICADA E ÓLEO ESSENCIAL VEGETAL PARA USO COMO CONSERVANTE  
NATURAL EM ALIMENTOS

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Anhanguera de São Paulo,  
como exigência do curso de Mestrado Profissional sob orientação do Prof. Dr.:  
Sérgio de Mendonça.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador(a): Prof. Dr. Sérgio de Mendonça

---

Prof.(a). Dra. Susana Nogueira Diniz  
Imunologia pela UFMG

---

Prof.(a). Dra. Bruna Leite Simione  
Biotecnologia pela UFSCar

SÃO PAULO

2014

Ao final de cada jornada bem sucedida, buscamos em nossas lembranças pessoas especiais que fizeram ou fazem parte de nossas vidas; e a cada dia nos ajudam a construir nossos sonhos; porém olhar para trás, me faz refletir sobre a importância de prosseguir mesmo diante das dificuldades, comuns a todos que um dia resolveram sair em busca de seus sonhos, a concretizá-los. Tropeços e vitórias certamente sempre farão parte destes caminhos; deixarão marcas; contudo, serão indícios de nossa evolução; que futuramente servirão como indicativo de direções, porém jamais como trilhas, pois cada um de nós tem seu próprio caminho a percorrer. Assim dedico esse trabalho às pessoas que me fizeram entender a importância de sempre prosseguir na direção correta; e em especial aos meus pequeninos, que sempre me trazem alegrias, e são o motivo por minha eterna busca por dias melhores.

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor volto meu olhar e dobro meus joelhos ontem, hoje e sempre.

À minha querida família, por tudo que sou e pelo significado de minha existência; cada etapa cumprida com êxito, também é fruto do esforço desse importante pilar.

À minha Mãe, que me ensinou que verdade, simplicidade e humildade são chaves para o conhecimento; mas difícil mesmo é conviver com as saudades.

Ao meu saudoso Pai, que me gratificou com inúmeras aulas de paciência e perseverança, atingir um objetivo às vezes significa mudar o caminho, mas jamais a direção.

Ao meu orientador, por me direcionar e estender-me as mãos, e me fazer entender que nossas maiores dificuldades são impostas por nós mesmos, vencê-las é entender que cada um de nós carrega em si o dom de ser capaz;

Aos meus colegas do laboratório de pós-graduação, que também me ajudaram a tornar possível esse sonho;

Em especial à minha esposa e ao meu filho, que de perto sempre me acompanharam; cada centavo de confiança depositado, eu espero retribuir com amor e respeito.

Aos meus mestres, minha gratidão e respeito; boa parte de meu melhor será sempre fruto dos seus ensinamentos.

A todos que tornam meus dias melhores, esforçar-me-ei sempre para que essas mãos não sejam em vão. Foram muitos, por isso não me recordaria de todos os nomes, pensei tantas vezes em desistir, pois foram tantas as dificuldades, mas quem não as tem, e o apoio de todos vocês me fez prosseguir, enxergar além. Andemos juntos! Isso me faz tão bem.

Novamente, obrigado a todos e ao meu Pai! Pela eterna companhia;

Muito obrigado.

Basta que contemples a viva natureza, com olhos abertos, terás assunto para eternidade e aprenderás a ser modesto.”

Prof. Dr. Karl Von  
Frisch- Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de  
1973.

“Quando dizes:

Não posso resolver as coisas.

Deus te diz:

Eu dirijo teus passos”.

(Provérbios 3:5-6)

## RESUMO

FUJISAWA, D.I.R. **Potencial antifúngico de duas formulações contendo própolis tipificada e óleo essencial vegetal para uso como conservante natural em alimentos.** 2014. 87 f. Dissertação de Mestrado – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os alimentos devem ser preservados de alterações, para garantir um consumo seguro e evitar prejuízos. Os conservantes são substâncias químicas adicionadas aos alimentos visando evitar sua deterioração, principalmente àquelas ocasionadas por microrganismos. A indústria tem buscado alternativas para a substituição destes conservantes químicos, devido aos riscos associados ao consumo acentuado ou atender as necessidades de uma classe de consumidores diferenciados. Nesse cenário, o uso de agentes antimicrobianos naturais é uma opção atraente. O objetivo desse estudo foi comparar duas formulações, desenvolvidas pela Empresa Novomel Biotecnologia, à base de própolis e óleo essencial vegetal frente aos conservantes químicos sorbato de potássio e propionato de cálcio, usados principalmente em produtos lácteos e de panificação, quanto ao tempo de preservação *in vitro*; avaliando sua atividade antimicrobiana, como conservante para alimentos; em ensaio de preservação de contaminação por microrganismos, nas temperaturas de 8°C e 30°C, em duas situações; contaminação voluntária e contaminação forçada. Os ensaios foram avaliados a cada sete dias, até um período de 84 dias. As formulações apresentaram resultados de conservação dos meios de cultura utilizados como base para os testes, por tempo superior aos controles químicos, tendo uma atividade de preservação até duas vezes maior, em ambas as temperaturas avaliadas. O tempo máximo de preservação foi encontrado a partir da concentração de 0,1% de cada formulação. Esses resultados sugerem que as formulações se apresentam como alternativas de conservante natural para alimentos lácteos e de panificação, agregando valor à própolis, com características antimicrobianas já bem estudadas, tendo em vista a dimensão de suas atividades biológicas e sua importância, bem como sua segurança de consumo.

Palavras chave: Alimentos. Conservante natural. Própolis.

## ABSTRACT



FUJISAWA, D.I.R. **Potential antifungal activity of two formulations containing typified propolis and vegetable essential oil for use as natural food preservative.** 2014. 87 f. Dissertação de Mestrado – Mestrado Profissional em Farmácia, Universidade Anhanguera de São Paulo, São Paulo, 2014.

Food must be protected from mechanical, chemical, biochemical and microbiological changes that could accelerate its degradation, in order to maintain their quality for consumption. The demand for nutritionally safe foods with an extended shelf life and high nutritional quality and sensory is growing. Food additives are substances added to foods for the purpose of modifying their nutritional value, their organoleptic characteristics, processing techniques and effectiveness of its conservation. Particularly within this class, preservatives are added to foods, aiming to avoid their deterioration, especially those caused by microorganisms, and its maximum used to be prescribed in legislation. Compounds such as potassium sorbate and calcium propionate are much used by the food industry to increase the duration of the shelf life of foods, particularly dairy products and bakery products. The industry has recently sought natural alternatives to replace those chemical additives due to the risks associated with consumption or sharp suit the needs of a different class of consumers .The aim of this study was to compare two formulations, developed by Novo Mel Biotechnology Company based on vegetable essential oil and propolis in compare with chemical preservatives; evaluating its antimicrobial activity, as a food preservative at 8°C and 30°C temperatures in two situations; voluntary and forced contamination. The tests were evaluated every seven days, in a total period of 84 days. The formulations presented results for the conservation of the culture medium used by the higher chemical controls time, having a preservation activity up to two times greater in both the tested temperatures. The maximum time of preservation was found at concentrations of 0.1 % of each formulation.

Keywords: Food. Natural preservative. Propolis.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Gráfico 1 Ensaio a 30° C (EEP1, EEP2, PCO, PC) .....	55
Gráfico 2 Ensaio a 8° C (EEP1, EEP2, PCO, PC) .....	56
Gráfico 3 Ensaio a 30° C contaminação induzida (EEP1, EEP2, PCO, PC) .....	58
Gráfico 4 Ensaio a 8° C contaminação induzida (EEP1, EEP2, PCO, PC) .....	59
Gráfico 5 Ensaio a 30°C (MP e MPC) .....	60
Gráfico 6 Ensaio a 8°C (MP e MPC) .....	61
Gráfico 7 Ensaio a 30°C contaminação induzida (MP e MPC) .....	63
Gráfico 8 Ensaio a 8°C contaminação induzida (MP e MPC) .....	64

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Estratégias para controlar os agentes de deterioração.....	23
TABELA 2- Conservantes antimicrobianos para alimentos.....	32
TABELA 3- Óleos essenciais com propriedades antimicrobianas.....	39
TABELA 4- Eficácia dos agentes antimicrobianos naturais de plantas.....	49
TABELA 5- Resultados do ensaio a 30°C, formulações (EEP1, EEP2, PCO, PC)...	55
TABELA 6- Resultados do ensaio a 8°C, formulações (EEP1, EEP2, PCO, PC).....	56
TABELA 7- Resultados do ensaio a 30°C com contaminação induzida, formulações EEP1, EEP2, PCO, PC).....	57
TABELA 8- Resultados do ensaio a 8°C com contaminação induzida, formulações (EEP1, EEP2, PCO, PC).....	59
TABELA 9- Resultados do ensaio a 30°C, formulações (MP e MPC).....	60
TABELA 10- Resultados do ensaio a 8°C, formulações (MP e MPC).....	61
TABELA 11- Resultados do ensaio a 30°C com contaminação induzida, formulações (MP e MPC).....	62
TABELA 12- Resultados do ensaio a 8°C com contaminação induzida, formulações (MP e MPC).....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.- antes de Cristo  
ABIA - Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos  
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC- Do inglês American Type Culture Collection  
Aw - Atividade de água  
BHA- ButilHidroxiAnisol  
BHT- ButilHidroxiTolueno  
BPF - Boas Práticas de Fabricação  
CODEX - Código de Alimentos  
DNA- Do inglês Deoxyribonucleic Acid  
DTA - Doenças Transmitidas por Alimentos  
FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e para Alimentação  
FDA – do inglês Food and Drug Administration  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IDA - Ingestão Diária Aceitável  
IIAB - Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana  
IINIB - Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana  
JECFA - Comitê Científico Internacional de Especialistas em Aditivos Alimentares  
LD<sub>50</sub>- Do inglês Lethal Dose, em toxicologia Dose Letal Mediana  
m- massa  
MS- Ministério da Saúde  
MERCOSUL- Mercado Comum do Sul  
NaCl- Cloreto de sódio  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
Ph - Potencial Hidrogeniônico  
SO<sub>2</sub> - Dióxido de Enxofre  
spp - Espécies  
SVS- Secretaria de Vigilância em Saúde  
v- Volume  
WHO - Do inglês world Health Organization

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVO</b> .....	17
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
3.1. A formação do hábito e a alimentação.....	18
3.2. Alterações nos alimentos.....	19
3.2.1 A relação entre os microrganismos e os alimentos .....	21
3.3. Estratégia de conservação dos alimentos .....	22
3.4 Aditivos .....	25
3.4.1 Importância e aplicação .....	25
3.4.2 Conceito .....	26
3.4.3 Classificação .....	27
3.4.4 Legislação relacionada ao uso dos aditivos .....	27
3.5. O uso de conservantes em alimentos.....	30
3.6. Segurança relacionada ao uso dos conservantes.....	33
3.7. Alternativas de conservação natural dos alimentos.....	35
3.8 PRÓPOLIS .....	42
3.8.1 Origem da Própolis .....	42
3.8.2 Composição .....	43
3.8.3 Propriedades .....	45
3.8.4 Toxicidade relacionada à própolis .....	46
3.9. Especiarias.....	47
3.10. Vida de prateleira.....	50
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
4.1. Formulações.....	53
4.2. Ensaio de conservação - Tempo de prateleira.....	54
<b>5. RESULTADOS</b> .....	54
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	65
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	73
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>ANEXO</b> .....	87



## 1 INTRODUÇÃO

A conservação de alimentos tem por objetivo oferecer ao indivíduo, alimentos e produtos alimentícios não só dotados de qualidades nutritivas, organolépticas e de palatabilidade normais, mas também isentos de micro-organismos nocivos e suas toxinas (EVANGELISTA, 2000).

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos. Essa preocupação se deve ao grande número de produtos alimentícios existentes e a uma tendência atual de se ingerir produtos naturais ou minimamente processados, com o mínimo ou isentos de conservantes químicos (MOREIRA et al., 1999; GLASS and DOYLE, 2010; MACHADO, 2011).

Um dos maiores problemas enfrentados pela indústria de alimentos refere-se à preservação de seus produtos. A preservação dos alimentos aumenta o tempo de prateleira e evita o desperdício (ESTELLES, 2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 20% dos alimentos produzidos são perdidos por deterioração. A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) concluiu que 54% do desperdício de alimentos no mundo ocorrem em etapas iniciais de produção, manipulação e armazenamento, sendo os 46% restante nas etapas de processamento, distribuição e consumo. A Organização Mundial de Saúde calculou que em países industrializados 30% das pessoas sofrem de alguma doença veiculada pelos alimentos a cada ano, sendo justificado um maior cuidado no preparo e na conservação dos alimentos, para um consumo seguro (WHO, 2002). Assim, existe uma demanda por novos métodos para reduzir, eliminar e impedir a colonização de microrganismos indesejáveis presentes nos alimentos, possivelmente em combinação com outros já existentes, aplicando o princípio da tecnologia de barreira. A preservação dos alimentos pode ser conseguida por aditivos químicos, como os conservantes, por processos físicos como refrigeração, secagem, congelamento, aquecimento e irradiação, ou biológicos pela produção de substâncias que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos, como acidez

de *Lactobacillus ssp* em alimentos derivados do leite, bem como lisozima, nisina, natamicina e polilisina obtidas à partir de microrganismos.

Atualmente, há um forte debate quanto à segurança dos conservantes químicos, uma vez que são associados com processos carcinogênicos e teratogênicos, além da toxicidade residual; quanto ao consumo em longo prazo (MOREIRA et al., 2005; ORTEGA-RAMIREZ et al., 2014). Como eles são ingeridos como alimento, medidas de segurança visando impedir riscos à saúde pública são necessárias. Para tanto a Comissão do *Codex Alimentarius*, órgão internacional em segurança alimentar, estabeleceu para a maioria dos aditivos alimentares a denominada dose diária aceitável, que significa, fundamentalmente, a quantidade máxima do conservante que pode ser ingerida diariamente.

Contudo os aditivos sintéticos para alimentos têm enfrentado ultimamente resistência de consumo em todo o mundo (ORTEGA-RAMIREZ et al, 2014). Garantir segurança e, ao mesmo tempo, atender a demanda para a conservação de atributos nutricionais e de qualidade têm resultado na crescente busca de conservantes naturais com potencial aplicação em alimentos, que possam ser utilizados sozinhos ou em combinação com outra tecnologia. Todavia, a escolha de um conservante antimicrobiano deve ser baseada na compatibilidade química e sensorial deste com o alimento alvo, na sua efetividade contra micro-organismos indesejáveis, segurança, dentre outras características (SERTTANNI; CORSETTI, 2008).

A própolis tem sido usada em numerosas finalidades; como remédio na medicina popular, em biocosméticos e na conservação de alimentos (GHISALBERTI, 1979).

Muitos estudos tem sido desenvolvidos para comprovar as propriedades conservantes da própolis em alimentos. As ações antibacterianas e antifúngicas são as propriedades mais amplamente pesquisadas da atividade biológica da própolis (MARCUCCI, 1995; LACERDA et al., 2011). O melhor conhecimento de suas propriedades visa, além de pesquisa e desenvolvimento de novas terapias, a agregação de valor econômico à própolis bruta, a fim de gerar uma fonte econômica de exploração agrícola e extrativismo autossustentável, traduzindo sua importância não mais sob um viés de medicamento, mas como de um produto preventivo, capaz de fornecer uma vida mais saudável (MENEZES, 2005).



Alimentar-se é fisiologicamente essencial a todos os seres que possuem vida, desta forma dar mais qualidade ao alimento consumido, com o cuidado com efeitos indesejáveis cumulativos; é aumentar seu valor nutricional, dando subsídio à saúde de forma íntegra. Assim considerando a importância da conservação dos alimentos, frente à deterioração por fungos, e atendendo à demanda da indústria, desenvolveu-se este estudo com o objetivo de avaliar o potencial de formulações à base de própolis tipificada e especiarias como parte do desenvolvimento de um produto com características conservantes para alimentos.

## OBJETIVO

GERAL: Verificar por ensaios *in vitro*, a potencial atividade antifúngica de formulações a base de própolis tipificada e especiarias quanto à capacidade de inibir o crescimento de microrganismos associados com a deterioração de alimentos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1- Comparar quatro formulações para determinar a melhor atividade antifúngica, quanto à concentração, temperatura e tempo de preservação dos meios de cultura.
- 2- Determinar a melhor formulação para a temperatura de 30°C, em comparação com conservantes químicos de referência.
- 3- Determinar a melhor formulação para a temperatura de 8°C, em comparação com os conservantes químicos de referência.
- 4- Determinar o impacto dos tratamentos físico-químicos para eliminação das características sensoriais na atividade de conservação.
- 5- Determinar a eficiência dos conservantes na proteção do meio de cultura quanto a utilização ou não das Boas Práticas de Fabricação.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 A FORMAÇÃO DO HÁBITO E A ALIMENTAÇÃO

No período Paleolítico, o homem caçava e coletava alimentos para satisfazer sua fome imediata. A disponibilidade de alimentos estava intimamente relacionada com a maneira na qual ele vivia. Era nômade, buscava regiões onde a caça e a coleta eram mais abundantes (MEZOMO, 2002).

Com o domínio do fogo, o homem pré-histórico tornava-se assim diferente de seus ancestrais hominídeos, que ainda viviam num estado de animalidade. A partir de então podia espantar os animais bravios, aquecer-se do frio, assar a carne e condimentá-la com sua própria cinza (FLANDLIN, MONTANARI, 1998).

As tradições culturais comuns uniam esses homens, transmitindo suas técnicas e sua sabedoria. Foi assim que as civilizações nasceram se desenvolveram e evoluíram de forma independente, mas sem perder sua identidade própria (ORDOÑEZ, 2005).

