

**UNIVERSIDADE DE SOROCABA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
AMBIENTAIS**

Joana Garrossino Magalhães

**INGREDIENTE NATURAL DE NOVA GERAÇÃO COM CAPACIDADE
CONSERVANTE PARA USO EM PÃES**

**Sorocaba/SP
2025**

Joana Garrossino Magalhães

**INGREDIENTE NATURAL DE NOVA GERAÇÃO COM CAPACIDADE
CONSERVANTE PARA USO EM PÃES**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

Orientador: Profa. Dra. Denise Grotto

**Sorocaba/SP
2025**

Ficha Catalográfica

M166i Magalhães, Joana Garrossino
Ingrediente natural de nova geração com capacidade conservante para
uso em pães / Joana Garrossino Magalhães. -- 2025.
58 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Grotto.
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) -
Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2025.

1. Alimentos - Conservação. 2. Conservantes naturais. 3. Panificação. I.
Grotto, Denise, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Joana Garrossino Magalhães

**INGREDIENTE NATURAL DE NOVA GERAÇÃO COM CAPACIDADE
CONSERVANTE PARA USO EM PÃES**

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Grotto
Universidade de Sorocaba - UNISO

Profa. Dra. Cristina de Simone Carlos Iglesias Pascual
Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI

Profa. Dra. Maria Aparecida Lopes da Costa
Universidade de Sorocaba - UNISO

Dedico este trabalho Àquele que me deu
capacidade de realizá-lo: Deus. Me presenteou
com minha família e todas as habilidades
necessárias para que eu realizasse todos os
sonhos que Ele mesmo colocou em meu
coração.

AGRADECIMENTOS

Por todos esses meses de dedicação, apresento as pessoas que tiveram contribuição para que eu pudesse trilhar este caminho. Por isso, de todo coração, expresso minha eterna gratidão a todos que foram indispensáveis em minha carreira profissional.

Agradeço à minha família: meu pai, minha mãe, meu irmão e meu namorado, que sempre sonharam meus sonhos comigo e fazem o possível e impossível para que eles sejam realizados.

Agradeço também a minha orientadora Profa. Dra. Denise Grotto por me conduzir sempre a uma melhora pessoal e, principalmente, profissional. Sou grata pela confiança que depositou em mim desde o início e por ter dedicado seu tempo a me preparar para esta fase. Obrigada por me inspirar a continuar sempre acreditando a ciência e no avanço tecnológico.

Sou grata à Profa. Dra. Angela Faustino Jozala por ter acreditado em meu trabalho, ter me dado a oportunidade de participar de seus projetos e transmitir ensinamentos para meu desenvolvimento.

A todos os meus colegas com quem dividi meus dias no laboratório, agradeço pelo auxílio em cada fase de minha pesquisa e pela ótima companhia que nunca deixaram meus dias monótonos. Em especial à minha grande amizade feita no início do mestrado, Erika Leão, uma pessoa excepcional que sempre me ajudou em todas as fases. Obrigada, querida amiga, por tanto carinho comigo.

Sou grata também à Thais Francine Ribeiro Alves por me conceder o cinamaldeído para pesquisa.

Minha gratidão ao Programa de Pós-graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais que me proporcionou conhecimento necessário para o desenvolvimento desse trabalho, assim como me presenteou com tantas amizades além do ambiente profissional.

À startup *BioloXcell Biological Solutions*, que confiou em meu trabalho para o andamento de seus projetos e fazê-los deles uma grande ferramenta de desenvolvimento tecnológico.

Por fim, agradeço à Deus pela força dada antes mesmo de passar pelas minhas dificuldades. Pelo amor incondicional que recebo e pela esperança de poder contribuir com tudo que me foi confiado.

RESUMO

A conservação de alimentos é amplamente realizada por meio do uso de aditivos químicos, como o ácido propiônico, o ácido sórbico, o ácido benzoico e os nitritos, que desempenham papéis fundamentais na inibição do crescimento de microrganismos e no prolongamento da vida útil dos produtos. No entanto, o consumo contínuo de conservantes artificiais tem sido associado a efeitos adversos à saúde, impulsionando, nos últimos anos, a crescente demanda por alternativas naturais e sustentáveis. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo investigar a aplicação de conservantes naturais, em comparação com conservantes industrializados, na conservação de pães. Para isso, a nanocelulose bacteriana foi utilizada como matriz carreadora de substâncias naturais, como óleos e extratos. A celulose foi produzida a partir do cultivo da bactéria *Komagataeibacter xylinus*, e os compostos conservantes selecionados pelas propriedades antimicrobianas— extrato de cravo e óleo de cinamaldeído — foram incorporados à nanocelulose bacteriana. O produto final desenvolvido foi incorporado em pães e sua eficácia foi avaliada por meio de testes, incluindo a concentração inibitória mínima e a análise de estabilidade. A avaliação envolveu a medição dos halos de inibição em placas com fungos e a aplicação em pães, comparando sua durabilidade com a de pães contendo conservante artificial. Além disso, teste de aceitabilidade sensorial foi realizado com 100 participantes, utilizando a escala hedônica de 9 pontos para avaliar aparência, cor, aroma, textura, sabor e aceitação global. Os resultados obtidos demonstraram a eficácia do cinamaldeído incorporado à nanocelulose na conservação de pães, promovendo a extensão da sua durabilidade por mais de 21 dias, sem comprometer as características estruturais do produto. Os resultados também indicaram maior aceitação para aparência e cor, enquanto os critérios de sabor e aceitação global apresentaram predomínio de respostas "indiferente", sugerindo a necessidade de ajustes na formulação para melhor mascaramento do sabor residual do cinamaldeído. A combinação de conservantes naturais e nanotecnologia mostrou-se uma alternativa promissora aos conservantes sintéticos, alinhando-se ao mercado de alimentos *clean label* e abrindo espaço para aplicações industriais.

Palavras-chave: conservação de alimentos; celulose bacteriana; conservantes naturais; antioxidantes; aditivos químicos.

ABSTRACT

Food preservation is widely carried out through the use of chemical additives such as propionic acid, sorbic acid, benzoic acid, and nitrites, which play key roles in inhibiting the growth of microorganisms and extending the shelf life of products. However, the continuous consumption of artificial preservatives has been associated with adverse health effects, driving, in recent years, the growing demand for natural and sustainable alternatives. In this context, the present study aims to investigate the application of natural preservatives, in comparison to industrial preservatives, in bread preservation. To achieve this, bacterial nanocellulose was used as a carrier matrix for natural substances such as oils and extracts. The cellulose was produced from the cultivation of the bacterium *Komagataeibacter xylinus*, and the preservative compounds selected for their antimicrobial properties—clove extract and cinnamaldehyde oil—were incorporated into the bacterial nanocellulose. The final product developed was incorporated into bread and its effectiveness was evaluated through tests, including minimum inhibitory concentration and stability analysis. The evaluation involved measuring inhibition zones in fungus-inoculated plates and application to bread, comparing its durability with that of bread containing artificial preservatives. In addition, a sensory acceptability test was conducted with 100 participants, using a 9-point hedonic scale to assess appearance, color, aroma, texture, flavor, and overall acceptance. The results obtained demonstrated the effectiveness of cinnamaldehyde incorporated into nanocellulose in preserving bread, promoting an extended shelf life of over 21 days without compromising the structural characteristics of the product. The results also indicated greater acceptance in terms of appearance and color, while flavor and overall acceptance showed a predominance of “neutral” responses, suggesting the need for formulation adjustments to better mask the residual flavor of cinnamaldehyde. The combination of natural preservatives and nanotechnology proved to be a promising alternative to synthetic preservatives, aligning with the clean label food market and opening the door to industrial applications.

Keywords: food preservation; bacterial cellulose; natural preservatives; antioxidants; chemical additives.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

B	Branco
CB	Celulose Bacteriana
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIN	Cinamaldeído
CR	Cravo
DP	Desvio padrão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
IDA	Ingestão Diária Aceitável
NCB	Nanocelulose Bacteriana
NCIN	Nanocelulose bacteriana + cinamaldeído
NCR	Nanocelulose bacteriana + cravo
ODS	Objetivo de Desenvolvimento Sustentável
OE	Óleo essencial
ONU	Organização das Nações Unidas
P	Propionato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do estudo.....	24
Figura 2 - Ficha de triagem (2B) e teste de aceitabilidade do produto final (2A).....	30
Figura 3 - Teste antifúngico utilizando cepa selvagem. Poço 1 contém inóculo fúngico e meio de cultura. O poço 2 contém o inóculo e o extrato de cravo incorporado em uma medalha de CB. Poço 3 contém o inóculo e extrato de cravo incorporado em NCB. O poço 4 contém o inóculo e uma medalha de CB, sem incorporação. Poço 5 contém NCB, sem incorporação. .	32
Figura 4 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> , sendo que o poço 1 contém o respectivo ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.	33
Figura 5 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo <i>Aspergillus niger</i> , sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.	34
Figura 6 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> , sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.	35
Figura 7 – Concentração Inibitória Mínima para cepa de fungo selvagem, sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.	36
Figura 8 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo <i>Penicillium chrysogenum</i> na estabilidade tempo 0 de incorporação.	37
Figura 9 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>oligosporus</i> na estabilidade tempo 0 de incorporação.	38
Figura 10 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com cepa selvagem na estabilidade tempo 0 de incorporação.	38

Figura 11 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo <i>Aspergillus niger</i> na estabilidade tempo 0 de incorporação.	39
Figura 12 – Registro fotográfico do crescimento fúngico visual observado no quinto dia na triplicata do pão branco (B) e pão controle (P). Sem crescimento nas amostras com CIN e NCIN. Os círculos vermelhos indicam a presença de colônias fúngicas observadas visualmente.	44
Figura 13 – Registro fotográfico dos pães CR (Linha A, em triplicata) no quinto dia e NCR (Linha B, triplicata) no oitavo dia. Os círculos vermelhos indicam a presença de colônias fúngicas observadas visualmente.	45
Figura 14 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação da amostra de pão branco (B). Cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).	45
Figura 15 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação da amostra de pão propionato (P). Cada linha representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).	46
Figura 16 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação do pão CR e NCR em diluição 10^{-3}	46
Figura 17 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação do pão NCIN (Figura A) e CIN (Figura B). Em ambas, cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).	47
Figura 18 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao 14° dia de observação referente aos pães CR e NCR na diluição 10^{-3}	47
Figura 19 - Teste quantitativo do crescimento microbiano dos pães CIN (Figura A) e NCIN (Figura B) referente ao 21° dia de observação. Em ambas, cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).	48
Figura 20 – Registro fotográfico da altura das fatias e da morfologia dos alvéolos comparando a amostra controle com propionato de cálcio (P) e a amostra contendo nanocelulose incorporada ao cinamaldeído (NCIN).	49