Da mesma forma a alimentação passou a não refletir somente a satisfação de uma necessidade fisiológica, idêntica em todos os homens, mas também a traduzir a diversidade de culturas e tudo àquilo que contribui para modelar a identidade de cada povo; suas técnicas de produção, suas estruturas sociais, suas representações dietéticas e religiosas e das receitas que delas resultam, de uma visão de mundo e do conjunto de tradições construídas lentamente no decorrer dos séculos. As relações entre estes aspectos da cultura e das maneiras de se alimentar sempre existiram, desde a conquista do fogo à chegada do “*fast-food*” (CONTRERAS, 1992; BLEIL, 1998; FLANDRIN; MONTANARI, 1998).

Diante das transformações impressas pela urbanização e pela globalização, a alimentação passou e continua passando por mudanças que afetam a qualidade dos alimentos produzidos e industrializados. Na verdade, um novo estilo de vida impõe novas expectativas de consumo, que acabam orientando as escolhas de alimentos.

Desta forma, a pós-modernização embalada pela globalização tem imposto novas formas de consumo alimentar, tem afetado o nosso paladar e aportes nutritivos, trazendo novos padrões alimentares, novos costumes, hábitos e práticas alimentares (BLEIL, 1998; SANTOS, 2005; POLÔNIO, PERES, 2009; PROENÇA, 2010).

Nas últimas décadas, com o acelerado processo de urbanização vem ocorrendo mudanças no modo de vida das famílias e nos hábitos alimentares. A participação das mulheres no mercado de trabalho, reduzindo a disponibilidade de tempo para o cuidado da alimentação da família, o maior acesso a uma enorme variedade de alimentos industrializados de fácil preparo e rápido consumo tem contribuído para essas mudanças, aliado a boa imagem que se estabelece desses produtos (GARCIA, 2003; ANVISA, 2008).

Diante do exposto o conhecimento tecnológico deve aliar-se à preservação de princípios morais capazes de levar à mudança social e cultural dos povos, ao desenvolvimento sustentável e à melhoria das condições de vida da população; o que inclui o debate a respeito da segurança alimentar. Assim, a tecnologia deve estar a serviço das populações garantindo não apenas comida na mesa da população, mas, além disso, a disponibilidade de alimentos que promovam a vida e sua evolução (FOSCHIERA, 2006).

### 3.2 ALTERAÇÕES NOS ALIMENTOS

Os alimentos que o homem consome têm diversas procedências (vegetal, animal, mineral). Os alimentos de origem animal são altamente perecíveis, devido à baixa estabilidade relacionada a diversos agentes, principalmente quanto aos microrganismos. O desenvolvimento dos microrganismos nos alimentos torna-os inaproveitáveis para consumo humano. A riqueza em nutrientes, a elevada atividade de água (água no alimento livre, que pode ser utilizada pelos microrganismos) ou água livre ( $A_w$  ou  $A_a$ ) e a variação de acidez ou do pH fazem dos alimentos um meio adequado para o crescimento de uma grande variedade de microrganismos que chegam ao produto aleatoriamente; sua multiplicação nos alimentos causam desde

alterações sensoriais e físico-químicas, até a formação de metabólitos que ao acumular-se, converte os alimentos em produtos de natureza tóxica (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Entretanto, mesmo que os animais mortos ou os tecidos desprendidos dos vegetais se encontrassem em ambiente totalmente estéril, sua vida útil não seria indefinida, porque são intrinsecamente portadores de outros agentes de alteração, como as enzimas autolíticas, que ao entrarem em contato direto com os respectivos substratos, acarretam a total destruição autolítica dos tecidos (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Além disso, há outros agentes que provocam alterações nos alimentos, como as reações químicas. Essas reações constituem uma série de fenômenos muito complexos dos quais não participam apenas um agente; elas são favorecidas por diversos fatores de origem física ou química. Entre os fatores de origem física destaca-se a luz solar, que facilita a auto-oxidação das gorduras e provoca o aparecimento de certos aromas anômalos e de descolorações na superfície dos alimentos. As temperaturas excessivamente elevadas favorecem reações prejudiciais para a qualidade dos alimentos, como o escurecimento não enzimático ou a desnaturação de proteínas (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Os agentes químicos capazes de causar alteração nos alimentos são diversos, entre eles, os ácidos e os álcalis, poderosos agentes desnaturantes das proteínas, os metais pesados, que facilitam as reações de auto-oxidação, além de serem tóxicos em concentrações elevadas, o oxigênio atmosférico, que participa de todas as reações oxidativas que ocorrem entre os componentes dos alimentos (ORDÓÑEZ et al, 2005).

Desta forma o conhecimento dos fatores intrínsecos e extrínsecos que agem sobre determinado alimento permite prever sua “vida de prateleira”, sua estabilidade microbiológica, bem como conhecer a capacidade de crescimento e/ou a produção de toxinas por microrganismos patogênicos eventualmente presentes. Contudo, o conhecimento de cada uma dessas características isoladamente é pouco útil, devido aos efeitos interativos entre elas, que podem ser não apenas aditivos como também sinérgicos ou mesmo antagônicos (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

### 3.2.1 A relação entre micro-organismos e os alimentos

Os micro-organismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Os alimentos são facilmente contaminados com microrganismos na natureza, durante a manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para crescimento de microrganismos. Se esses microrganismos tiverem condições de crescer, podem mudar as características físicas e químicas do alimento e podem causar sua deterioração. Os microrganismos no alimento podem também ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos (SILVA, 2002; BRASIL, 2004).

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Alguns fatores contribuem para o aumento dessas doenças, tais como: o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Além destes fatores, a maior exposição das populações a alimentos destinados ao pronto consumo coletivo, o consumo de alimentos em vias públicas, a utilização de novas modalidades de produção, o aumento no uso de aditivos e a mudanças de hábitos alimentares, sem deixar de considerar as mudanças ambientais, a globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, também contribuem para o aumento das DTA (BRASIL, 2004).

A presença do patógeno ou de sua toxina no alimento é uma das condições para ocorrência de uma DTA, mas outras condições são também necessárias como: a presença do patógeno em quantidade suficiente para causar uma infecção ou para produzir toxina; a capacidade do alimento de sustentar o desenvolvimento do patógeno; a permanência do alimento em uma temperatura ótima para o crescimento de microrganismos por tempo suficiente pode possibilitar a sua multiplicação e produção de toxina por microrganismos (PEREIRA, 2011).

### 3.3 ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO DOS ALIMENTOS

É impossível determinar exatamente quando, na história da humanidade, o homem tomou conhecimento da existência de microrganismos e da sua importância para os alimentos.

Arqueólogos encontraram evidências de ordenha de vacas para obtenção de leite, datadas de 9000 a.C. Relatos históricos indicam que na Babilônia antiga (7.000 a.C.), o homem já conhecia a fabricação de cerveja. Os Sumérios (3000 a.C.) foram os primeiros criadores de gado de corte e de leite e os primeiros a fabricar manteiga. Já conheciam também técnicas de salga de carnes e peixes. Leite, manteiga e queijos já eram conhecidos pelos egípcios em 3000 a.C. Nessa época, judeus, chineses e gregos também utilizavam sal para conservação dos alimentos. Os assírios, em 3500 a.C., já conheciam a arte de fabricação de vinhos. Os romanos, em 1000 a.C., empregavam neve para a conservação de carnes e frutos do mar. Técnicas de defumação de carnes e de produção de queijos e vinhos foram aprimoradas nessa época (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

Ainda que a conservação dos alimentos tenha sido praticada ao longo de toda a história do homem, somente depois de Louis Pasteur (1857) tomamos conhecimento do por que dessa decomposição (GAVA, 1984).

Para ampliar a vida útil dos alimentos, é necessário lutar contra agentes de alteração. Contra agentes físicos, como a luz, a utilização de embalagens próprias mostra-se eficiente, contra alterações químicas, como variações de acidez e alcalinidade recorre-se à utilização de neutralizantes ou substâncias-tampão, contra os metais, emprega-se material apropriado, quelantes ou sequestrantes de íons, contra o oxigênio, utiliza-se acondicionamento a vácuo ou sob atmosferas de gases inertes. Para combater alterações causadas por agentes biológicos e enzimas autolíticas presentes nos alimentos de origem animal, cabem três estratégias: minimizar seu contato com o produto; destruí-los caso tenham conseguido ou impedir sua multiplicação. Para isso o emprego de Boas Práticas de Fabricação (BPF), tratamento com variações térmicas, modificações nas condições ambientais,

criando outras barreiras que impeçam ou inibam o crescimento desses contaminantes, são de grande importância. Entre essas medidas, podem-se mencionar o decréscimo da atividade de água, decréscimo da temperatura e pH, adição de substâncias conservantes, modificação da atmosfera; contudo, são métodos que não afetam igualmente todos os microrganismos, por isso são utilizados em combinações com objetivo de aumentar a vida útil dos produtos (FRANCO, LANDGRAF; 2008; GORETTI et al., 2009).

Na Tabela 1 estão listadas algumas causas de alterações comuns encontradas nos alimentos com suas respectivas formas de controle.

**Tabela 1.** Estratégias para controlar os agentes de alteração



<b>Objetivo</b>	<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>
<b>Inibição de crescimento microbiano, enzimas e reações químicas</b>	Refrigeração	Decréscimo da temperatura
	Congelamento	
	Desidratação	Decréscimo da atividade de água
	Dessecação	
	Liofilização	
	Evaporação	
	Adição de solutos	
	Vácuo	Decréscimo da concentração de oxigênio
	Atmosferas Inertes	
	Atmosferas modificadas	Aumento da concentração de gás carbônico e oxigênio
<b>Destruição de microrganismos, enzimas e insetos; Inibição de germinação e maturação</b>	Adição de ácidos	Acidificação
	Fermentação Láctica	
	Adição de Álcool	Aumento da concentração de etanol
	Fermentação etanólica	
	Substâncias químicas	Conservantes
		Antioxidantes
	Termização	Aplicação do calor
	Pasteurização	
	Esterilização	
	Irradiação	Aplicação de radiações ionizantes
<b>Evitar contato com agentes alterantes</b>	Bacteriocinas	Agentes antimicrobianos
	Peróxido de hidrogênio	
	Óxido de etileno	
	Acondicionamento	

## 3.4 ADITIVOS

### 3.4.1 Importância e aplicação

Os alimentos, substâncias ou misturas de substâncias químicas tais como, glicídios, protídeos, lipídeos, vitaminas, sais minerais e água, em geral, contêm outros componentes químicos como conservantes, corantes, acidulantes adicionados direta ou indiretamente durante o cultivo, estocagem ou processamento. Esses produtos químicos são denominados de aditivos e são incorporados com o objetivo de melhorar a qualidade do alimento, seja no aspecto visual, no gosto ou conservação (SOARES, 2005; CARVALHO, 2005).

Tão antigos quanto os humanos, os aditivos alimentares sempre estiveram presentes em nossa dieta. As antigas civilizações descobriram que é possível conservar carnes e peixes com sal (cloreto de sódio) e usar diversas ervas e temperos para melhorar o seu sabor. Já na época dos romanos, o enxofre era utilizado no preparo dos vinhos para melhorar sua conservação. Os aditivos são utilizados há séculos, com diferentes finalidades, tais como aumentar o tempo de conservação, atribuir ou realçar algumas características próprias de alguns alimentos. Entretanto, com o advento da vida moderna, cada vez mais aditivos têm sido empregados (AUN et al., 2011).

Atualmente é quase impossível encontrar algum alimento sem algum tipo de aditivo. As indústrias dispõem de um grande número de técnicas para conservação e aprimoramento de alimentos, que garantem a disponibilidade destes, além da inovação de produtos e adequação ao paladar das pessoas. O FDA (Food and Drug Administration) já autorizou nos Estados Unidos o uso de mais de 3000 aditivos alimentares, dentre os quais estão os conservantes (AUN et al., 2011).

Uma gama diversificada desses produtos químicos, naturais e sintéticos, vem sendo colocada à disposição da indústria de alimentos, como forma de auxílio tecnológico ao aproveitamento das matérias primas, tornando-as após suas

transformações, alimentos atraentes, ao gosto e desejo dos consumidores, além de aumentar sua durabilidade. Não há como imaginar o mundo atual sem a utilização dos aditivos alimentares, pois seu uso, quando adequado, proporciona um maior aproveitamento das matérias primas e por consequência diminuição dos desperdícios (SOARES, 2005).

Diante do exposto os aditivos podem ser considerados necessários à produção eficiente e em abundância de alimentos de alta qualidade, constituindo um marco na vida da humanidade, mais ainda, todo o esforço se faz necessário para que no futuro a produção e distribuição de alimentos sejam eficientes, considerando não só um aumento nas taxas de natalidade, mas principalmente a elevação da expectativa de vida (SOARES, 2005).

#### 3.4.2 Conceito

O Comitê Misto constituído da Organização para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) considera os aditivos alimentares como sendo matérias não nutritivas que se incorporam intencionalmente ao alimento, em geral em pequena quantidade, para melhorar seu aspecto, seu sabor, sua consistência e ou sua conservação (SIMÃO, 1985).

Similarmente, o MERCOSUL/GMC/RES nº 31/92 considera os aditivos alimentares ingredientes adicionados intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação ou manipulação de um alimento. Porém, o MERCOSUL ressalta que ao agregar-se ao alimento, o próprio aditivo ou seus derivados poderão se converter em um componente do alimento, isso não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais (BRASIL, 1997; BARUFFALDI, OLIVEIRA; 1998).

### 3.4.3 Classificação

Os aditivos alimentares são substâncias químicas que formam um grupo bastante heterogêneo de substâncias que se classificam, de acordo com sua função em: agentes conservantes (antioxidantes ou antimicrobianos), acidulantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes, umectantes, anti-umectantes, corantes, flavorizantes (realçadores de sabor) e adoçantes (AUN et al., 2011).

### 3.4.4 Legislação relacionada ao uso dos aditivos

A alimentação e a nutrição constituem requisitos básicos para a promoção e a proteção da saúde, possibilitando a afirmação plena do potencial de crescimento e desenvolvimento humano, com qualidade de vida e cidadania. No plano individual e em escala coletiva, esses atributos estão consignados na Declaração Universal dos Direitos Humanos, os quais foram reafirmados no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais (1966) e incorporados à Legislação nacional em 1992 (BRASIL, 2007).

De acordo com a Codex Alimentarius, alimento seguro é aquele inócuo à saúde humana, ou seja, livre de perigos, que neste contexto pode ser um agente biológico, químico ou físico, ou condição do alimento com um potencial de causar efeito adverso à saúde.

De acordo com Belik (2003), o conceito de Segurança Alimentar veio à luz a partir da 2ª Grande Guerra, com mais da metade da Europa devastada e sem condições de produzir seu próprio alimento. Esse conceito leva em conta três aspectos principais: quantidade, qualidade e regularidade no acesso aos alimentos.

Dessa forma o conceito de segurança alimentar que, anteriormente, era limitado ao abastecimento, na quantidade apropriada, foi ampliado, incorporando também o acesso universal aos alimentos, o aspecto nutricional e, conseqüentemente, as questões relativas à composição, à qualidade e ao

aproveitamento biológico. O Brasil adotou esse novo conceito a partir de 1986, com a I Conferência Nacional de alimentação e Nutrição, o qual se consolidou quando da realização da I Conferência Nacional de Segurança Alimentar, em 1994 (BRASIL, 2007).

A legislação em relação a alimentos foi originalmente introduzida em muitos países para prevenir a venda de produtos fraudulentos e objetivando verificar desvios nos padrões para composição e peso. Somente em tempos mais recentes a legislação sofreu expansão e incluiu considerações de saúde pública, tais como aquelas referentes à transmissão de bactérias nocivas em alimentos (HAYES, 1995).

O emprego de aditivos justifica-se por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais, conforme Portaria SVS/MS 540, de 27 de outubro de 1997. A necessidade tecnológica do uso de um aditivo é justificada sempre que proporcionar vantagens de ordem tecnológica, exceto quando estas possam ser alcançadas por processos de fabricação mais adequados ou por maiores precauções de ordem higiênica ou operacional.

Todos os aditivos alimentares são alvos de estrita legislação nacional e internacional, que assegura a boa qualidade e adequada etiquetagem dos alimentos. Quando um aditivo é aprovado para utilização na indústria alimentícia, são publicadas regulamentações que indicam em que tipos de alimentos eles podem ser utilizados, a máxima concentração permitida e como deverá ser mencionado nos rótulos (FREITAS, FIGUEIREDO; 2000).

Os agentes antimicrobianos são considerados como aditivos alimentares. Seu uso está regulamentado por órgãos nacionais e internacionais. Os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, bem como critérios para conclusão e interpretação de resultados das análises microbiológicas de alimentos destinados ao consumo humano, estão definidos pela RDC nº 12 (BRASIL, 2001).

Assim, cada país tem seus próprios regulamentos, com a lista de aditivos aprovados. Em nível internacional a OMS em conjunto com a FAO, regulamenta o uso de aditivos em alimentos, baseando-se no que está preconizado pela FDA (Estados Unidos), Normas da União Européia e Codex Alimentarius (BELLOSO et al., 2009).

O JECFA é o comitê científico internacional de especialistas em aditivos alimentares administrada pelo FAO e pela OMS. O JECFA se reúne desde 1956 e realiza a avaliação de risco associado ao consumo de aditivos alimentares, contaminantes, toxinas de ocorrência natural e resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, assessorando o Codex Alimentarius em suas decisões.