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Os dados são apresentados como média do halo de inibição \pm DP (n = 3/grupo) *p<0,05 comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; #p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 2..... 40
- Tabela 2** - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo *Aspergillus niger*. Os dados são apresentados como média do halo de inibição \pm DP (n = 3/grupo) *p<0,05 comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; #p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 2..... 41
- Tabela 3** - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo de cepa selvagem. Os dados são apresentados como média do halo de inibição \pm DP (n = 3/grupo) *p<0,05 comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; #p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 2. 42
- Tabela 4** - Dia de crescimento fúngico de cada amostra e média de colônias observadas visualmente. Os dados são apresentados como média \pm DP (n = 3/grupo). 43
- Tabela 5** - Resultado da soma da magnitude hedônica bipolar 50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Conservantes artificiais alimentares	15
2.2	Aditivos Naturais	16
2.3	Ativos naturais em panificação	17
2.4	Celulose Bacteriana	19
2.5	Nanocelulose Bacteriana	20
3	OBJETIVO	22
3.1	OBJETIVO GERAL:	22
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1	Produção de medalhas de celulose bacteriana (CB)	23
4.2	Produção de nanocelulose bacteriana (NCB)	25
4.3	Caracterização de Nanopartículas	25
4.4	Incorporação de ativo natural em nanocelulose	26
4.5	Teste antifúngico piloto com cepa selvagem	26
4.6	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	26
4.7	Teste de halo invertido e estabilidade	27
4.8	Aplicação em matriz alimentar	28
4.9	Teste quantitativo	29
4.10	Teste de aceitabilidade	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Caracterização de Nanopartículas	31
5.2	Teste antifúngico piloto com cepa selvagem	31
5.3	Concentração Inibitória Mínima (CIM)	32
5.4	Teste de halo invertido e estabilidade	37
5.5	Aplicação em matriz alimentar	43
5.6	Teste quantitativo	45
5.7	Teste de aceitabilidade	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A preservação de alimentos é um dos principais desafios enfrentados pela indústria alimentícia, sendo tradicionalmente abordada por meio da adição de conservantes químicos. Substâncias como o ácido propiônico, o ácido sórbico, o ácido benzóico e os nitritos são amplamente utilizadas para prolongar o tempo de prateleira e inibir o crescimento microbiano em alimentos processados, como pães, molhos e bebidas. No entanto, a exposição prolongada a esses aditivos tem sido associada a efeitos adversos à saúde, como disbiose intestinal, desregulação da homeostase intestinal e reações imunológicas (Rinninella et al., 2020).

Conservantes artificiais, como benzoatos, podem desencadear reações alérgicas, distúrbios neuromodulatórios e hiperatividade infantil quando consumidos em excesso (Piper, 2018). Esses aditivos também reduzem a diversidade da microbiota intestinal saudável, promovendo o crescimento de bactérias pró-inflamatórias (Hrncirova et al., 2019).

Com a crescente conscientização dos consumidores sobre os impactos dos conservantes artificiais, observa-se aumento na demanda por alternativas naturais e saudáveis. Dados da *Euromonitor International* indicam que o mercado global de alimentos saudáveis movimentou U\$ 700 bilhões em 2019, evidenciando forte tendência em direção ao consumo de produtos com rótulos limpos ("*clean label*"). Entretanto, substituir conservantes artificiais representa um desafio técnico significativo, pois exige a manutenção da segurança microbiana, da qualidade sensorial e da estabilidade dos produtos durante sua vida útil (Axel et al., 2016).

Nesse contexto, os extratos vegetais, incluindo os óleos essenciais, têm se destacado como alternativas promissoras devido às suas propriedades antimicrobianas e à compatibilidade com a crescente demanda por aditivos alimentares naturais, seguros e saudáveis (Bouarab Chibane et al., 2019; Wu et al., 2024). Além de atenderem às demandas por soluções naturais, os óleos essenciais oferecem potencial para prolongar a vida útil dos alimentos, contribuindo para a sustentabilidade e a inovação na indústria alimentícia (Gavahian et al., 2020).

A encapsulação de óleos nutracêuticos em materiais carreadores é uma estratégia eficiente para mascarar sabores intensos, preservar a qualidade sensorial e proteger os compostos contra oxidação e volatilização. Além disso, melhora a estabilidade, a biodisponibilidade e permite liberação controlada, garantindo maior eficácia e funcionalidade na matriz em que são incorporados (Casanova et al., 2021; Gonçalves et al., 2017). Dessa forma, os nanomateriais apresentam potencial de aplicação em diversas formas,

principalmente devido à sua grande área superficial específica, possibilitando melhorias significativas em suas propriedades (Franco et al., 2023). A nanocelulose bacteriana tem se destacado por suas propriedades de biocompatibilidade, alta área superficial e capacidade de incorporar ativos, sendo uma solução promissora para a encapsulação e liberação gradual de óleos essenciais em alimentos (Rezaei; Fathi; Jafari, 2019).

A busca por soluções naturais, eficazes e viáveis para a preservação de alimentos é essencial para o avanço da ciência e da tecnologia alimentícia. A combinação de óleos essenciais com nanocelulose bacteriana representa uma abordagem inovadora que alia sustentabilidade, segurança alimentar e inovação, atendendo às demandas da indústria e dos consumidores (Hossain et al., 2016).

Nesse contexto, este estudo se alinha a diversos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) propostos pela Organização das Nações Unidas (ONU). O ODS 2 (Fome Zero e Agricultura Sustentável) é contemplado pela proposta de conservação de alimentos por meio da utilização de ingredientes naturais, contribuindo para a oferta de produtos alimentícios mais seguros e sustentáveis. O ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), por sua vez, é atendido pela substituição de conservantes sintéticos por alternativas mais seguras, promovendo a melhoria da qualidade de vida da população.

No âmbito da inovação tecnológica, o ODS 9 (Indústria, Inovação e Infraestrutura) se reflete na aplicação da nanocelulose bacteriana como matriz carreadora de compostos bioativos, representando avanço na interface entre biotecnologia e ciência dos alimentos. Além disso, o ODS 12 (Consumo e Produção Responsáveis) é contemplado pelo desenvolvimento de um conservante biodegradável, reduzindo a dependência de aditivos sintéticos e minimizando o impacto ambiental decorrente do processamento de alimentos.

Por fim, ao minimizar resíduos químicos e a pegada ecológica da produção alimentícia, o presente estudo também contribui para o ODS 13 (Ação Contra a Mudança Global do Clima). Dessa forma, a pesquisa reforça seu caráter multidisciplinar e inovador, trazendo benefícios tanto para a saúde pública quanto para a sustentabilidade ambiental.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Conservantes artificiais alimentares

Os aditivos alimentares desempenham papel central na indústria de alimentos, sendo amplamente utilizados para aprimorar a cor, sabor, aroma, valor nutricional e a durabilidade dos produtos. Esses compostos são frequentemente listados nos rótulos sob a denominação de "ingredientes" (Gültekin, 2019). Entretanto, o impacto dos aditivos alimentares na microbiota intestinal tem se tornado um campo de pesquisa emergente, considerando que essa comunidade microbiana desempenha funções essenciais na saúde humana. Localizada na camada mucosa do intestino, a microbiota contribui para a digestão de fibras alimentares, a síntese de vitaminas e aminoácidos e o armazenamento de energia. Além de regular o sistema imunológico, também participa do desenvolvimento dos sistemas nervoso e imunológico (Adak; Khan, 2019; Suez et al. 2014).

Conservantes industrializados podem afetar substancialmente não apenas a composição da microbiota intestinal, mas também suas funções. Com o aumento do consumo de alimentos ultraprocessados nas últimas décadas, e considerando o uso disseminado de aditivos alimentares nesses produtos, os efeitos dessas substâncias na saúde intestinal merecem atenção (Rinninella et al. 2020).

No setor de panificação, conservantes como propionatos de cálcio (Phechkrajang; Yooyong, 2017), propionato de sódio (Darwiche et al., 2001), ácido sórbico (De Jesus et al., 2021), benzoato de sódio e sorbato de potássio (Chaleshtori; Arian; Chaleshtori, 2018) são amplamente utilizados. Dentre eles, os propionatos são os mais comuns, devido à sua maior solubilidade e ausência de odor perceptível (Smith et al., 2004). No entanto, estudo proposto por Xu et al., (2022) aponta que o consumo desses conservantes pode elevar os níveis de glicose no sangue, colesterol total e triglicérides, resultando em hiperglicemia e sintomas depressivos. Esses efeitos podem estar relacionados à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, desencadeada pelo estado hiperglicêmico.

Os aditivos alimentares podem impactar significativamente tanto a composição quanto as funções da microbiota intestinal (Rinninella et al., 2020). Estudos *in vitro* também indicam que algumas bactérias intestinais humanas são altamente suscetíveis a aditivos antimicrobianos, especialmente ao nitrito de sódio e suas combinações. A combinação mais sinérgica observada foi entre benzoato, nitrito e sorbato. Há evidências de que a exposição contínua da microbiota intestinal humana a níveis baixos desses aditivos pode alterar sua

composição e função, com impactos negativos no sistema imunológico (Hrncirova et al., 2019).

2.2 Aditivos Naturais

Nos últimos anos, a demanda por antioxidantes naturais aumentou significativamente, motivada por relatos sobre os efeitos adversos de compostos sintéticos. Esse cenário tem direcionado a maioria das pesquisas para a identificação de novos antioxidantes obtidos de fontes naturais, principalmente vegetais, extraídos de folhas, raízes, caules, frutos, sementes e cascas. O método de extração e o tipo de solvente utilizado desempenham papel crucial na composição e eficácia dos extratos vegetais, influenciando diretamente suas propriedades (Shah; Bosco; Mir, 2014).

Pesquisadores e indústrias alimentícias têm investido intensamente em conservantes naturais com ampla ação antimicrobiana. Agentes antimicrobianos, antioxidantes naturais e revestimentos comestíveis são ferramentas essenciais para proteger alimentos e outros produtos contra bactérias e processos de deterioração (Teshome et al., 2022). Entre os exemplos mais relevantes, os óleos essenciais (OEs) apresentam propriedades antioxidantes e antimicrobianas atribuídas a compostos bioativos, como fenóis e terpenoides. Suas atividades antimicrobianas, associadas à presença de grupos hidroxilas, danificam as membranas celulares de patógenos, causando a liberação de constituintes intracelulares e a morte dos microrganismos, o que os tornam alternativas promissoras para a indústria de alimentos (Casalini; Giacinti Baschetti, 2023).

A *Food and Drug Administration* (FDA) classifica o OE de canela (*Cinnamomum* sp) como *Generally Recognized As Safe* (GRAS), permitindo seu uso em perfumes, cosméticos, produtos sanitários, medicamentos e alimentos (Haro-González et al., 2021). Sua composição inclui entre 60-75% de cinamaldeído, substância que igualmente possui classificação GRAS pela Associação dos Fabricantes de Extratos Aromatizantes dos Estados Unidos (FEMA) e é aprovada para uso alimentar pela FDA (Santos Silva Silva Figueiredo et al., 2017).

No Brasil, a Resolução RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007, permite o uso de OEs como ingredientes alimentares, desde que sejam seguros para consumo humano, conforme a classificação GRAS. Esses óleos devem respeitar os limites estabelecidos para cada tipo de alimento e estar devidamente declarados nos rótulos, em conformidade com as normas da ANVISA (Brasil, 2007).