Com base em estudos toxicológicos, o JECFA estabelece, quando possível, a Ingestão Diária Aceitável (IDA) dos aditivos. A IDA é a quantidade estimada de aditivo alimentar, expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo (mg/kg p.c.) que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos científicos disponíveis na época de avaliação (AUN et al., 2011).

A segurança dos aditivos alimentares é primordial. Antes de autorizado o uso de um aditivo em alimentos, este deve ser submetido a uma adequada avaliação tecnológica, em que deve-se levar em conta, dentre outros aspectos, o efeito acumulativo, sinérgico e de proteção, decorrente do seu uso. Estas substâncias devem ser reavaliadas quando necessário, à luz do conhecimento científico disponível e caso se modifiquem suas condições de uso (BRASIL, 1997).

No Brasil na área de alimentos, a ANVISA coordenam, supervisionam e controlam as atividades de registro, informações, inspeção, controle de risco e estabelecimento de normas e padrões, a fim de garantir as ações de vigilância sanitária de alimentos, bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, limites de contaminantes e resíduos de medicamentos veterinários. Essa atuação é compartilhada com outros ministérios como o da Agricultura, Pecuária, Abastecimento e com estados e municípios, que integram o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2009).

Um aditivo ou coadjuvante somente pode ser utilizado pela indústria alimentícia quando estiverem explicitamente definidos em legislação específica, com suas respectivas funções, limites máximos e categorias de alimentos permitidas. As substâncias que não constarem na legislação não podem ser utilizados em alimentos (BRASIL, 1997).

O laudo de análise prévia de aditivos alimentares é exigido no artigo 9º do decreto-lei 986, de 21 de outubro de 1969. A resolução CNNPA 21/75 adota para

análise de aditivos as técnicas analíticas adotadas ou recomendadas pela Farmacopéia Brasileira, Food Chemicals Codex, Food and Drug Administration (FDA), Comitê Misto FAO/OMS de peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA).

A maioria dos antimicrobianos naturais são reconhecidos por sua segurança de uso, no entanto, isso vai depender de sua origem, referentes ao consumo como alimento ou não, e ausência de toxicidade de forma concentrada. Por isso alguns limites com base nestas condições, efeitos sobre atributos sensoriais e a ingestão diária aceitável, pode ser estabelecido em cada caso (BELLOSO et al., 2009).

No Brasil, o decreto nº 7.272, de 25 de agosto de 2010; regulamenta a Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006, que cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional- SISAN com vistas a assegurar o direito humano à alimentação adequada, institui a Política Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional- PNSAN, estabelece os parâmetros para a elaboração do Plano Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Em seu art. 3º a PNSAN estabelece diretrizes, como promoção de acesso universal à alimentação adequada e saudável, promoção de abastecimento e estruturação de sistemas sustentáveis e descentralizados, de base agroecológica, de produção, extração, processamento e distribuição de alimentos; e instituição de processos permanentes de educação alimentar e nutricional, pesquisa e formação nas áreas de segurança alimentar e nutricional e do direito humano à alimentação adequada; bem como apoio a iniciativas de promoção da soberania alimentar, segurança alimentar e nutricional e do direito humano à alimentação adequada em âmbito internacional e a negociações internacionais baseadas nos princípios e diretrizes da Lei nº 11.346, de 2006 (BRASIL, 2010).

Um problema recorrente é a fiscalização, já que envolve diretamente a complexa ação de vigilância sanitária, é importante levar em conta a quantidade de produtos e empresas existentes. No Brasil, neste setor, conta-se atualmente com mais de 100 mil produtos alimentícios e 20 mil empresas cadastradas; o que dificulta uma fiscalização mais efetiva (BRASIL, 2007).

### 3.5 O USO DE CONSERVANTES EM ALIMENTOS

Desde o início da humanidade, o ato de defumar as carnes, mesmo que involuntariamente já se traduzia numa forma de conservar o alimento (ORDÓÑEZ e cols., 2005).

Pode-se definir como conservante toda a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (BRASIL, 1997).

Dentre os fatores considerados para seleção de um conservante pode-se citar: pH, composição do produto, existência de outras substâncias inibidoras de desenvolvimento microbiano, atividade de água ( $A_w$  ou  $A_a$ ), nível inicial de contaminação, microrganismo a ser inibido, facilidade de manipulação do conservante e impacto no paladar e custo (FREITAS, FIGUEIREDO, 2000; CARNICEL et al., 2005).

Os agentes conservantes são necessários para garantir a manufatura segura de alimentos e a não deterioração destes durante toda sua vida de prateleira. Muitos conservantes são utilizados na produção de alimentos. Muitos conservantes são efetivos sob baixos pHs: ácidos benzoicos ( $\text{pH} < 5,0$ ) e ácidos sórbicos ( $\text{pH} < 6,5$ ), além de sulfetos ( $\text{pH} < 4,5$ ). Os parabenzenos são os mais efetivos em condições de pHs neutro (FORSYTHE, 2002).

Os conservantes e os agentes antimicrobianos têm um papel importante no abastecimento de alimentos quimicamente estáveis e seguros. A demanda crescente para alimentos de conveniência e o tempo de prateleira razoavelmente longo exigido pelas cadeias de distribuição, tornam imperativo o uso de conservantes em alimentos processados. Alguns deles, tais como os sulfatos, nitratos e outros sais, já estão sendo usados há séculos em carnes processadas e vinhos. A escolha de um agente de conservação deve ser baseada no conhecimento do seu espectro antimicrobiano, as propriedades químicas e físicas tanto do alimento quanto do conservante, as condições de manuseio, processo e estocagem e a segurança de uma alta qualidade inicial do alimento a ser conservado. Os conservantes não são paliativos para falhas ou problemas sanitários no processo (BRASIL, 1997).

Na Tabela 2 têm-se exemplos de conservantes tradicionalmente utilizados e suas respectivas aplicações.



**Tabela 2-** Conservantes antimicrobianos para alimentos

<b>Conservante</b> (faixa de concentração típica, mg/kg)	<b>Exemplos de uso</b>
<b>Ácidos orgânicos fracos e ésteres conservantes</b>	
Propionato (1-5000)	Pães, produtos de panificação e queijos
Sorbatos (1-2000)	Queijos frescos e processados, produtos lácteos, produtos de panificação, xaropes, geleias, gelatinas, refrigerantes, margarinas, bolos, temperos.
Benzoato (1-3000)	Picles, refrigerantes, temperos, peixes semi conservados, geleias, margarinas.
Esteres benzoatos (parabenzenos, 10)	Produtos de peixes marinados
<b>Ácidos inorgânicos conservantes</b>	
Sulfito (1-450)	Pedaços de fruta, frutas desidratadas, vinho, embutidos de carne.
Nitrato e nitrito (50)	Produtos de carne curada
<b>Ácidos minerais acidulantes</b>	
Ácido fosfórico, ácido clorídrico	Bebidas
<b>Antibióticos</b>	
Nisina	Queijo, alimentos enlatados.
Natamicina (primaricina)	Sucos de frutas industrializadas
Fumaça	Carne e peixe

Fonte: adaptada de Forsythe, 2002.

A eficiência de um agente conservante antimicrobiano está relacionada a três fatores: efeito do pH, efeito do grau de dissociação do ácido (pKa) e ação específica

do agente antimicrobiano. Os conservadores permitidos pela legislação brasileira podem ser agrupados em ácidos lipofílicos e derivados (ácido benzoico e benzoatos de sódio, potássio e cálcio; ácido sórbico e sorbatos de sódio, potássio e cálcio; ácido propiônico e seus sais de sódio, potássio e cálcio; ésteres do ácido p-hidróxido benzoico (“parabens”)); nitratos e nitritos; dióxido de enxofre e derivados; nisina e natamicina (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

### 3.6 SEGURANÇA RELACIONADA AO USO DOS CONSERVANTES

Apesar de relativamente seguros, quando seguidos quantidade e finalidade de uso recomendadas, os conservantes químicos merecem atenção quanto à segurança de uso. Mesmo conservantes de uso tradicionais ao longo da história de conservação dos alimentos, como o sal e o açúcar, tem comprovadamente efeitos sinérgicos sobre algumas patologias ou prejuízo para a saúde, quando consumidos em excesso (GLASS, DOYLE, 2010).

É pertinente a constante preocupação com as substâncias químicas sintéticas, pois estas podem desencadear o câncer, estando presentes nos alimentos como aditivos ou contaminantes ambientais de uso na agricultura como, por exemplo, os agrotóxicos. Também novas substâncias podem ser formadas durante a cocção ou através do processo de conservação de alimentos a partir do emprego de técnicas como defumação e a salmoura. A capacidade que essas substâncias apresentam de induzir danos celulares e mutação no ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser minimizada pelo sistema de defesa natural, tanto quanto por um eficiente sistema de desintoxicação celular e reparação do DNA produzidos pelos organismos animal e humano, em condições favoráveis (GLASS, DOYLE, 2010).

Desta forma o monitoramento do consumo de alguns alimentos e seus constituintes tem mostrado a relação direta destes com a saúde de uma forma geral. O sódio, por exemplo, é um nutriente essencial, com funções importantes na regulação do volume de líquido extracelular e do transporte ativo de moléculas

através das membranas celulares. No entanto, estimativas recentes nos Estados Unidos mostram que mais de 95% dos homens e 75% das mulheres excedem a dose diária recomendada de ingestão de sódio. Uma vez que estes altos níveis de sódio na dieta estão associadas a uma elevada prevalência de hipertensão, pré-hipertensão e possivelmente a outros efeitos adversos sobre a saúde, como doenças com relação direta ao aumento da pressão arterial, como síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e diabetes, que se agravam quando existe perda da função renal. Muitas organizações nacionais e internacionais de saúde recomendam a diminuição de ingestão de sódio significativamente. Tradicionalmente, o sal (cloreto de sódio) tem sido utilizado como um conservante de alimentos que mata ou limita o crescimento de agentes patogênicos alimentares e organismos de deterioração, por diminuir a atividade da água (Aw) (GLASS, DOYLE, 2010). Muitos alimentos processados contêm altos níveis de sal e vários países desenvolveram programas nacionais para reduzir significativamente o teor de cloreto de sódio em muitos alimentos processados e incentivar uma diminuição de uso (GLASS, DOYLE, 2010).

Segundo a Abia (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação) (2014), baseando-se em dados do IBGE de 2008 e 2009, 71,5% do total do nutriente ingerido no Brasil, vem do sal de cozinha quando adicionado no preparo do alimento e não proveniente da comida industrializada. A Abia em acordo com o Ministério da Saúde prevê uma redução de 20.491 toneladas de sódio dos alimentos processados até 2020.

Estudos clínicos em humanos mostraram que uma ingestão elevada de cloreto de sódio, associada ao baixo consumo de frutas e verduras, é capaz de reduzir a acidose metabólica, com conseqüente aumento da reabsorção óssea e excreção de cálcio, ocasionando perda da densidade óssea (GLASS, DOYLE; 2010).

A utilização do conservante nitrito de sódio, que está inteiramente ligado à quantidade ingerida em contato com substâncias do trato gastrointestinal, reage formando nitrosamina, que é um metabólico carcinogênico, devido à temperatura e o ambiente ácido. Por essa razão, deve ser reduzida a ingestão de nitritos, que podem

ser encontrados em alimentos defumados ou curados como carnes, peixes, linguiças e salsichas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

No Japão, com base na técnica do ensaio cometa, foram avaliados se os aditivos alimentares mais consumidos no país induziam danos no DNA dos ratos. Os aditivos conservadores (derivados do ácido benzoico e o nitrato de sódio) não provocaram danos no DNA. Já os antioxidantes butil-hidroxianisol (BHA) e butil hidroxitolueno (BHT) induziram danos no DNA do estômago, cólon, bexiga e cérebro. Sendo que as doses mais baixas para indução de danos no DNA do cólon foram 500 mg/Kg para o BHA e 100 mg/Kg para o BHT. Apesar de o referido estudo ter sido realizado com doses elevadas de aditivos, o consumo desenfreado dos mesmos pode ultrapassar a IDA recomendada pela JECFA acarretando sérios riscos à saúde (SASAKI et al., 2002).

O estudo realizado por Boris e Mandel (1994) mostraram o papel dos corantes e conservantes artificiais no aparecimento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Através de uma dieta de exclusão, os sintomas desapareceram. Crianças atópicas com transtorno do déficit de atenção e hiperatividade tiveram uma resposta benéfica mais significativa com a dieta de eliminação do que as crianças não atópicas. No que se referem aos conservadores, os derivados do ácido benzoico e os ácidos sulfídricos e sulfito podem induzir à hiperatividade. No entanto estudos mais aprofundados são necessários.

### 3.7 ALTERNATIVAS DE CONSERVAÇÃO NATURAL DOS ALIMENTOS

Os interesses das pessoas em relação à segurança alimentar têm aumentado em todo mundo, já que o número e a gravidade de doenças transmitidas por alimentos têm crescido cada vez mais. Dados dos Estados Unidos mostraram que, a cada ano, 0,1% da população são hospitalizados devido a doenças transmitidas por alimentos (FORSYTHE, 2002).

O que são alimentos seguros? É uma pergunta que invoca diferentes respostas, desde risco igual a zero ou risco aceitável. Contudo, a dificuldade em

produzir um alimento seguro baseia-se no fato de que a população de consumidores é bastante diversificada, com variado grau de sensibilidade e estilo de vida. Além disso, alimentos com altos níveis de conservantes, para reduzir a população microbiana, são indesejáveis pelo consumidor e percebidos como processados demais ou com aditivos químicos. A pressão dos consumidores se volta para uma maior quantidade de alimentos frescos e minimamente processados que possuam conservantes naturais com garantia de segurança absoluta. Assim garantir a elaboração, fabricação e consumo de um alimento requer a necessidade de seguir regras bem delineadas, que possam permitir o consumo seguro (FORSYTHE, 2002).

Atualmente, os consumidores têm exigido mais alimentos naturais com baixos níveis de aditivos químicos e menos processados, porém com longa duração. A legislação alimentar tem restringido o uso de alguns antimicrobianos sintéticos por causa da possibilidade de toxicidade para os consumidores. Nesse sentido, os temperos e os produtos naturais derivados de plantas e fungos têm surgido como opção de compostos efetivos capazes de fornecer segurança microbiológica para os alimentos (SOUZA et al., 2007; KUMAR et al., 2010).

Desde o princípio das civilizações, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia mas como também medicamentosa. A pesquisa de substâncias antimicrobianas nos vegetais, desenvolveu-se mais após a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming. Os alcaloides, flavonoides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos, poliacetilenos e óleos essenciais são compostos originários de várias vias metabólicas. Eles têm importância nos mecanismos de defesa das plantas contra seus predadores, como fungos, bactérias, vírus, parasitas, insetos, moluscos e animais superiores. Essas substâncias podem apresentar também ação antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, *Mycobacterium*, leveduras e fungos filamentosos (CALIXTO, 2001).

As propriedades bacteriostáticas, bactericidas, fungistáticas e fungicidas a partir de produtos vegetais têm sido comprovadas através de intensivas pesquisas em todo o mundo. Geralmente, são estudadas, avaliadas e confirmadas através de ensaios biológicos “*in vitro*” - testes de sensibilidade ou suscetibilidade (CALIXTO, 2001).

A estabilidade intrínseca dos alimentos frente ao ataque de microrganismos é devida à presença de algumas substâncias naturalmente presentes. Os condimentos contêm vários óleos essenciais com atividade antimicrobiana, como eugenol do cravo, um poderoso antioxidante que conserva os alimentos, aldeído cinâmico e eugenol na canela, um bom conservante e aromatizante, além de apresentar excelente atividade fungicida e inseticida; alil-isocianato na mostarda, timol e isotimol no orégano. Os derivados de ácido hidroxicinâmico, encontrados em frutas e vegetais, são importantes agentes antimicrobianos, assim como os taninos presentes em frutas e sementes (FRANCO, LANDGRAF, 2008).

Considerando o desejo de produtos mais práticos, que geralmente necessitam de agentes conservantes para prolongar sua vida de prateleira, e mais saudáveis, uma opção encontrada é o uso de óleos essenciais, que são produtos voláteis de origem vegetal obtido por processos físicos (destilação por arraste com vapor de água, destilação por pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007).

Os óleos essenciais além de apresentarem atividade antioxidante e anti-inflamatória são considerados como agentes antimicrobianos mais importantes presentes nas plantas (MACHADO et al., 2011). Constituem misturas complexas de compostos, podendo conter mais de 60 componentes, e caracterizam-se pela presença de dois ou três compostos majoritários, que, em geral, determinam a sua propriedade biológica. Contudo, existem evidências de que os componentes minoritários desempenham um papel fundamental na atividade antibacteriana do óleo, possivelmente pela produção de efeito sinérgico com outros componentes. Todavia, a composição química do óleo essencial de uma determinada planta pode variar em função da época da colheita, origem geográfica e diferentes partes da planta (DELAQUIS et al., 2002). Os componentes fenólicos são citados como os principais responsáveis pelas propriedades antibacterianas desses óleos, porém há

relatos de que compostos não fenólicos, como o alil-isotiocianato, são mais efetivos contra bactérias gram negativas, além de serem efetivos também contra fungos (TURINA et al., 2006).