Entre os OEs mais utilizados, o óleo de canela, rico em cinamaldeído, se destaca pela ação antimicrobiana contra agentes causadores de deterioração alimentar (Matan et al., 2006). O cinamaldeído atua como potente agente supressor do crescimento microbiano devido aos seus efeitos bloqueadores associados à inibição da atividade das ATPases, à interrupção da biossíntese da parede celular e à alteração da estrutura e integridade da membrana celular (Shreaz et al., 2016).

O óleo de cravo (*Eugenia caryophyllus*) tem como principal componente o eugenol, e apresenta propriedades inseticidas, antimicrobianas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antivirais, antioxidantes e anticancerígenas (Haro-González et al., 2021). Outros exemplos incluem o óleo de alho, com características antibacterianas, antifúngicas e imunorreguladoras, e o óleo de orégano, conhecido por suas propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, expectorantes, relaxantes e cicatrizantes (Mucha; Witkowska, 2021).

Outra alternativa promissora são os extratos vegetais, ricos em compostos fenólicos, que oferecem solução eficaz aos antioxidantes sintéticos (Shah; Bosco; Mir, 2014). De acordo com a Farmacopeia Brasileira, os extratos são preparações líquidas, semissólidas ou sólidas obtidas de drogas vegetais por métodos extrativos e solventes adequados. Extratos fluídos, por exemplo, são preparações líquidas no qual parte do extrato equivale, em massa ou volume, a uma parte da droga vegetal seca, podendo ser ajustado para garantir o teor de constituintes ativos especificados (Brasileira, 2019).

Estudo proposto por da Silva et al., 2013 mostrou que extratos aquosos e etanólicos de folhas de maracujá possuem atividade antioxidante superior à da fruta. Além disso, Takahashi; Kokubo; Sakaino, (2004) identificaram que extrato de folhas de eucalipto apresentou atividades antibacterianas, anti-hiperglicêmicas e antioxidantes, sendo amplamente utilizado como aditivo alimentar, cosmético e produto medicinal.

2.3 Ativos naturais em panificação

Alimentos panificados, assim como a maioria dos produtos processados, estão sujeitos a alterações físicas, além de deterioração química e microbiológica. Aqueles com elevada umidade têm sido associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos, representando uma preocupação significativa para a saúde pública. Os pães, por apresentarem alta umidade, são especialmente suscetíveis à deterioração, demandando maior atenção no controle de sua qualidade e conservação (Smith et al., 2004).

Esses produtos estão sujeitos à contaminação por diversas espécies de fungos, sendo os principais responsáveis pela deterioração pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* (Lemos et al., 2022; Bernardi et al., 2019). Além desses, outros gêneros comumente associados à degradação do pão incluem *Cladosporium*, *Mucor* e *Rhizopus* (Garcia et al., 2019).

Dentre as diversas técnicas de preservação desenvolvidas para prolongar a vida útil microbiológica de forma segura, destacam-se as abordagens tecnológicas e químicas, bem como estratégias que envolvem a adição de ingredientes naturais às receitas de pão, conhecidas como bioconservantes (Otoni et al., 2014). Um exemplo dessas estratégias é o uso de OEs com atividade antifúngica, que têm demonstrado potencial para inibir o crescimento de microrganismos e contribuir para a conservação do produto (Debonne et al., 2018b).

Os OEs conferem caráter protetor contra microrganismos deteriorantes, representando solução eficaz para preservar a qualidade de pães e derivados. Estima-se que o pão deteriorado gere desperdício de 5% a 10% da produção mundial, resultando em perdas econômicas para a indústria e consumidores, além de representar riscos à saúde humana devido à presença de micotoxinas. Para mitigar esses problemas, a indústria busca estratégias que aumentem a vida útil do pão, preservando sua segurança (Melini; Melini, 2018)

A biopreservação, utilizando extratos e óleos essenciais, pode ser aplicada por meio de duas estratégias distintas. A primeira envolve a inclusão de ingredientes ativos com propriedades antimicrobianas, como os OE e extratos vegetais, diretamente na massa do pão. A segunda alternativa consiste na aplicação desses ingredientes na atmosfera da embalagem (Debonne et al., 2018; Melini; Melini, 2018).

Efeitos antifúngicos sinérgicos foram observados entre o OE de cravo e diversos conservantes químicos, destacando-se como alternativa promissora para a redução do uso de aditivos sintéticos em produtos à base de farinha de trigo (Viraj et al., 2015). De forma semelhante, o OE de canela demonstrou maior efeito inibitório sobre os microrganismos *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus flavus*, frequentemente associados ao desenvolvimento de fungos em "pães de trigo" (Nanasombat et al., 2010).

Apesar da literatura ainda ser limitada, o interesse crescente por ingredientes naturais multifuncionais tem impulsionado pesquisas sobre OEs como conservantes naturais. Nos últimos 5 anos, houve aumento significativo nas publicações científicas sobre o impacto de extratos herbais na conservação de pães e bolos (Gavahian et al., 2020).

O conceito *clean label* tem ganhado destaque na indústria de alimentos, impulsionado pela demanda dos consumidores por transparência e ingredientes naturais (Exame, 2021).

Esse movimento reflete uma mudança no comportamento do consumidor, que busca reduzir o consumo de aditivos sintéticos e priorizar ingredientes reconhecíveis e minimamente processados (Aschemann-Witzel; Varela; Peschel, 2019). Nesse contexto, o uso de ativos naturais em alimentos tem se destacado como uma estratégia competitiva para a indústria, agregando valor aos produtos e atendendo às exigências regulatórias e de mercado (ANVISA, 2021). Ingredientes como antioxidantes naturais, conservantes derivados de fontes vegetais e corantes naturais não apenas ampliam o apelo comercial dos produtos, mas também reforçam a percepção de qualidade e segurança alimentar (Euromonitor International 2023). Assim, investir em formulações *clean label* representa não apenas resposta às tendências de consumo, mas também uma oportunidade de diferenciação e inovação para as empresas do setor.

Embora apresentem várias vantagens, os OEs devem ser usados com cautela, pois altas concentrações podem ser tóxicas (Debonne et al., 2018). Tecnologias como o encapsulamento com liberação controlada têm se mostrado eficazes para proteger esses ativos da degradação e oxidação, facilitar a solubilidade, minimizar alterações sensoriais indesejáveis e potencializar sua eficácia antimicrobiana. Essa abordagem é reconhecida como inovação de destaque no século, com grande potencial de aplicação e popularização (Mucha; Witkowska, 2021). Nesse contexto, o uso da celulose bacteriana surge como uma estratégia promissora e inovadora para aprimorar a aplicação desses compostos.

2.4 Celulose Bacteriana

A celulose bacteriana (CB) é um biomaterial nanoestruturado e atóxico, sendo produzida pela bactéria *Komagataebacter xylinus* (anteriormente classificado como *Acetobacter xylinum*), uma espécie gram-negativa, estritamente aeróbica e não fotossintética. Essa bactéria é capaz de converter glicose e outros substratos orgânicos em celulose em poucos dias (Wang; Tavakoli; Tang, 2019). Embora a função biológica da produção de celulose para a própria bactéria não seja completamente compreendida, há hipóteses de que essa capacidade seja essencial para sua sobrevivência, atuando como proteção contra radiação ultravioleta ou como barreira física contra fungos, leveduras e outros organismos (Moon et al., 2011). Apesar de compartilhar a fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$ com a celulose vegetal, a CB se diferencia pela ausência de hemicelulose, pectina e lignina. Além disso, sua estrutura apresenta uma rede nanofibrilar ultrafina, altamente organizada e com grande capacidade de retenção de água (De Amorim et al., 2020).

Como um polímero natural renovável, a CB possui propriedades excepcionais, como alta pureza, rede tridimensional de nanofibras, elevada cristalinidade, excelentes propriedades mecânicas, moldabilidade durante o processo de formação e biocompatibilidade (Wang; Tavakoli; Tang, 2019). Classificada como GRAS, a CB é utilizada nos setores alimentício e de saúde, além de ser considerada uma fibra dietética (Rastogi et al., 2018). Sua síntese ocorre pela conversão da glicose no sistema celular bacteriano, resultando em fibrilas que se organizam no envelope celular. Em condições estáticas, essas fibrilas se agrupam em feixes, formando fitas que emergem como películas na superfície do meio líquido. Essas películas apresentam cerca de 97% de celulose pura, valor superior à celulose de origem vegetal (Rastogi; Banerjee, 2020).

As características singulares da CB conferem a ela grande versatilidade industrial. No setor alimentício, é utilizada como espessante, estabilizante e gelificante, demonstrando potencial para aprimorar a qualidade de alimentos processados (De Amorim et al., 2020). No entanto, a expansão de sua aplicação enfrenta desafios técnicos e econômicos, como a otimização das condições de cultivo e a redução dos custos de produção. Para superar esses obstáculos, é fundamental desenvolver processos de produção mais econômicos, com alta produtividade e curto tempo de cultivo (Wang; Tavakoli; Tang, 2019).

Embora a produção microbiana de CB seja quantitativamente inferior à produção da celulose vegetal, a CB se destaca por sua confiabilidade e sustentabilidade econômica. A crescente demanda por celulose em áreas biotecnológicas é impulsionada por suas propriedades excepcionais, como elevada biocompatibilidade e pureza. Além disso, a CB pode ser utilizada isoladamente ou combinada com outros materiais, ampliando suas possibilidades de aplicação (Rastogi; Banerjee, 2020).

2.5 Nanocelulose Bacteriana

Os nanomateriais têm revolucionado a indústria alimentícia ao melhorar a qualidade e funcionalidade dos alimentos. Eles previnem a degradação microbiana, aprimoram cor, sabor e textura, e aumentam a biodisponibilidade de nutrientes. Podem ser orgânicos, como lipídios e proteínas usados na encapsulação de compostos bioativos; combinados orgânicos/inorgânicos, projetados para funções específicas, como ação antimicrobiana e antioxidante; ou nanofibras de celulose, aplicadas como aditivos, em embalagens ou como emulsionantes, otimizando propriedades e segurança dos produtos alimentares (Franco et al., 2023).

A nanocelulose bacteriana (NCB), predominantemente derivada de fibras de CB, apresenta propriedades como biodegradabilidade e renovabilidade. Essas características fazem dela um material sustentável e ecologicamente correto, com destaque para sua excelente capacidade de retenção de água, tornando-a ideal para processos de imobilização. Além disso, sua classificação como material GRAS reforça sua viabilidade para diversas aplicações industriais (R et al., 2021).

Graças às suas propriedades únicas e alta funcionalidade, a NCB tem se mostrado uma solução promissora em várias áreas. Seu potencial inclui o desenvolvimento de novos alimentos, materiais estruturais, implantes autocicatrizantes, nanopílulas avançadas e outros produtos inovadores (De Amorim et al., 2020). A funcionalidade da NCB pode ser ampliada por meio de combinações com diferentes formas do material ou pela integração com outros ingredientes naturais. Tais avanços são fundamentados no controle preciso das interações entre a NCB e outros componentes naturais, abrindo novas perspectivas para alimentos, cosméticos e outras formulações relacionadas (Bai et al., 2018).