Na Tabela 3 encontram-se alguns exemplos de óleos essenciais, com seus principais compostos ativos e microrganismos contra os quais podem ser empregados

**Tabela 3:** Óleos Essenciais com Propriedades Antimicrobianas

<b>Óleo Essencial</b>	<b>Composto antimicrobiano</b>	<b>Organismos alvos</b>
<b>Pimenta-da-jamaica (pimenta dióica)</b>	<b>Eugenol, Metil-eugenol</b>	<b>Leveduras, <i>Acetobacter, clostridium botulinum</i></b>
<b><i>Cassis (Cinnamomum cassis)</i></b>	<b>Aldeído cinâmico, Acetato cinâmilino</b>	<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i>, leveduras</b>
<b>Cravo (<i>Syzygium aromaticum</i>)</b>	<b>Eugenol, Acetato de eugenol</b>	<b><i>Acetobacter, Cl. Botulinum</i></b>
<b>Canela Bark (<i>Sinnamomum Zeylanicum</i>)</b>	<b>Aldeído cinâmico</b>	<b>Leveduras, <i>Acetobacter, Cl. botulinum</i></b>
<b>Alho ( <i>Allium sativum</i>)</b>	<b>Eugenol, Propenil sulfonílico-2</b>	<b><i>L. monocytogenes, Cl. Botulinum</i></b>
<b>Mostarda (<i>Sinapis nigra</i>)</b>	<b>Sulfito de propenil-2, Isotionato de propenil-2</b>	<b>Leveduras, <i>Acetobacter</i></b>
<b>Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)</b>	<b>Timol, Carvacrol</b>	<b><i>V. parahaemolyticus, Cl. Botulinum</i></b>
<b>Páprica (<i>Capsicum annum</i>)</b>	<b>Capsidina</b>	<b><i>Bacillus</i></b>
<b>Tomilho</b>	<b>Timol, Carvacrol</b>	<b><i>Cl. botulinum</i>, Bactérias gram positivas, <i>Asp. Parasiticus, Asp. Flavus</i>, Aflotoxinas</b>

Fonte: Forsythe, 2002.

A utilização de óleos essenciais de orégano incorporados em embalagens de pizzas, como forma de aumentar sua conservação sem interferir nas características do produto, mostra-se como alternativa promissora em substituição aos métodos



tradicionais de conservação do produto, diminuindo a carga de produtos químicos utilizados em sua conservação (BOTRE et al., 2010).

Numa vasta revisão Ortega- Ramires et al. (2014) defendem o uso de ativos extraídos de plantas popularmente utilizadas a séculos, como fitoterápicos, para uso como conservantes pela indústria de alimentos; citando o uso do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão), enfatizando suas propriedades como antioxidante, e antimicrobiana; apresentando boa atividade contra *Salmonella entérica*, em baixas concentrações, propondo seu uso como agente fotoquímico incorporado em revestimentos de polímeros, como efeito sinérgico antibacteriano em embalagens; além disso, estes compostos mostraram atividade antibiofilme. Os autores deste estudo enfatizam o uso do Carvacrol, composto bioativo com atividade antimicrobiana e antioxidante, podendo ser extraído da espécie vegetal *C. ambrosioides*, sua LD<sub>50</sub>= 810 mg/kg em ratos, é considerado pela FDA e Regulamento da União Européia como seguro, para uso em alimentos; mostrando atividade contra as bactérias *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas Hydrophila*, *P. fluorescens*, e fungos *B. cinérea* e *Monilinia* frutícola.

Outro fator relevante para busca por conservantes naturais é que muitos microrganismos patogênicos adquirem resistência aos antibióticos, havendo necessidade de serem substituídos por produtos de origem natural (SARTORATTO et al., 2004). Estudos vêm sendo realizados para avaliar a atividade antifúngica e antimicrobiana de plantas medicinais, objetivando aperfeiçoar suas aplicações em diversas áreas, com melhor aproveitamento de suas propriedades naturais (CHAH et al.,2006; FARIA et al.,2006).

De forma a corroborar com essa linha de estudos, Sartoratto et al., (2004); Nguetack (2004); Nakamura et al.,(1999) e Ilori et al., (1996); avaliaram a atividade da planta *Ocimum gratissimum*, conhecida popularmente como “alfavaca”, “alfavacão” ou “alfavaca-cravo”; planta de aroma forte e agradável, originária do oriente, ocorrendo em todo o Brasil e do qual existem diversos quimiotipos, quanto a sua propriedade como conservante em alimentos, uma vez que são fornecedoras de óleos largamente utilizados como temperos de pratos especiais e como aromatizantes de licores e de perfumes (LORENZI, MATOS, 2002). Comprovou-se que atividade conservadora desta planta é devida às substâncias encontradas em

seu óleo essencial tais como: cimen-8-ol, eugenol e trans-cariofileno, entre outras. Passos et al. (2009) avaliaram a atividade de inibição antibacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a intensidade de atividade de inativação bacteriana (IINAB/bactericidia) de soluções conservantes contendo extratos etanólicas e hídricas de *Ocimum gratissimum*, sobre inóculos padronizados de *Salmonella enteritidis* (ATCC 11076), *Escherichia coli* (ATCC 11229) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), tendo o extrato alcoólico apresentado atividade mais intensa (inibição/inativação) frente aos três agentes; *Salmonella enteritidis* foi a bactéria mais sensível à atividade antibacteriana em todas as soluções conservantes.

Existem alguns conservantes contendo óleos essenciais comercialmente disponíveis. A “DMC Base Natural” é um conservante de alimentos, produzidos por DOMCA S.A. (Alhendin, Granada, Espanha), e compreende 50% de óleos essenciais de alecrim, sálvia e frutas cítricas, além de glicerol 50%. “Protecta Two” são misturas de extratos de erva, produzidos pela Baviera Corp apopka (Flórida, EUA), e são classificados como aditivos alimentares seguros nos Estados Unidos (PEREIRA, 2011).

A bioconservação por bactérias do grupo *Lactobacillus casei* em produtos lácteos foi proposta, desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff- Instituto Pasteur, Paris- promoveu o uso desses microrganismos para bacterioprolaxia e bacterioterapia. Cepas deste grupo como *Lactobacillus casei/paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* tem sido amplamente estudadas com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo frequentemente empregadas como probióticos em alimentos industrializados. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (BURITI, SAAD, 2007).

Seguindo essa linha de estudos, como opção natural aos aditivos químicos utilizados na alimentação; a própolis tem sido usada como remédio na medicina popular, como constituinte de biocosméticos, como conservante em alimentos e outras numerosas finalidades (GHISALBERTI, 1979). Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos para comprovar as propriedades conservantes da própolis em alimentos. As ações antibacterianas e antifúngicas são as propriedades mais amplamente pesquisadas da atividade biológica da própolis (MARCUCCI, 1995).

Lappe et al. (2004), avaliando a eficiência do extrato hidroalcoólico de própolis, em diferentes concentrações, no controle de formação de fungos na superfície de salame tipo italiana, bem como a sua influência sobre os parâmetros físico-químicos e sensoriais, obteve bons resultados, concluindo que sua utilização no referido produto mostra eficiência no controle da formação de fungos e que de uma forma geral, sua utilização não influencia significativamente nas características físico-químicas e sensoriais do salame tipo italiano.

### 3.8 PRÓPOLIS

#### 3.8.1 Origem da própolis

As abelhas fazem parte da vida do homem desde os primórdios da humanidade, fornecendo seus produtos para a alimentação humana como, por exemplo, o mel. Antigas civilizações (chinesa, tibetana, assíria, egípcia, inca e greco-romana), com suas terapias milenares conheceram e utilizaram os produtos das abelhas como valiosos recursos em suas práticas medicinais (PEREIRA, 2001; LACERDA e cols., 2011). O desenvolvimento da apicultura no Brasil ocorreu em várias fases (KERR, 2006). Desde a introdução da abelha *Apis mellifera*, em 1839, a apicultura nacional tem apresentado crescente desenvolvimento, favorecido pela extensão do território brasileiro, floradas diversificadas e clima propício que possibilitam elevada produção e o manejo durante todo o ano. O grande marco da apicultura no Brasil ocorreu em 1956, com a introdução da abelha africana *Apis mellifera scutellata*. Essas abelhas não só mudaram o panorama da produção apícola no país, como também exigiram novas técnicas de manejo (COUTO; COUTO, 2002).

Própolis é nome genérico para a substância resinosa produzida por abelhas de vários tipos de plantas. É uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas melíferas de ramos, flores, pólen, brotos, botões

florais e exsudatos de plantas, a qual as abelhas adicionam secreções salivares, cera e pólen, para elaboração do produto final (PEREIRA et al., 2002; PENA, 2008). Há uma longa história do uso de própolis, pelo menos 300 a.C. A palavra própolis é derivada do grego pró-, para ou em defesa, e polis-, a cidade, o que quer dizer, “em defesa da cidade ou da colmeia” (WAGH, 2013). As abelhas de fato usam esta substância para protegê-las contra insetos e microrganismos, empregando-a no reparo de frestas ou danos à colmeia, no reparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores. Costuma-se encontrar na colmeia pequenos animais ou parte deles em perfeito estado de conservação (GHISALBERTI, 1979; MOREIRA, 1986; MARCUCCI, 1995).

### 3.8.2 Composição

A própolis *in natura* é formada por resinas coletadas pelas abelhas em diversos vegetais, o que acarreta diferentes composições e colorações (MARCUCCI, 1995), conforme a disponibilidade tanto local quanto sazonal, que depois são acrescidas de secreções produzidas pelas abelhas. A própolis é uma complexa mistura constituída por 47% de resina contendo vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como flavonoides, ácidos graxos, alcoóis aromáticos e ésteres, 30% de ceras, 5% de pólen, 4-15% de substâncias voláteis e 13% de substâncias desconhecidas (BURDOCK, 1998; PEREIRA et al., 2002; LONGHINI et al., 2007).

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas a sua composição química, tendo em vista que sua composição química varia com a flora da região e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (no caso brasileiro também o grau de “africanização” da *Apis mellífera* pode influenciar a sua composição). No Brasil são descritas propriedades biológicas e composições químicas distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país. Essa variação é perfeitamente explicada pela biodiversidade brasileira. Uma menor variação da composição química da própolis é observada nas regiões temperadas do planeta, como por exemplo, na Europa, onde seus principais

compostos bioativos são os flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), sendo a crisina (5,7-diidroxiflavona) o primeiro flavonoide isolado em 1927 da própolis cuja fonte vegetal é *Populus nigra* variedade *pyramidalis* (PEREIRA et al., 2002).

A diferença entre os tipos de própolis está vinculada à sua origem botânica e à espécie de abelha que a produziu. A própolis verde do Brasil está associada a planta *Baccharis dracunculifolia*, conhecida também como alecrim-do-campo, não apresenta flavonoides, mas é rica em benzofurano, que possui propriedades de alta atividade citotóxica (PEREIRA et al., 2002; LACERDA et al., 2011).

Mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis, dentre eles: flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B1, B2, B6, C, E e PP; minerais como manganês, cobre, alumínio, cálcio, silício, vanádio, níquel, zinco e cromo (Mn, Cu, Al, Ca, Si, V, Ni, Zn e Cr). Mais recentemente compostos de alta massa molecular e carboidratos (incluindo polissacarídeos) foram relatados (PEREIRA et al., 2002).

A própolis brasileira foi classificada em 13 grupos, sendo aqueles que apresentam melhor atividade antimicrobiana foram os grupos dos respectivos estados: 3 (RS); 6(BA); 12 (MG). Foram identificadas diferenças qualitativas e quantitativas na composição química destes grupos. As própolis do grupo 3, por exemplo, mostraram a presença do éster do ácido dimetil dialil caféico, o qual é um composto alergênico, encontrado principalmente em própolis de clima temperado; a própolis do grupo 6 apresentou as maiores atividades contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (PEREIRA et al., 2002).

A própolis vermelha produzida na região de mangue de Alagoas foi caracterizada por sua composição química e classificada como o 13º grupo, apresentando-se rica em isoflavonóides e alta atividade antimicrobiana (ALENCAR et al, 2007; SILVA et al.,2008). A composição química dos compostos voláteis da própolis vermelha de Pernambuco mostrou-se variada, destacando-se como constituintes majoritários o trans-anetol,  $\alpha$ -copaeno e o metilcis- eugenol, o bioensaio de letalidade em *Artemia salina* sugere uma promissora atividade antitumoral, para esta própolis, devido ao seu conteúdo de compostos fenólicos (NUNES et al.,2009).

### 3.8.3 Propriedades

A própolis sendo um produto natural, de características físicas resinosas e composição variável (MARCUCCI, 1995), coletada de várias espécies vegetais e que sofre adição de secreções da abelha, é classificada como opoterápico. As condições mínimas para o seu registro estão definidas na RDC nº 132/2003 (BRASIL, 2003). O extrato de própolis, solução etanólica da própolis, é regulamentado pelo Ministério da Agricultura como um alimento de origem animal. Pode ser consumido diretamente como alimento ou como ingrediente em uma formulação alimentícia. É dotada de substâncias biologicamente ativas, com várias ações farmacológicas destacando-se as propriedades antioxidantes, anti-inflamatória, antitumoral e antimicrobiana (LONGHINI et al., 2007; LACERDA et al. 2011, SÁ et al. 2013).

De acordo com Krell (1996), uma das mais conhecidas propriedades da própolis e extensivamente testada é a sua atividade bactericida. Vários testes científicos foram efetuados com uma grande variedade de bactérias, fungos, vírus e protozoários. Muitos testes utilizando diferentes extratos e concentrações da própolis demonstraram esta atividade antimicrobiana. Um efeito sinérgico do uso de extrato de própolis com antibióticos foi apresentado por Chernyak (1973). As características bactericidas ou bacteriostáticas da própolis dependem, em geral, da sua concentração no produto aplicado. Às vezes, a própolis é mais efetiva do que drogas comerciais (Millet-Clerc *et al.*, 1987).

De acordo com Banskota *et al.* (2001), a própolis contém principalmente compostos flavonóides e fenólicos, compostos que possuem propriedades antioxidantes. Tem sido sugerido também que a atividade antibacteriana da própolis possa estar associada ao alto conteúdo dessas substâncias (PEREIRA et al., 2002).

O extrato de própolis pode prolongar a vida de prateleira de certos produtos por causa de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes; sendo utilizado no Japão como conservante de peixe congelado (KRELL, 1996). Koc *et al.* (2007)

demonstraram que a própolis teve significativa atividade antimicrobiana contra os fermentos isolados de sucos fermentados.

Tosi et al. (2007) testaram a própolis como conservante alimentício. Os autores testaram quinze amostras de própolis de Santa Fé – Argentina em *Escherichia coli*, não sendo capazes de definir um único valor para concentração mínima inibitória da própolis. Estes valores foram fortemente influenciados pela composição da própolis e pela sua origem botânica. O estudo concluiu que as amostras de extrato de própolis foram capazes de inibir o desenvolvimento da *E. coli*, *in vitro*, com sucesso e, conseqüentemente, podem ser úteis como conservantes naturais de alimentos que apresentam a *E. coli* como contaminante.

Kumazawa et al. (2003) compararam a atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis de várias origens geográficas como, por exemplo, da Argentina, Austrália, Brasil, Bulgária, Chile, China (Hebei, Hubei, e Zhejiang), Hungria, Nova Zelândia, África do Sul, Tailândia, Ucrânia, Uruguai, Estados Unidos e Uzbequistão. Avaliaram a atividade antioxidante pelos métodos do  $\beta$ -caroteno e DPPH. No estudo, determinaram que as amostras da China, Hungria e Nova Zelândia tinham atividades antioxidantes relativamente fortes, correlacionadas com o conteúdo de flavonóides.

Além disso, as propriedades antioxidantes da própolis servem para conservar o alimento e também para combater o envelhecimento causado às pessoas pelos radicais livres. Estudos conduzidos por Bernardi (2010) avaliaram a funcionalidade da própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano e revelaram efeito antioxidante do produto. A prevenção da oxidação lipídica é uma das buscas na indústria cárnea, já que os antioxidantes sintéticos amplamente utilizados como o butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), t-butil-hidroquinona (TBHQ) e o galato de propila, têm sido questionados (ALVES, KUBOTA, 2013). Trata-se de uma dupla funcionalidade, pois conserva o alimento e ao mesmo tempo é um alimento funcional antioxidante, antimicrobiano e que previne infecções.

#### 3.8.4 Toxicidade relacionada à própolis

Por ser um produto natural rico em terpenos, ácido cinâmico, ácido fólico e seus derivados, flavonóides e aminoácidos, a própolis vem sendo incorporada em preparações biocosméticas, creme dental, xarope, enxague bucal e soluções orais. Entretanto seu uso deve ser cauteloso, devido à possibilidade de reações adversas como, por exemplo, reações alérgicas, estomatite, edema labial eczema perioral e dispneia. Outro fator importante a ser considerado é a possível presença de metais pesados em determinados tipos de própolis (LACERDA et al.,2011).

A fração biologicamente mais ativa da própolis, os flavonóides, é conhecida por ser metabolizada sem deixar nenhum resíduo acumulado no corpo (LAPPE, 2004).

Quanto á toxicidade do extrato de própolis, Dobrowolski et al. (1991) administraram aproximadamente 700 mg/Kg oralmente em um grupo de 10 camundongos, cinco machos e cinco fêmeas, e estes foram monitorados por 48 horas. As preparações de própolis foram bem toleradas e não ocorreu nenhuma morte durante o período de observação.

### 3.9 ESPECIARIAS

As especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (ANVISA, 2005).

No que diz respeito à atividade microbiana em alimentos, estes podem servir como substrato para o crescimento microbiano e produção de toxinas e, de acordo com a forma tradicional de uso, as especiarias e ervas adicionada aos alimentos são geralmente em quantidades insuficientes para evitar a deterioração por microrganismos (CEYLAN; FUNG, 2004). Entretanto, os componentes ativos em baixas concentrações podem interagir sinergicamente com outros fatores, como com o cloreto de sódio e os ácidos. A atividade antimicrobiana de especiarias e ervas nos



alimentos pode ser devido a compartimentação dos componentes ativos para a fase lipídica (CEYLAN; FUNG, 2004).

Os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de microrganismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de emprego (SOUZA et al, 2003).

Estudos realizados com óleos essenciais revelaram que as quantidades a serem empregadas variam muito conforme sabor e, além disso, a eficiência relativa muda conforme a composição do produto, bem como a metodologia empregada nos ensaios também geram dificuldades de comparação entre os resultados obtidos. Em geral bactérias gram- positivas são mais sensíveis que as gram- negativas, enquanto as bactérias lácticas são mais resistentes entre as gram- positivas. Fungos parecem ser mais sensíveis que as bactérias gram- negativas (JAY, 2005).

A seguir, na Tabela 4, é apresentada a eficácia de alguns agentes antimicrobianos de derivados de plantas em alimentos.

**Tabela 4.** Eficácia dos agentes antimicrobianos naturais de plantas, quando utilizados em alimentos; (a) bactericida, (b) bacteriostático, (c) pouco ou nenhum efeito.

Agente Antimicrobiano	Concentração	Alimento	Organismo	Efeito
Manjeriçã	1%	Molho, espaguete	<i>Shiguelia ssp.</i>	b,c
Óleo de manjeriçã	1%	Suco de tomate	<i>Lb. Curvatus</i> <i>S. cerevisiae</i>	a
Carvacrol	3%	Cubos de peixe	<i>S. typhimurium</i>	a
Óleo de canela	1%	Queijo gordo	<i>L. monocytogenes</i>	a
Eugenol	2%	Carne cozida	<i>A. hyrophila</i>	a,b
Alho	4%	Linguiça	Microbiota natural	b,c
Orégano	0,05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b
Orégano	1%	Carne	<i>L. monocytogenes</i>	c
Oregano	≤0,1%	Maionese	<i>E. coli</i> 0157:H7	c
Óleo de oregano	0,8% (v/w)	Filé de carne	<i>S. Typhimurium</i>	a
Salvia	≤2,5% (w/w)	Comida de bebê	<i>S. Typhimurium</i> <i>S. aureus</i> <i>B.cereus</i>	b b b
Tomilho	0.05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b
Tomilho	1%	Espaguete com Salsicha	<i>Shiguelia ssp.</i>	b, c
Wasabi	60 mg mL <sup>-1</sup>	Atum	V. <i>parahaemolyicus</i>	a

Fonte: Holey; Patel, 2005.

No Brasil, óleos essenciais e extratos estão compreendidos dentro da classe de aditivos como aromatizantes naturais. No entanto, excluem-se do regulamento da

ANVISA, as matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não são utilizadas exclusivamente como fonte de aromas (ANVISA, 2007).

### 3.10 VIDA DE PRATELEIRA

Num país como o Brasil de dimensão muito ampla e com grandes concentrações urbanas, muitas vezes os pontos de produção dos alimentos situam-se muito distantes dos pontos de consumo, exigindo um cuidado muito especial na conservação destes alimentos, tanto ao natural como na forma processada. O processo de urbanização crescente, aliado ao também crescente ingresso da mulher no mercado de trabalho, tem exigido criatividade à indústria na produção de alimentos processados de boa qualidade, seguros, de bom valor nutritivo e de fácil preparação para consumo. Esta tarefa exige continuadas pesquisas e preparação de pessoal para um perfeito domínio dos mecanismos de deterioração dos alimentos, possibilitando com isso um maior controle destas reações e um prolongamento da vida de prateleira dos alimentos. A vida de prateleira pode ser definida como o tempo que se passa desde a produção e embalagem até o ponto em que ele se torna inaceitável para o consumo. É relacionado, então, com a qualidade total do alimento e diretamente ligado ao planejamento da produção, às especificações dos ingredientes, ao processo de manipulação e à estocagem. A vida de prateleira depende do alimento e é essencial que os produtores identifiquem os parâmetros intrínsecos e extrínsecos que limitam esse período (BATTISTELLA, 2008).

A maioria dos alimentos por provir de material biológico de origem vegetal ou animal está sujeita a diferentes processos de deterioração, sendo os mais emergentes, aqueles de origem microbiana. Contudo, mesmo com a prevenção adequada a esse tipo de deterioração, o alimento estará sujeito durante o seu ciclo de vida de prateleira a uma série de outras reações, cuja velocidade, variará em função de muitos fatores, tais como: temperatura, umidade, acidez, teor de oxigênio, embalagem e outros. Devido à complexidade dos alimentos, a previsão da sua vida de prateleira não é uma tarefa fácil e de resultado preciso. Contudo, é sempre muito

importante ter o máximo de informações sobre o alimento a conservar, pois isto, aliado a um bom conhecimento do mecanismo ou da cinética das reações de deterioração irá possibilitar uma estimativa da sua vida de prateleira, além do mais orientará quanto às condições de conservação mais adequadas, àquele tipo particular de alimento (BATTISTELLA, 2008).

Atualmente, o método mais utilizado para a determinação da vida de prateleira, é o monitoramento direto. Essa maneira requer baterias de amostras que devem ser tomadas e cada etapa do desenvolvimento do produto. Normalmente, as amostras são estocadas sob condições controladas até sua qualidade se tornar inaceitáveis. Os atributos testados são sensoriais, microbiológicos e físico-químicos (BATTISTELLA,2008).

#### **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi realizado por uma demanda da Empresa Novo Mel Biotecnologia e Análises Laboratoriais Ltda, fundada em 2008 e vinculada com a Empresa Novo Mel Indústria e Comércio Exterior Ltda, fundada em 1995. A Empresa Novomel investe na qualificação de mel e própolis de diversas regiões do Brasil, visando a tipificação dos principais marcadores de qualidade, em associação com a Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN), atual Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN). Além disso, tem investido no desenvolvimento de novas aplicações farmacêuticas e na indústria de alimentos, do mel e própolis tipificado. Em demandas anteriores realizamos ensaios quantitativo e qualitativo de diversas amostras de mel e própolis brasileira, devidamente tipificada em seus principais marcadores, quanto às atividades inibitórias, bactericidas e fungicidas, frente aos principais patógenos humanos. Estes estudos, protegidos por termos de sigilo e confidencialidade, foram a base do desenvolvimento de quatro formulações (EEP1, EEP2, PCO e PC) que foram utilizadas para ensaios *in vitro* de conservação de a contaminação alimentar em duas temperaturas (8°C e 30°C) durante 84 dias. Os resultados foram promissores e estão apresentados nesta dissertação. Algumas indústrias de panificação e de alimentos lácteos se interessaram pelo

desenvolvimento de produtos totalmente naturais, pela substituição dos conservantes químicos hoje utilizados. O mercado brasileiro e mundial apresenta atualmente um apelo muito forte neste tipo de produto, e assim, foi solicitado que fizéssemos mais ensaios comparativos da atividade de duas formulações derivadas de nossos resultados, visando a avaliação do custo da matéria prima, quantidade de produção e características organolépticas adequadas. A própolis apresenta cor e odor característico, que pode interferir na qualidade sensorial do produto acabado. Além disto, óleos essenciais de especiarias foram incluídos nas formulações, para potencializar os efeitos da formulação e diminuir a quantidade de própolis, que poderia ser um fator importante no custo de todo o produto. A matéria prima não poderia ser muito mais custosa do que os conservantes químicos já existentes no mercado. No caso de uma demanda industrial, a produção de própolis e mel com a tipificação adequada e utilizada na formulação deveria ser capaz de sustentar a produção em larga escala. Própolis com características químicas de maior atividade, mas com difícil produção e, portanto de maior custo, ou mesmo de regiões brasileiras distantes do sudeste poderiam inviabilizar o desenvolvimento do novo produto.

Após algumas reuniões a Equipe de desenvolvimento do produto conservante natural à base de mel, própolis e especiarias definiu duas formulações (MP e MPC), mantidas em sigilo, mas que apresentam uma combinação adequada de custo, produção e com potencialidades inibitórias para bactérias e fungos, baseados nos resultados dos componentes isolados obtidos anteriormente.

Para eliminar as características de odor característico das formulações, após preparadas, foram submetidas em tratamentos físicos - químicos em Laboratório de Engenharia de Alimentos da USP. Após este tratamento estas duas formulações foram avaliadas nos ensaios de conservação de alimentos *in vitro*, nas temperaturas de 8°C e 30°C, acompanhados até 70 dias. Estes ensaios foram realizados na presença e na ausência de contaminantes ambientais, visando determinar a importância de Boas Práticas de Fabricação e o impacto dos conservantes naturais. Paralelamente à este estudo, as indústrias interessadas utilizaram as formulações em produtos já existentes, na substituição de conservantes naturais e visando a avaliação de lotes quanto às características organolépticas e sensoriais dos

produtos. Estes resultados não estão apresentados, sendo considerado como segredo industrial de cada empresa.

#### 4.1 FORMULAÇÕES

Com base em resultados obtidos em estudos anteriores, parte do convênio entre a Empresa Novo Mel Biotecnologia e a UNIBAN, com a finalidade de desenvolver produtos a base de mel e própolis para uso odontológico, farmacêutico e de alimentos, diversas amostras de própolis e mel foram tipificadas quanto aos seus constituintes químicos e analisadas quanto à atividade inibitória, bactericida e fungicida frente à diversos patógenos humanos. Estes resultados foram correlacionados com os obtidos pela tipificação, determinando-se os constituintes químicos essenciais para o desenvolvimento de produtos antimicrobianos, além de determinar a origem geográfica dos insumos, referente a origem botânica regional.

Destes estudos a Empresa Novo Mel primeiramente formulou 4 misturas (EEP1, EEP2, PCO e PC) contendo como ingredientes principais própolis, mel e especiarias. Estas formulações estão protegidas por sigilo. Estas formulações foram avaliadas em ensaio *in vitro* de conservação em duas temperaturas e 70 dias, manipulados em assepsia ou submetidos por 2 horas em ambiente contaminado por fungos filamentosos. Estes ensaios foram realizados em duplicata.

O resultado obtido foi promissor, especialmente se comparado com as substâncias químicas utilizadas no momento, e Indústrias alimentícias se interessaram pelo produto. Estas indústrias solicitaram novos ensaios, com duas formulações (MP e MPC) que, além dos constituintes principais das formulações anteriores, foram submetidas à tratamentos físico-químicos para a retirada das características sensoriais, que poderiam interferir no produto acabado. Estas formulações foram submetidas aos mesmos ensaios de conservação.

## 4.2 ENSAIOS DE CONSERVAÇÃO - TEMPO DE PRATELEIRA

Este projeto foi executado de forma a comparar as atividades antifúngicas das formulações frente aos conservantes químicos propionato de cálcio e sorbato de potássio, em duas etapas. Os resultados foram avaliados num período de 8 meses, onde cada etapa foi realizada num período não superior a 4 meses.

No primeiro ensaio as formulações EEP1, EEP2, PCO e PC foram adicionadas à placas de Petri (90 x 15 mm) com meio de cultivo Agar Saboraud Dextrose (Himedia), próprio para fungos, seguindo instruções de preparo do fabricante e expressas na embalagem; pH final 5,6 +/- 0.2; em condições estéreis de manipulação, em 5 concentrações para cada fórmula (0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2% e 0,4%). Outro lote foi preparado e submetido à contaminação com os fungos *Aspergillus ssp*, *Rhizopus nigricans* e *Candida albicans*. As placas foram incubadas em duas temperaturas, 8°C e 30°C, sendo avaliados a cada sete dias, pelo período de 70 dias até que fossem observado crescimento de fungos. As formulações foram comparadas a dois tradicionais conservantes: o propionato de cálcio a 0,1% e o sorbato de potássio a 0,025%. O tempo entre a preparação das placas e o surgimento de fungos foi anotado como tempo de conservação do meio de cultivo. Os resultados apresentados são os concordantes para duas repetições.

Os resultados foram apresentados para indústrias de alimentos, de panificação e de derivados lácteos, que motivaram os executivos à pensarem no desenvolvimento de produtos totalmente naturais, inclusive quanto aos conservantes, para ocupar uma necessidade de mercado.

As formulações MP e MPC foram produzidas com esta finalidade, e submetidas aos ensaios nas mesmas condições anteriores, mas nas concentrações 0,006%; 0,012%; 0,025%; 0,05%; 0,1%; 0,2% e 0,4%.

## 5 RESULTADO

As quatro formulações produzidas pela Empresa Novo Mel Biotecnologia, contendo própolis tipificada, mel e especiarias, foram avaliadas quanto ao potencial de inibir o crescimento de fungos em meio de cultura, sendo avaliadas em 2 temperaturas diferentes e no período de 70 dias. Os resultados do ensaio realizado à 30°C estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 1.

Os números representam o tempo em dias até o aparecimento de indício de contaminação microbiana.

**Tabela 5.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>EEP 1</b>	7	7	7	7	14
<b>EEP 2</b>	7	7	7	14	14
<b>PCO</b>	7	7	7	14	28
<b>PC</b>	14	14	21	28	28
<b>Sorbato de potássio</b>	14				
<b>Propionato de cálcio</b>			14		

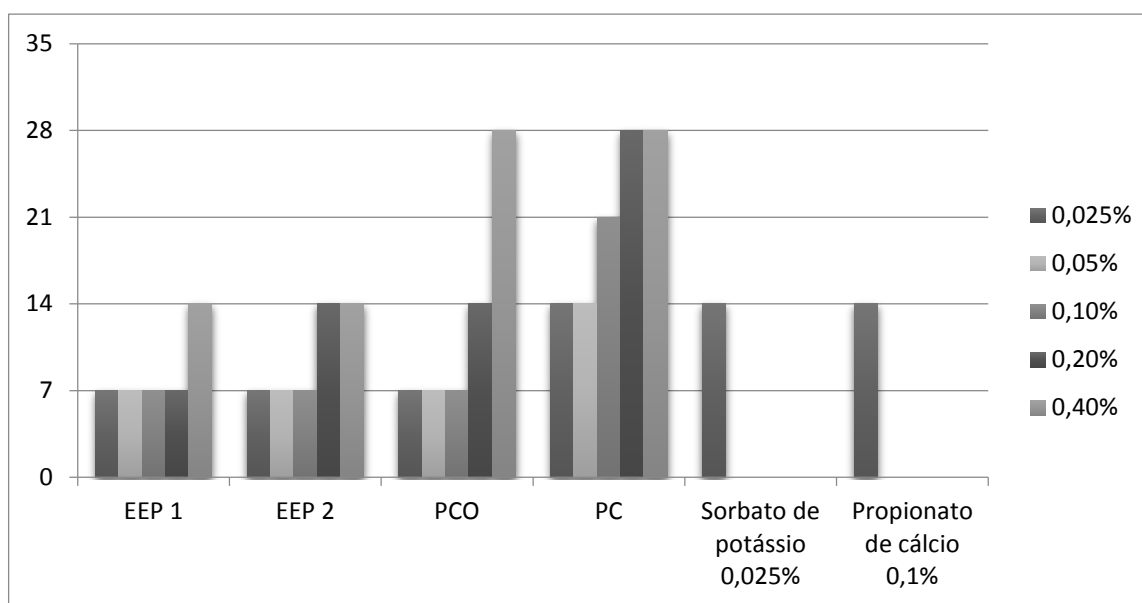


Gráfico 1. Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, em 5 diluições (V/V). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

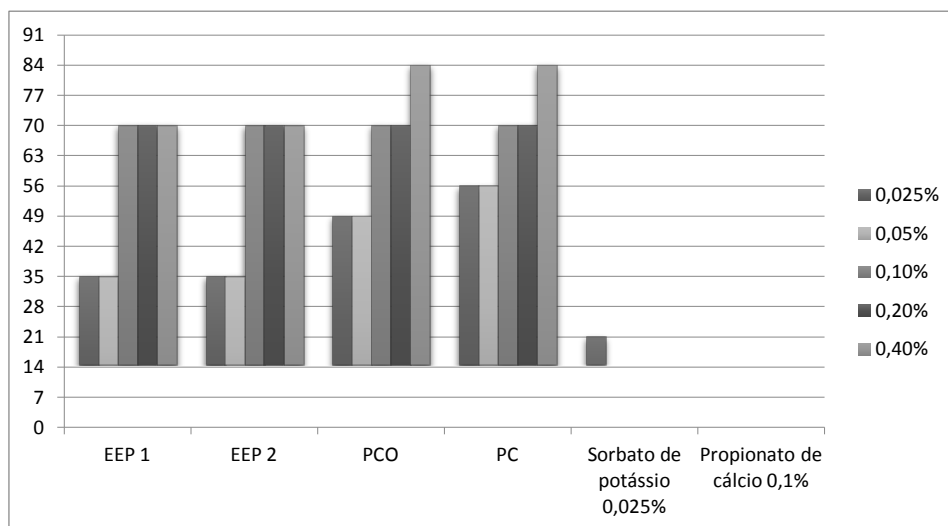


Os conservantes químicos sorbato de potássio e propionato de cálcio conservaram o meio de cultura por menos de 14 dias à 30°C. Este mesmo resultado foi obtido por todas as formulações, nas concentrações de 0,025% (PC, 0,2% (EEP2 e PCO) e 0,4% (EEP1). A amostra PC foi a que mostrou melhor resultado, por apresentar uma concentração semelhante ao Sorbato de potássio, muito utilizado para conservar produtos de panificação.

A Tabela 6 e Figura 2 apresenta o mesmo ensaio para a temperatura de 8°C.