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL:

Desenvolver ingrediente natural de nova geração com propriedades conservantes, destinado à aplicação em panificação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Produzir nanocelulose bacteriana para ser utilizada como suporte na incorporação de ativos naturais;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ativo natural com melhor desempenho antifúngico;
- Avaliar a aplicação dos ativos naturais incorporados em nanocelulose bacteriana em uma matriz alimentar (pão de forma), com o objetivo de assemelhar e, potencialmente, aumentar o tempo de prateleira do produto, comparado ao conservante sintético;
- Demonstrar a eficácia da conservação do alimento final, garantindo que as propriedades físicas do produto não sejam comprometidas;
- Avaliar a aceitabilidade do pão produzido.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O delineamento do estudo seguiu o esquema representado na Figura 1. Na primeira fase, diferentes formatos de CB foram produzidos e processados. Na segunda fase, uma cepa selvagem, isolada de pão contaminado, foi utilizada como fungo de pesquisa, sendo o cravo o extrato identificado como o mais eficaz entre os testados, que incluíram também canela, manjeriço e orégano. O cravo foi, então, aplicado tanto em sua forma pura quanto incorporado em NCB para avaliação em matriz alimentar.

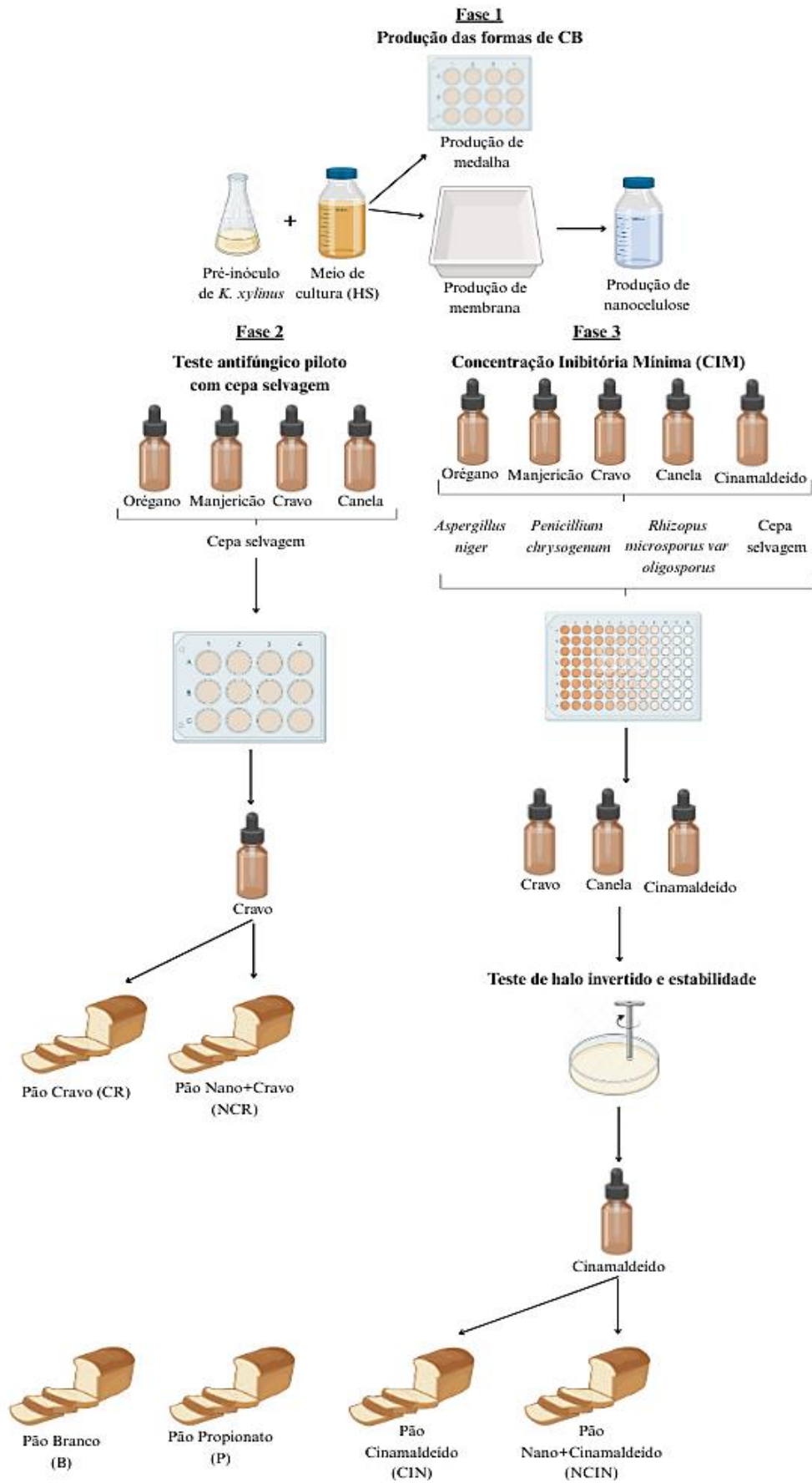
Na terceira fase, cepas de coleção foram testadas, também foi avaliado um novo ativo, o cinamaldeído, que apresentou o melhor desempenho na concentração inibitória mínima, entre os analisados. Assim como o cravo, o cinamaldeído foi aplicado em matriz alimentar tanto em sua forma pura quanto incorporado em NCB.