**Tabela 6.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 8°C, em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>EEP 1</b>	35	35	70	70	70
<b>EEP 2</b>	35	35	70	70	70
<b>PCO</b>	49	49	70	70	84
<b>PC</b>	56	56	70	70	84
<b>Sorbato de potássio</b>	21				
<b>Propionato de cálcio</b>			35		



**Gráfico 2.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 8°C, em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

O sorbato de potássio conservou o meio de cultura por um período menor que 21 dias nesta temperatura, e o propionato de cálcio conservou pelo período menor que 35 dias. As formulações EEP1 e EEP2 conservaram pelo mesmo período menor que 35 dias na concentração de 0,025%, a menor utilizada. Nesta mesma concentração as formulações PCO e PC conservaram por perto de 49 e 56 dias, respectivamente. Na mesma concentração utilizada de propionato de cálcio, conservante utilizado em produtos lácteos, todas as formulações conservaram pelo período próximo a 70 dias, ou seja, o dobro do conservante químico de referência.

A Tabela 7 e Figura 3 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de conservação acelerado pela contaminação por fungos e leveduras *in vitro* na temperatura de 30°C em meios de cultura para as quatro formulações e conservantes químicos de referência.

**Tabela 7.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, acelerado com semeadura de fungos e leveduras, em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
EEP 1	7	7	7	7	7
EEP 2	7	7	7	7	7
PCO	7	7	7	7	7
PC	7	7	7	7	7
Sorbato de potássio	7				
Propionato de cálcio			7		

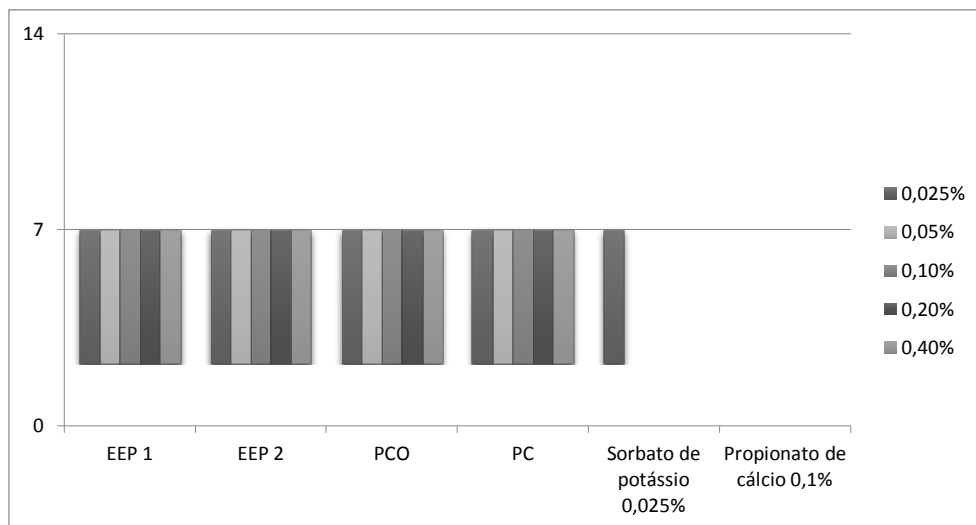


Gráfico 3. Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, acelerado com sementeira de fungos e leveduras, em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

Nestes ensaios os resultados obtidos mostraram que todas as formulações e conservantes de referência não impediram o desenvolvimento de fungos pelo período mínimo de sete dias, independentemente da concentração utilizada até 0,4%.

A Tabela 8 e Figura 4 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de conservação acelerado pela contaminação por fungos e leveduras *in vitro* na temperatura de 8°C em meios de cultura para as quatro formulações e conservantes químicos de referência.

**Tabela 8.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 8°C (acelerado com sementeira de fungos e leveduras), em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>EEP 1</b>	14	14	14	14	14
<b>EEP 2</b>	14	14	14	14	21
<b>PCO</b>	14	28	28	28	56
<b>PC</b>	14	21	28	28	56
<b>Sorbato de potássio</b>	14				
<b>Propionato de cálcio</b>			14		

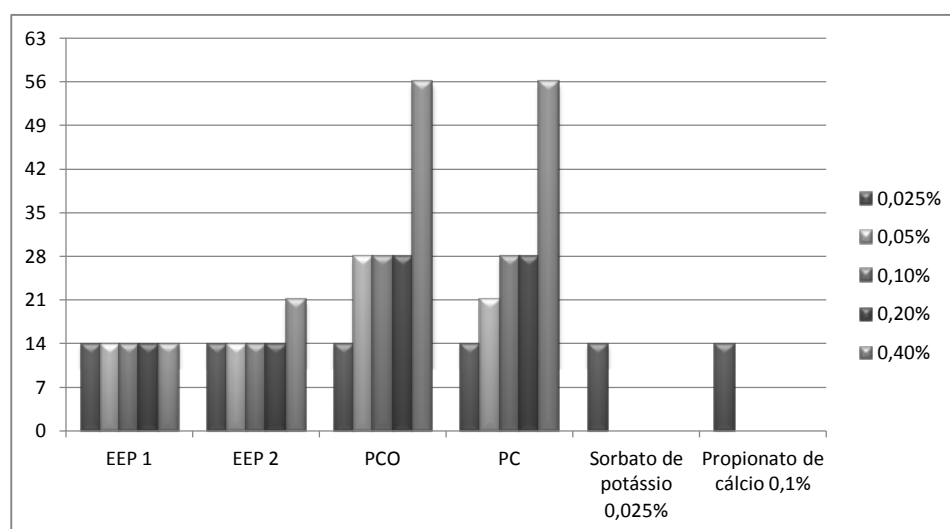


Gráfico 4. Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 8°C (acelerado com semeadura de fungos e leveduras), em 5 concentrações (m/v). Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

Neste ensaio acelerado; os conservantes químicos de referência preservaram o meio de cultura por menos que 14 dias. As formulações PC e PCO conservaram pelo mesmo tempo na concentração de 0,025%. Na concentração utilizada para propionato de cálcio esta amostra preservou por menos que 28 dias, o dobro do tempo, mesmo tendo sido exposta aos fungos filamentosos e leveduras que normalmente deterioram os alimentos.

Os resultados obtidos foram apresentados para indústrias de panificação e alimentos lácteos, que mostraram interesse, e solicitaram novos ensaios com duas formulações que apresentaram os melhores resultados obtidos, mas tratadas por métodos físico-químicos para a diminuição de características sensoriais que pudessem interferir no sabor e odor dos produtos. As formulações MP e MPC apresentam estas características e foram submetidas aos mesmos ensaios, mas em concentrações de 0,006% a 0,4%.

**Tabela 9.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

FORMULAÇÃO/ CONCENTRAÇÃO	0,006%	0,012%	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>MP</b>	7	7	7	7	7	7	14
<b>MPC</b>	7	7	14	14	28	28	28
<b>Sorbato de potássio</b>			14				
<b>Propionato de cálcio</b>					14		

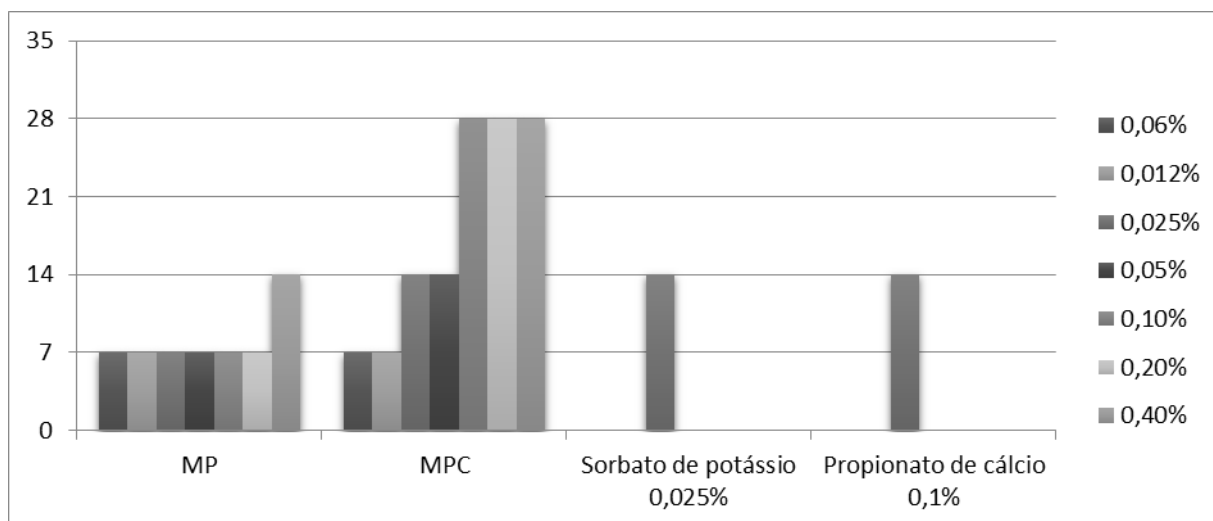


Gráfico 5- Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

Os resultados deste ensaio na temperatura de 30°C mostrou que a formulação MPC apresentou o mesmo potencial de preservação, na mesma concentração de 0,025%, que o sorbato de potássio, muito utilizado na indústria de panificação, mesmo após os tratamentos físico-químicos. A formulação MP apresentou preservação perto de 14 dias apenas na concentração de 0,4%.

A Tabela 10 e a Figura 6 apresentam os resultados obtidos nos ensaios de conservação de alimentos *in vitro* para as formulações MP e MPC, comparadas aos conservantes químicos de referência, na temperatura de 8°C.

**Tabela 10.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaios a 8°C. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada 7 dias.

FORMULAÇÃO / CONCENTRAÇÃO	0,006%	0,012%	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>MP</b>	14	14	21	21	63	70	63
<b>MPC</b>	14	28	35	42	56	70	70
<b>Sorbato de potássio</b>			14				
<b>Propionato de cálcio</b>					28		

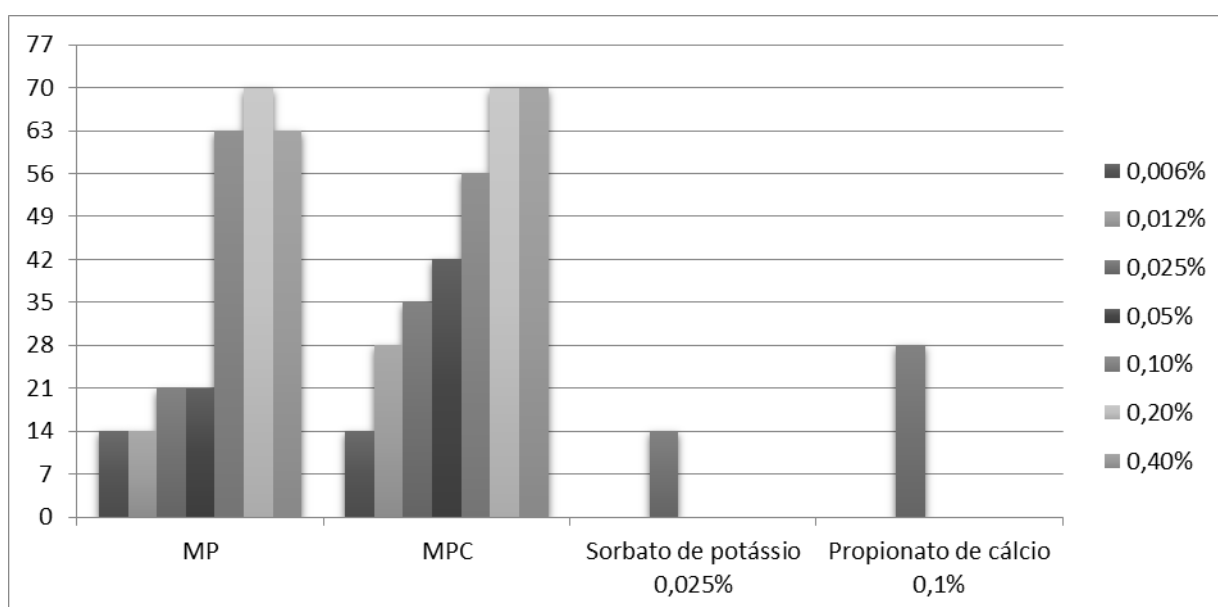


Gráfico 6- Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaios a 8°C. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

A formulação MPC apresentou tempo de preservação menor que 28 dias, semelhante ao conservante químico de referência propionato de cálcio (0,1%), mas na concentração de 0,012%. Na concentração usualmente utilizada pelo propionato de cálcio a formulação MPC preservou o meio de cultura por quase 56 dias, e a formulação MP preservou perto de 63 dias.

As formulações foram avaliadas nas mesmas condições de duas temperaturas, mas com contaminação proposital por fungos filamentosos e leveduras. Os resultados estão mostrados na Tabela 11 e Figura 7, para 30°C, e Tabela 12 e Figura 8, para 8°C.

**Tabela 11.** Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, acelerado com semeadura de fungos e leveduras. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

FORMULAÇÃO/CONCENTRAÇÃO	0,006%	0,012%	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>MP</b>	7	7	7	7	7	7	7
<b>MPC</b>	7	7	7	7	7	7	7
<b>Sorbato de potássio</b>			7				
<b>Propionato de cálcio</b>					7		

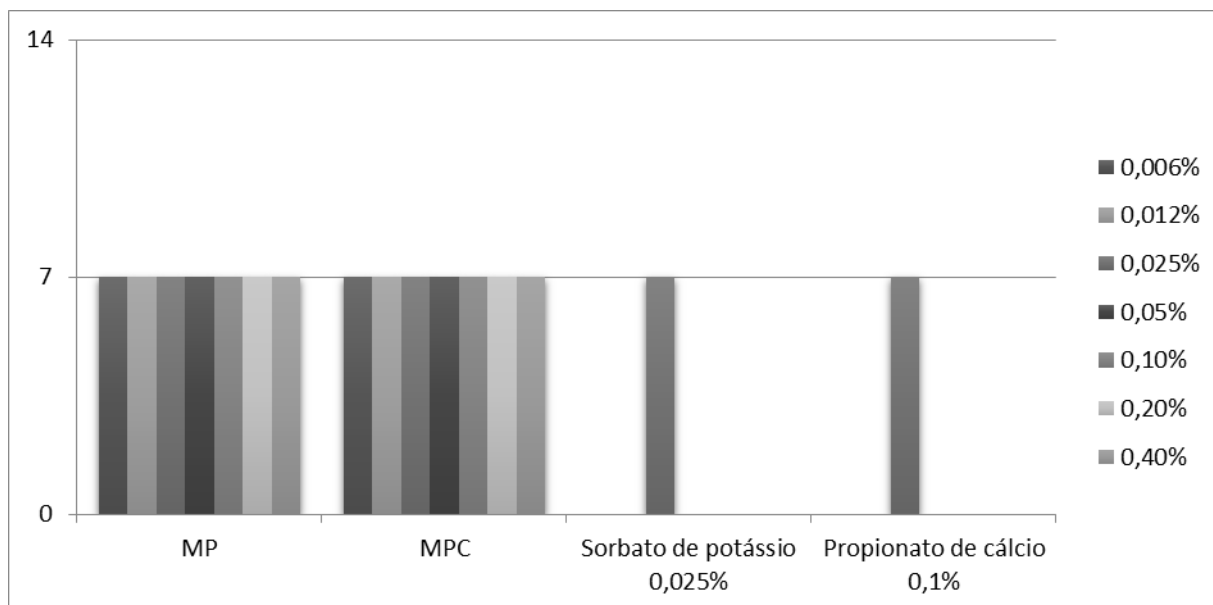


Gráfico 7- Formulações para avaliação *in vitro* de conservação alimentar com ensaio a 30°C, acelerado com semeadura de fungos e leveduras. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

Os resultados encontrados mostram que na temperatura de 30°C todas as formulações, em qualquer das concentrações avaliadas não foram capazes de impedir o crescimento de fungos por pelo menos uma semana, inclusive os conservantes químicos de referência.

**Tabela 12.** Formulações para avaliação de conservação alimentar com ensaios *in vitro* a 8°C, acelerado com semeadura de fungos e leveduras. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

FORMULAÇÃO/CONCENTRAÇÃO	0,006%	0,012%	0,025%	0,05%	0,1%	0,2%	0,4%
<b>MP</b>	7	7	7	7	7	7	7
<b>MPC</b>	7	7	7	7	7	7	28
<b>Sorbato de potássio</b>			7				
<b>Propionato de cálcio</b>					7		



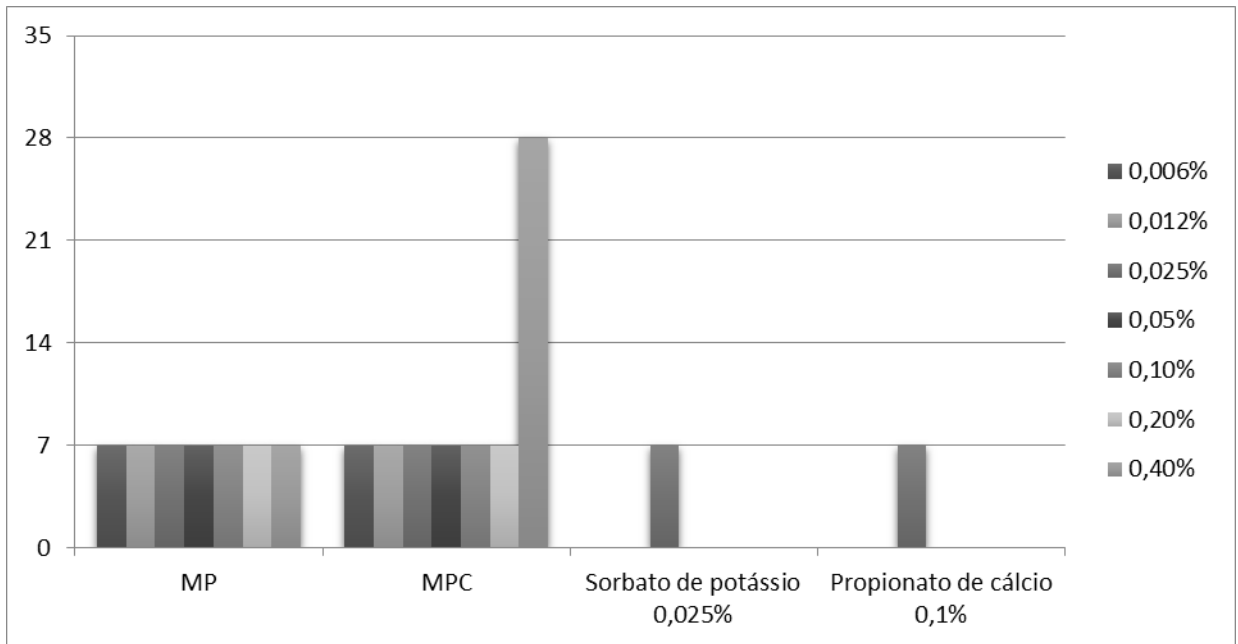


Gráfico 8- Formulações para avaliação de conservação alimentar com ensaios *in vitro* a 8°C, acelerado com semeadura de fungos e leveduras. Resultado do aparecimento de contaminantes em dias após o início dos ensaios, sendo as análises feitas a cada sete dias.

Os resultados encontrados mostram que na temperatura de 8°C apenas a formulação MPC foi capaz de impedir o crescimento de fungos por quase 28 dias, na concentração de 0,4%. Os conservantes químicos de referência não impediram o aparecimento de contaminantes mesmo em uma semana.

## 6 Discussão

Este estudo foi realizado por uma demanda da Empresa Novo Mel Biotecnologia e Análises Laboratoriais Ltda, criada em 2008 e vinculada com a Empresa Novo Mel Indústria e Comércio Exterior Ltda, fundada em 1995. A Empresa Novo Mel Biotecnologia investe na qualificação de mel e própolis de diversas regiões do Brasil, visando a tipificação dos principais marcadores de qualidade, em associação com a Universidade Bandeirante de São Paulo (UNIBAN), atual Universidade Anhanguera de São Paulo (UNIAN). Além disso, tem investido no desenvolvimento de novas aplicações para as indústrias farmacêuticas e de alimentos, para o mel e própolis tipificados. Em demandas anteriores foram realizados ensaios quantitativo e qualitativo de diversas amostras de mel e própolis brasileira, devidamente tipificada em seus principais marcadores, quanto às atividades inibitórias, bactericidas e fungicidas, frente aos principais patógenos humanos.

O desenvolvimento de aplicações industriais para os produtos apícolas requer tecnologia e controle de qualidade apurados para atender os rigorosos padrões técnicos exigidos. O conhecimento gerado cada novo desenvolvimento pode ser aproveitado nos projetos seguintes, podendo, inclusive ser utilizado nos produtos já desenvolvidos e até nos produtos de usos comerciais. Portanto, cada inovação gerada trará resultados também em outros campos da empresa.

Atualmente, o extrato de própolis é produzido e amplamente consumido em farmácias e lojas de produtos naturais. O produto ofertado segue o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Ministério da Agricultura, mas não possui nenhuma padronização química para a sua aplicação industrial.

O desenvolvimento de aplicações alimentícias para o extrato de própolis foi inicialmente escolhido porque estas aplicações podem mais rapidamente ser introduzidas no mercado. O extrato de própolis já pode ser comercializado como ingrediente para alimentos, faltando otimizá-lo e testá-lo devidamente para esta aplicação. Porém, aplicações cosméticas, farmacêuticas e veterinárias para o extrato

de própolis já se encontram em estudo. Todas estas aplicações beneficiar-se-ão do trabalho a ser desenvolvido na área alimentícia. O estudo de amostras de diversas origens e as suas respectivas caracterizações servirá para a criação de um banco de dados de fornecedores útil para todos os trabalhos posteriores pela Empresa.

A empresa Novo Mel fez um trabalho em conjunto com a Unesp e a UNIBAN para avaliação da capacidade antioxidante da própolis; análise de toxicidade em *Artemia salina*, atividade antimicrobiana da própolis para diversas bactérias, como *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Veilonella parvula*, *Actinomyces israelii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Haemophilus actinomycetecomitans*, além de fungos como *Aspergillus spp*, *Rhizopus spp* *Candida albicans* e *Penicillum spp*.

Os projetos desenvolvidos geraram pedidos de patente sobre tipificação da própolis, composições medicamentosas e formulações odontológicas e antibióticas à base de própolis.

Projetos desenvolvidos anteriormente, e que foram utilizados para se determinar as constituições das formulações utilizadas neste estudo, visaram determinar a atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante, *in vitro* e aplicada na indústria alimentícia de produtos de panificação e lácteos, do extrato etanólico de própolis tipificado, em associações com óleos essenciais de coentro, cravo, canela, mostarda e tomilho.

De acordo com Krell (1996), uma das mais conhecidas propriedades da própolis e extensivamente testada é a sua atividade bactericida. Vários testes científicos foram efetuados com uma grande variedade de bactérias, fungos, vírus e outros micro-organismos. Muitos testes utilizando diferentes extratos e concentrações da própolis demonstraram esta atividade antimicrobiana. Um efeito sinérgico do uso de extrato de própolis com antibióticos foi apresentado por Chernyak (1973). As características bactericidas ou bacteriostáticas da própolis dependem, em geral, da sua concentração no produto aplicado. Às vezes, a própolis é mais efetiva do que drogas comerciais (Millet-Clerc *et al.*, 1987). De acordo com Banskota *et al.* (2001), a própolis contém principalmente compostos flavonóides e fenólicos, compostos que possuem propriedades antioxidantes.

O extrato de própolis, solução etanólica da própolis, é regulamentado pelo Ministério da Agricultura como um alimento de origem animal. Pode ser consumido diretamente como alimento ou como ingrediente em uma formulação alimentícia. Suas atividades como bactericida e, conseqüentemente, como conservante já foram bastante estudadas.

De acordo com Krell (1996), o extrato de própolis pode prolongar a vida de prateleira de certos produtos por causa de suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. De acordo com o autor, o produto é utilizado no Japão como conservante de peixe congelado. Já Koc *et al.* (2007) demonstraram que a própolis teve significativa atividade antimicrobiana contra os fermentos isolados de sucos fermentados.

Tosi *et al.* testaram a própolis como conservante alimentício. Os autores testaram quinze amostras de própolis de Santa Fé – Argentina em *Escherichia coli*, não sendo capazes de definir um valor único para a concentração mínima inibitória da própolis. Estes valores foram fortemente influenciados pela composição da própolis e pela sua origem botânica. O estudo concluiu que as amostras de extrato de própolis foram capazes de inibir o desenvolvimento da *E. coli*, *in vitro*, com sucesso e, conseqüentemente, podem ser úteis como conservantes naturais de alimentos que apresentam *E.coli* como contaminante. No campo científico, já existem estudos a respeito das atividades biológicas da própolis relacionadas às suas características químicas e à sua origem geográfica. Direcionar estes estudos para o desenvolvimento comercial de produtos será uma grande inovação que possibilitará a exploração mercadológica da riquíssima flora brasileira, expressa nos diferentes tipos de própolis existentes, de modo a potencializar as propriedades conhecidas da própolis para a aplicação como produto conservante para a indústria alimentícia.

No presente caso, foi utilizada a tipificação de própolis brasileira, conforme informações contidas no pedido de patente de Marcucci (2000).

A ação da própolis tipificada como conservante de alimentos ainda não foi utilizada em aplicações industriais de grande volume no Brasil e nem em outros países. O desenvolvimento de conservantes alimentícios à base de extrato de própolis permitirá oferecer às indústrias um produto inovador que atenda às

necessidades de vida de prateleira, proveniente de matéria-prima natural, podendo ser certificado como produto orgânico.

Nielsen e Rios (2000) investigaram a inibição de crescimento de *Penicillium commune*, *P. roqueforti*, *Aspergillus flavus* e *Endomyces fibuliger* em pães com óleos essenciais. Verificaram que os óleos de cravo, canela e principalmente mostarda demonstraram boa inibição do crescimento dos micro-organismos.

Lopez *et al.* (2005) testaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de canela, cravo, mangericão, alecrim, endro e gengibre contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Penicillium islandicum* e *Aspergillus flavus*. Utilizaram dois tipos de testes de contato (sólido e difusão de vapor). Os óleos de cravo e canela tiveram os melhores resultados.

Suhr e Nielsen (2003) utilizaram dois métodos para testar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de pimenta síria, folha de canela, cidreira, cravo, mostarda, laranja, sálvia e tomilho contra fungos. O óleo essencial de tomilho foi o mais efetivo no primeiro método, seguido do cravo e da canela.

Valero e Salmero (2003) determinaram a atividade antibacteriana de 11 óleos essenciais contra *Bacillus cereus*. A adição de 5 µg/100 mL de óleo essencial de canela associada a refrigeração abaixo de 8° C possibilitou a inibição do crescimento do micro-organismo por pelo menos 60 dias.

Delaquis *et al.* (2002) verificaram que o óleo essencial de coentro foi particularmente efetivo contra *Listeria monocytogenes*.

Pawar e Thaker (2006) investigaram a atividade antimicrobiana de 75 óleos essenciais contra *Aspergillus niger*. O desempenho do óleo essencial de canela ficou entre os cinco melhores.

A preservação de pães da deterioração por mofo já foi objetivo de vários estudos e as espécies de diversos gêneros foram implicadas. No entanto, as mais comuns são as causadas por *Penicillium* spp., apesar de *Aspergillus* spp. ser a causa de maior significância em países tropicais (Legan, 1993).

Galan (2009) verificou que o extrato de própolis em concentrações entre 0,1% e 0,5% apresentou uma inibição de 25% e 19% no crescimento radial das espécies

*Aspergillus* sp e *Penicillium* sp. Como fator de segurança, as concentrações de extrato de própolis serão alteradas para 1% e 2%.

Estudos anteriores obtidos por nosso grupo, e não publicados por termos de sigilo e confidencialidade, avaliaram diversas própolis e mel de regiões brasileiras, sendo tipificadas quanto aos constituintes químicos e avaliadas quantitativamente quanto à atividade bactericida e fungicida.

Estes estudos foram a base do desenvolvimento de quatro formulações (EEP1, EEP2, PCO e PC) que foram utilizadas para ensaios *in vitro* de conservação de a contaminação alimentar em duas temperaturas (8°C e 30°C) durante 84 dias. Os resultados foram promissores e estão apresentados nesta dissertação.

Nos ensaios de conservação alimentar *in vitro* à 30°C, temperatura de tempo de prateleira de produtos de panificação, o Sorbato de potássio preservou o meio de cultura por menos de 14 dias na concentração de 0,025%. A formulação PC apresentou o mesmo tempo de preservação na mesma concentração, e 7 dias a mais se comparado com o Propionato de cálcio à 0,1%. Nos ensaios acelerados pela contaminação forçada por fungos filamentosos todas as formulações e agentes químicos de referência não foram capazes de preservar o meio de cultura pelo tempo mínimo de 7 dias, enfatizando a necessidade de Boas Práticas de Fabricação e Manipulação de alimentos.

Nos ensaios de conservação alimentar *in vitro* à 8°C, temperatura de tempo de prateleira para produtos lácteos, o Propionato de cálcio preservou o meio de cultura por menos que 35 dias, tempo bom para este produto. Todas as formulações avaliadas, na mesma concentração de 0,1% do conservante químico de referência preservaram no dobro do tempo (perto de 70 dias). As formulações PC e PCO preservaram por 56 dias e 49 dias, respectivamente, mesmo na concentração menor avaliada (0,025%). Nesta mesma concentração o sorbato de potássio preservou por menos que 21 dias. Mesmo no ensaio acelerado pela contaminação orientada por fungos filamentosos as formulações PC e PCO preservaram o meio de cultura pelo dobro do tempo do propionato de cálcio, na concentração de 0,1%.

Algumas indústrias de panificação e de alimentos lácteos contatadas pela empresa Novo Mel se interessaram pelo desenvolvimento de produtos totalmente

naturais, pela substituição dos conservantes químicos hoje utilizados, ao terem acesso à estes resultados, embora preliminares.

O mercado brasileiro e mundial apresenta atualmente um apelo muito forte neste tipo de produto, e assim, foi solicitado que fizéssemos mais ensaios comparativos da atividade de duas formulações derivadas destes resultados, visando a avaliação do custo da matéria prima, quantidade de produção e características organolépticas adequadas.

A própolis apresenta cor e odor característico, que pode interferir na qualidade sensorial do produto acabado. Além disto, óleos essenciais de especiarias foram incluídos nas formulações, para potencializar os efeitos da formulação e diminuir a quantidade de própolis, que poderia ser um fator importante no custo de todo o produto. A matéria prima não poderia ser muito mais custosa do que os conservantes químicos já existentes no mercado.

Algumas formulações apresentaram própolis tipificada de custo mais elevado, e de pouca produção em números totais no mercado brasileiro. No caso de uma demanda industrial, a produção de própolis e mel com a tipificação adequada e utilizada na formulação deveria ser capaz de sustentar a produção em larga escala. Própolis com características químicas de maior atividade, mas com difícil produção e, portanto de maior custo, ou mesmo de regiões brasileiras distantes do sudeste poderiam inviabilizar o desenvolvimento do novo produto.

Após algumas reuniões a Equipe de desenvolvimento do produto conservante natural à base de mel, própolis e especiarias definiu duas formulações (MP e MPC), mantidas em sigilo, mas que apresentam uma combinação adequada de custo, produção e com potencialidades inibitórias para bactérias e fungos, baseados nos resultados dos componentes isolados obtidos anteriormente.

Para eliminar as características de odor característico das formulações, após preparadas, foram submetidas em tratamentos físicos - químicos em Laboratório de Engenharia de Alimentos da USP. Os tratamentos utilizados estão protegido por segredo industrial relacionado com o desenvolvimento deste produto.

Após este tratamento estas duas formulações (MP e MPC) foram avaliadas nos ensaios de conservação de alimentos *in vitro*, nas temperaturas de 8°C e 30°C, acompanhados até 70 dias. Estes ensaios foram realizados na presença e na

ausência de contaminantes ambientais, visando determinar a importância de Boas Práticas de Fabricação e o impacto dos conservantes naturais.

Os resultados obtidos mostraram que a formulação MPC teve a mesma eficiência de preservação do Sorbato de potássio na temperatura de 30°C, ou seja, perto de 14 dias na concentração de 0,025%. A comparação desta formulação com o conservante Propionato de cálcio à 0,1%, entretanto, mostrou ser a formulação MPC duas vezes melhor. Nos ensaios acelerados nesta temperatura todas as formulações e conservantes químicos de referência continuaram sendo incapazes de preservar o meio de cultura pelo tempo mínimo de 7 dias, reenfazendo a necessidade de Boas Práticas de Fabricação para a Indústria de panificação, principalmente, por manter os produtos na vida de prateleira nesta temperatura.

Os ensaios realizados na temperatura de 8°C, entretanto, mostraram um resultado muito melhor das formulações MP e MPC, frente aos conservantes químicos de referência. Na concentração utilizada para sorbato de potássio as formulações apresentaram a mesma eficiência de preservação na metade da concentração (MP), ou mesmo usando 25% da concentração (MPC). As formulações preservaram o meio de cultura por pelo menos o dobro do tempo na concentração de 0,025%. Este resultado ficou mais evidente ainda quando comparado com o propionato de cálcio, na concentração de 0,1%. Os resultados obtidos nos ensaios acelerados pela contaminação orientada por fungos filamentosos, entretanto, reforçam a necessidade de Boas Práticas de fabricação para produtos lácteos, pois os ensaios não mostraram preservação pelo tempo mínimo de 7 dias, exceção para a formulação MPC na concentração de 0,4%.

Paralelamente à este estudo, as indústrias interessadas utilizaram as formulações em produtos já existentes, na substituição de conservantes naturais e visando a avaliação de lotes quanto às características organolépticas e sensoriais dos produtos. Estes resultados não estão apresentados, sendo considerado como segredo industrial de cada empresa, mas informaram que os participantes receberam bem os produtos, não sendo diferenciados pelas características sensoriais.

Estes resultados foram muito promissores, motivando algumas indústrias ao desenvolvimento de novos produtos orgânicos e naturais, sem aditivos químicos.



Esta análise passará pela avaliação de lotes do produto lácteo e de panificação, além da definição de estratégias de marketing e planta industrial.

Na literatura existem poucos trabalhos relacionados com a utilização de própolis como conservante de alimentos. Mesmo assim, para a manutenção da qualidade industrial, as características de composição da própolis com a finalidade de conservante tem que ter uma padronização que possa ser identificada através de marcadores químicos. A própolis utilizada nestes estudos foram tipificadas e os marcadores estão determinados.

## 7 CONCLUSÕES

1. Quatro formulações a base de própolis tipificada e óleos essenciais vegetais apresentaram atividade conservante para alimentos à 30°C, sendo a melhor a formulação PC, equivalente ao sorbato de potássio e melhor que o propionato de cálcio, nas concentrações utilizadas por estes.
2. As quatro formulações (EEP1, EEP2, PCO e PC) foram melhores que os conservantes químicos de referência para a temperatura de 8°C.
3. As formulações derivadas MP e MPC, com eliminação das características de interferência sensorial por tratamento físico-químico foram avaliadas e a formulação MPC apresentou resultado equivalente ao sorbato de potássio, e duas vezes superior ao propionato de cálcio, na temperatura de 30°C.
4. As formulações MP e MPC foram superiores aos conservantes de referência na temperatura de 8°C, chegando a preservar o meio de cultura perto de 70 dias.
5. Estas formulações podem ser utilizadas para substituir conservantes químicos nas indústrias de alimentos panificadora (MPC) ou de produtos lácteos (MPC ou MP), sem interferência significativa nas características sensoriais dos produtos.
6. As boas práticas de fabricação continuam sendo essenciais para a preservação do tempo de prateleira, mesmo na utilização destes conservantes naturais desenvolvidos.

## REFERÊNCIAS

ABIA (Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos). 2014. **Um quarto do sódio vem da comida processada**. Disponível em:

<http://www.abia.org.br/vst/default.asp>. Acesso em 29 de Abril de 2014.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentação Saudável: Fique esperto!** 2008. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/propaganda/alimento\\_saudavel\\_gprop\\_web\\_pdf](http://www.anvisa.gov.br/propaganda/alimento_saudavel_gprop_web_pdf)>. Acesso em: 12 de maio de 2014.

ALBUQUERQUE, M.V. et al. Educação Alimentar: Uma proposta de redução do consumo de aditivos alimentares. **Química Nova**, v.34, n.2, maio 2012.

ALENCAR, S.M. et al. Chemical composition and biological activity of new type of brasilian propolis: red própolis. **Journal Ethnopharmacol.** 2007, 113(2), p. 278-83. Disponível em:[http://apiculture.com/articles/us/red\\_%20propolis\\_biological\\_activities.pdf](http://apiculture.com/articles/us/red_%20propolis_biological_activities.pdf) Acesso em 19 de maio de 2014.

ALVES, E.; KUBOTA, E.H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Rev Cienc Farm Básica Apl.** v.34, n.1, p.37-41, 2013.

AUN, M.V. et al. Aditivos em alimentos. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.** Vol. 34, nº5, 2011.

BANSKOTA, A. H. et al. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research.** V. 15, n.7, p. 561 a 571, 2001.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1998, v.3, 317 p.

BATTISTELLA, P. M. D. **Análise de sobrevivência aplicada à estimativa da vida de prateleira de salsicha**, Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina. 2008

BELIK, W. Perspectivas para segurança alimentar e nutricional no Brasil. **Saúde e Sociedade** v.12, nº 1, p. 12-20, Jan-Jun 2003.

BELLOSO, O.M.; FORTUNY, R.S.; MELGAR, J.M.; MASSILIA, R.M. control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh CUT fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Espanha, vol. 8, p.157-177.

BERNARDI, S. **Funcionalidade de própolis livre e microencapsulada em salame tipo italiano**. 2010. 127f. Dissertação (Pós- graduação em Microbiologia de alimentos)- Escola Superior de agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2010.

BORIS, M.; MANDEL, F.S. Foods and additives are common causes of the attention deficit hyperactive disorder in children. **Ann Allergy**, Estados Unidos, v. 72, n. 5, p. 462-8, May 1994.

BOTRE, Diego Alvarenga et al. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Rev. Ceres**, Viçosa, v.57, n.3, jun. 2010. Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0034-737x2010000300001&ing=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0034-737x2010000300001&ing=pt&nrm=iso)>. Acessos em 22 de abril 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/s0034-737x2010000300001>

BOTTOLI, Carla Beatriz Grespan et al . Determination of parabens in sweeteners by capillary electrochromatography. **Braz. J. Pharm. Sci.**, São Paulo , v. 47, n. 4, dez. 2011 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502011000400015&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502011000400015&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 03 dez. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000400015>.

BRASIL, ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria SVS/MS nº 540/1997. Regulamento técnico: Aditivos Alimentares. Disponível em <Http://www.anvisa.gov.br/>

BRASIL, Decreto nº 7.272, de 25 de Agosto de 2010. Regulamenta a Lei nº 11.346, de 15 de Setembro de 2006, que cria o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Disponível em: <http://www4.planalto.gov.br/consea/conferencia/documentos/lei-de-seguranca-alimentar-e-nutricional>

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária 2001. Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro 2002, que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: [http://www.abic.com.br/arquivos/leg\\_resolucao12\\_01anvisa.pdf](http://www.abic.com.br/arquivos/leg_resolucao12_01anvisa.pdf). Acesso em 30 de março de 2014.

BRASIL. Legislação Brasileira que Aprova o uso de Aditivos Alimentares e Coadjuvantes de Tecnologia. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Alimentação e Nutrição**. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica- 2º ed.

rev. -Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em:

<http://www.saude.gov.br/editora>. Acesso em 01 de maio de 2014.

BRASIL. Resolução nº2, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes, que consta como anexo da presente Resolução. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 17 de janeiro de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>. Acesso em: 21 de abril de 2014.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis. **Food Chem Toxicol.** 1998 Apr, 36: 347-363.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bacterias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para saúde humana. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. v.57, nº 4, p. 373-380,2007. São Paulo.

CALIXTO, J.B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais**. Santa Catarina: Argos, 2001, p.297-316.

CARNEIRO, H. S. Comida e Sociedade: Significados Sociais na História da Alimentação. **Historia: Questões e Debates**, Curitiba: UFPR, nº 42 p.71-80, 2005.

CARNICEL, F. A., PERESI, J.T.M., COELHO, A.R., GONÇALVES, T.M.V., HOFFMANN, F.L. Avaliação da ação antimicrobiana in vitro de propionato de sódio sobre leveduras isoladas de ricota. **Hig. Aliment.**; 19 (129): 76-81, Mar.2005.

CARVALHO, P.R. Aditivos dos Alimentos. **Revista Logos**. São José do Rio Pardo n.12, p.57-70, 2005.

CHAH, K.F. et al. Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v.104, p.164-7, 2006.

CHERNYAK, N.F. On synergistic effect of propolis and some anti-bacterial drugs. *Antibiotiki*. v.18, p. 259 a 261, 1973.

CONTRERAS, J. Alimentacion e cultura: Reflexiones desde la antropologia. **Revista Chilena de antropologia**, Santiago, Chile, n. 11, p. 95-111, 1992.

COUTO, R.H.N.; COUTO, L.A. **Apicultura: manejo e Produtos**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP. 2002. 191p.

DAMÁSIO, M. V. F. R. Desenvolvimento da civilização e colonização do Brasil: a importância antropológica e cultural da salga como método natural de desidratação da carne. 2009. 43 f. Monografia (Especialização em Gastronomia e Segurança Alimentar)-Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

DELAQUIS, P.J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, v.74, p.101-109, 2002

ESTELLES, R.S. **Importância do controle da temperatura e do tratamento térmico na preservação dos nutrientes e qualidade dos alimentos**. 2003. 23f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos II)- Universidade de Brasília, Brasília, 2003.

EVANGELISTA, J. Tecnologia dos Alimentos. 2º ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARIA, T.J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemotype) against phytopathogenic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.6, p.867-71, 2006.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança Alimentar. In:\_\_\_\_\_. Regulamentos e Autoridades. 1 ed. Porto Alegre: ARTMED, 2002. Cap. 10, p. 369-377.

FOSCHIERA, E. M. **Segurança alimentar: Um desafio aos educadores ambientais.** Disponível em: <  
[http://www.portalanpedsul.com.br/admin/uploads/2006/educa%C3%A7%C3%A3o\\_Ambiental/Painel/10\\_34\\_17\\_PA157.pdf](http://www.portalanpedsul.com.br/admin/uploads/2006/educa%C3%A7%C3%A3o_Ambiental/Painel/10_34_17_PA157.pdf)> Acesso em: 12 de maio 2014.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M., DESTRO, M.T. In:\_\_\_\_\_. Fatores Intrínsecos que Controlam o Desenvolvimento Microbianos Alimentos 1.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 2, p. 13-26.

FRANCO, S.L. et al . Avaliação farmacognóstica da própolis da região de Maringá. **Rev. bras. farmacogn.**, Maringá , v. 9-10, n. 1, 2000 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2000000100001&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2000000100001&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 20 ago. 2013.  
<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2000000100001>.

FREITAS, A. C.; FIGUEIREDO, P. Conservação dos Alimentos. Book pdf. Lisboa 2000. Disponível em:<<http://www.pfigueiredo.org/book.pdf>> Acesso em 10 de dezembro de 2013.

GARCIA, R.W.D. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. Rev. Nutr. V.16, p 483-92, 2003. Disponível em:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000237&pid=s0102-311x200900080000200059&ing=e](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000237&pid=s0102-311x200900080000200059&ing=e) Acesso em 27 de abril de 2014.

GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, n.60, p. 59-84, 1979.



GLASS, K.A.; DOYLE, M.E. Sodium reduction and its effect on food safety, food quality, and human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.9, p.44 a 56, 2010.

GONSALES, G. Z. et al . Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, Botucatu , v. 12, n. 2, Apr. 2006 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1678-91992006000200009&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-91992006000200009&lng=en&nrm=iso)>. access on 22 Aug. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992006000200009>

GORETTI, M. et al. In vitro antimycotic activity of a Williopsis saturnus killer protein against food spoilage yeasts. **International Journal of Food Microbiology**. V.131, p.178-182, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/303249>

ILORI, M.O. et al. Antidiarrhoeal activities of *Ocimum Gratissimum* (Lamiaceae). **Journal of Diarrhoeal Diseases Research**, v.14, p.283-5, 1996.

KERR, W.E. História Parcial da Ciência Apícola no Brasil. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/bee/introd.htm>. Acesso em 28 de março de 2014.

KOC, A.N.; SILICI, S.; MUTLU-SARIGUZEL, F.; SAGDIC, O. Antifungal activity of propolis in four different fruit juices. **Food Technol. Biotechnol** Kayseri, Turkey, v.45, n.1, p.57 a 61, 2007.

KRELL, R. Value-added products from beekeeping. **FAO Agricultural Bulletin**. Roma, ed. 1996.

KUMAR, A.; SHUKLA, R.; SINGH, P.; DUBEY, N.K. Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 6, p.539-543, 2010.

KUMAZAWA, S., HAMASAKA, T., NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**. V.84, p. 329 a 339, 2004.

LACERDA, R.C.C.; TIVERON, A.P.; ALENCAR, S.M. Própolis e Segurança Alimentar. **Segurança Alimentar e Nutricional**; Campinas 18(2): 99-106, 2011.

LAPPE, R. **Influência da Utilização de Extrato Hidroalcoólico de Própolis na Formação de Mofos e nas Características Sensoriais do Salame Tipo Italiano**. 2004. 77f. Dissertação (Pós-Graduação em Ciencia e Tecnologia dos Alimentos)- Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2004.

LONGHINI, R. et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. **Rev. bras. farmacogn.** João Pessoa , v. 17, n. 3, set. 2007 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2007000300015&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2007000300015&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2007000300015>

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 544p.

LUSTOSA, S. R. et al . Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 18, n. 3, set. 2008 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000300020&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000300020&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300020>.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; BRUNO, L.M. Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza. 32p. 2011. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br>

MARCUCCI, M.C. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v.26, p.83-99, 1995.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.** São Paulo, v. 72, n.3, p. 405-411, jul./set., 2005. Disponível em: <[http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72\\_3/menezes.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/v72_3/menezes.PDF)>. Acesso em 05 maio 2014.

MENEZES, C. C. et al . Caracterização física e físico-química de diferentes formulações de doce de goiaba (*Psidium guajava* L.) da cultivar Pedro Sato. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 29, n. 3, set. 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612009000300025&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000300025&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 03 dez. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-206120090003000>

MEZOMO, I. F. B. Os Serviços de Alimentação: Planejamento e Administração.- 1ª Ed. Barueri: Manole, 2002 p.01 a 68.

MILLET-CLERC, J.; MICHEL, D.; SIMERAY, J.; CAHUMONT, J.P. Preliminary study of the antifungal properties of propolis compared with some commercial products. *Plants Medicinales et Phytothérapie*, v.21, n.1, p.3 a 7, 1987.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT- Food Science and Technology**, v.38, n.5, p.565-570, 2005.

MOREIRA, S. R. et al . Análise microbiológica e química de iogurtes comercializados em Lavras - MG. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas , v. 19, n. 1, Jan. 1999 . Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-)

20611999000100027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 05 nov. 2013.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611999000100027>

MOREIRA, T. F. Composição química da própolis: vitaminas e aminoácidos. **Rev. bras. farmacogn.**, São Paulo , v. 1, n. 1, 1986 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X1986000100003&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X1986000100003&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X1986000100003>.

NAKAMURA, C.V. et al. Antibacterial activity of *Ocimum gratissimum* L. Essential Oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.9, n.5, p.675-78, 1999.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. *International Journal of Food Microbiology*, v.94, p.329-34, 2004.

NUNES, L. C. C. et al . Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Rev. bras. farmacogn.** João Pessoa , v. 19, n. 2b, jun. 2009 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2009000400003&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000400003&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400003>.

ORTEGA-RAMIREZ, L.A. et al. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. **Journal Food Sci.** 2014 feb; 79(2): p129-37. doi: 10.1111/1750-3841.12341. Epub 2014 jan 21.

PASSOS, M.G.; CARVALHO, H.; WIEST, J.M. Inibição e inativação in vitro de diferentes métodos de extração de *Ocimum gratissimum* L. (“alfavacão” “alfavaca” “alfavaca-cravo”)- Labiatae (Lamiaceae), frente a bactérias de interesse em alimentos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.11, n.1, p.71-78, 2009.

PENA, R. C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. **Cienc. Inv. Agr.**, Santiago, v. 35, n. 1, Apr. 2008. Available from <[http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-16202008000100002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202008000100002&lng=en&nrm=iso)>. access on 22 Aug. 2013. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202008000100002>.

PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M.S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 25, n. 2, maio 2002 . Disponível em <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000200021&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000200021&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em 20 ago. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000200021>

PEREIRA, N.F.M.C. **Atividade antifúngica de produtos naturais contra leveduras que deterioram alimentos**. 2011. 46f. Monografia (Especialização em Microbiologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

POLONIO, ML.T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. **Cad. de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 8, Aug. 2009. Available from [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0102-311x2009000800002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0102-311x2009000800002&lng=en&nrm=iso). Acesso em 27 abril 2014.

PROENCA, Rossana Pacheco da Costa. Alimentação e globalização: algumas reflexões. **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 62, n. 4, Oct. 2010. Available from <[http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0009-67252010000400014&lng=en&nrm=iso](http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252010000400014&lng=en&nrm=iso)>. Access on 04 Dec. 2013.

ROSSI, L.P.R.; ALMEIDA, R.C.C. Bacteriófagos para controle de bactérias patogênicas em alimentos. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo; v. 69, n .2, p. 151 a 156, 2010.

SÁ, R.A. et al. Própolis brasileira protege *Saccharomyces cerevisiae* células contra o estresse oxidativo. **Braz. J. Microbiol.** São Paulo, v.44, n.3, dez. 2013.

SANTOS, C, R.A. A Alimentação e seu Lugar na História: Os Tempos da Memória Gustativa. **Histórias Questões e Debates**, Curitiba: UFPR, 2005 nº42 p.11-31.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brasilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-80, 2004.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI S.; KAMAYA, A.; OHSHIDA, M.; KABASAWA, K; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with eight mouse organs: results with 39 currently used foods additives. **Mutation Research**, japão, v. 519, n. (1-2), p. 103-19, Aug. 2002.

SCHULZ, D. BONNELLI, R. R., BATISTA, C. R. V. Bactericinas e enzimas produzidas por *Bacillus ssp.* Para a conservação e processamento de alimentos. **Alim. Nut, Araraquara**, São Paulo, v.16, n.4, p. 403-411, out/dez. 2005.

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

SILVA, B.B. et al. Chemical composition and botanical origin of red própolis, a new type of brasilian propolis. **Evid. Based. Complement Alternat. Med.** 2008, 5 (3), p. 313-16. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2529384/>> Acesso em 19 de maio de 2014.

SILVA, M.C. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com utilização de metodologias convencionais e do sistema Simplate. 2002. 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia de alimentos) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985,274p.

SOARES,D.M. A influência do contexto aditivos alimentares na aprendizagem de funções inorgânicas. 2005. 116f. Dissertação (Mestrado em Ensino das Ciências)- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2005.

SOUZA, E. et al. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**. V. 18, p. 409-413, 2007.

TOSI,E.A.; RÊ,E. ; ORTEGA, M.E.; CAZZOLI, A.F. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chemistry** 104 (2007) 1025-1029.

TURINA, A.V.; NOLAN, M.V.; ZYGADLO, J.A.; PERILLO, M.A. Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophysical Chemistry**, v.122, p. 101-113, 2006.

WAGH, V.D. Propolis: A wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. **Advances in Pharmacological Sciences**, India, v.2013, 2013: 308249.

WHO, Food safety and foodborne illness (2002) World Health Organization Fact sheet. Geneva, Revised January 2002. 237p.

## **ANEXO A – Formulações utilizadas neste estudo**

Descrição de composição das amostras utilizadas neste estudo:

EEP: extrato etanólico de própolis 11%

PCO: 10 g mel, 1,5 mL EPP 11% e 0,5% de óleo essencial de canela

MPC: 10 g mel, 1,5 mL EPP 11% e 0,5% de óleo essencial de canela, com tratamento físico-químico

MP: 10 g mel e 1,5 mL EPP 11%

Todas as amostras foram fornecidas e preparadas pela empresa NovoMel Biotecnologia, São Paulo.