4.1 Produção de medalhas de celulose bacteriana (CB)

A produção da CB foi feita pela cultura de *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53582). Os pré-inóculos foram preparados em condições estáticas, a 30 °C, por 48 horas, em meio líquido Hestrin & Schramm (HS), composto por glicose (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), fosfato de sódio anidro (1,15 g/L) e ácido cítrico monoidratado (1,15 g/L), em frascos Erlenmeyer. Após esse período, o cultivo da bactéria foi realizado em placas de 12 poços previamente autoclavadas. O cultivo foi conduzido por 10 dias, sob condições estáticas. Ao final, uma medalha de CB foi produzida, e na sequência foi submetida a processo de purificação, sendo imersa em solução de NaOH 1M a 60 °C por 90 minutos, para a remoção de células bacterianas aderidas. Posteriormente, as medalhas foram lavadas com água destilada até que o pH fosse neutralizado, adaptando um método de Jozala et al. (2015).

Esse formato de apresentação da CB foi utilizado para realização do teste com cepa selvagem da fase 2 do delineamento do estudo apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do estudo.



Fonte: próprio autor

4.2 Produção de nanocelulose bacteriana (NCB)

A produção da CB foi feita pela cultura de *Komagataeibacter xylinus* (ATCC 53582). Os pré-inóculos foram preparados em condições estáticas, a 30 °C, por 48 horas, em meio líquido Hestrin & Schramm (HS), composto por glicose (20 g/L), extrato de levedura (5 g/L), fosfato de sódio anidro (1,15 g/L) e ácido cítrico monoidratado (1,15 g/L), em frascos Erlenmeyer. Após esse período, o cultivo da bactéria foi realizado em caixas plásticas previamente esterilizadas por exposição à luz UV por 60 minutos, utilizando-se meio HS com 10% de pré-inóculo bacteriano por caixa. O cultivo foi conduzido por 10 dias, sob condições estáticas. Ao final, uma película de CB foi produzida (membrana), e na sequência foi submetida a um processo de purificação, sendo imersa em solução de NaOH 1M a 60 °C por 90 minutos, para a remoção de células bacterianas aderidas. Posteriormente, as membranas foram lavadas com água destilada até que o pH fosse neutralizado, adaptando um método de Jozala et al (2015).

Após a etapa de neutralização, as membranas de CB foram submetidas à trituração, utilizando um liquidificador industrial e um dispersor *Ultraturrax* por 5 minutos, com o objetivo de reduzir o tamanho das partículas. A massa de CB triturada foi transferida para um coador de malha fina para a remoção do excesso de água. Em seguida, a massa triturada foi autoclavada em água destilada, a 121 °C por 15 minutos, e armazenada à temperatura ambiente.

Para a obtenção da NCB, uma proporção de 5 g de CB triturada para 15 mL de água *Milli-Q* foi utilizada. A mistura foi transferida para béquer e submetida à aquecimento e agitação contínuos. Quando a temperatura atingiu 50 °C, 500 µL de celulase (Sigma Aldrich, Cellulase from *Trichoderma reesei*, solução aquosa, ≥ 700 unidades/g) foram adicionados ao béquer. Após aproximadamente 30 minutos, a quebra visual das fibras foi observada. Em seguida, a temperatura foi elevada para 100 °C e mantida por 20 minutos, para inativação enzimática. Ao término do processo, a solução foi centrifugada a 5500 rpm por 20 minutos, e a NCB foi coletada do sobrenadante, adaptando o método de Soeiro et al., (2021).

4.3 Caracterização de Nanopartículas

A amostra de NCB foi caracterizada por meio da Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA), técnica que determina o índice de refração de nanopartículas em

suspensão. Esse método baseia-se no movimento browniano, permitindo a avaliação do tamanho e da concentração das nanopartículas na amostra.

4.4 Incorporação de ativo natural em nanocelulose

Para a incorporação de cada ativo em NCB, frascos tipo Falcon foram utilizados. A proporção 1:1 de ativo em NCB foi utilizada. A mistura foi submetida à agitação em *shaker* (NT 715, Nova Técnica) a 25 °C, por período de 4 horas, com velocidade de 100 rpm. O tempo de incubação foi definido com base no protocolo reproduzido por Malheiros et al., (2018).

4.5 Teste antifúngico piloto com cepa selvagem

Para esse estudo, uma revisão da literatura foi realizada a fim de conhecer os principais extratos e OEs que tivessem apresentado atividade antimicrobiana, especialmente antifúngica. Assim, extratos de cravo, canela, orégano e manjerição foram escolhidos. Todos os ativos foram adquiridos comercialmente.

O ensaio foi realizado utilizando uma cepa selvagem, isolada de amostra de pão, na concentração de 10^6 UFC/g. O experimento foi conduzido em placa de 12 poços, todos contendo meio de cultura à base de caldo Sabouraud. No poço 1, além do meio de cultura, foram adicionados 10 µL do inóculo fúngico. O poço 2 continha o inóculo e uma medalha de CB incorporada em cada ativo, enquanto o poço 3 continha o inóculo e NCB incorporada ao mesmo extrato. Já os poços 4 e 5 continham, respectivamente, o inóculo e medalhas de CB e NCB sem incorporação.

4.6 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para a avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), extratos de cravo, canela, orégano e manjerição foram utilizados, além do OE de cinamaldeído (principal composto do extrato de canela). Esse teste foi realizado com o propósito de identificar a melhor concentração de cada extrato para ser aplicado em matriz alimentar.

O ensaio de CIM foi realizado utilizando a cepa selvagem e as cepas de *Aspergillus niger* (ATCC5275), *Penicillium chrysogenum* (ATCC48905) e *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* (ATCC22959) obtidos comercialmente. Cada microrganismo foi avaliado em

uma microplaca, na qual foram adicionados, sequencialmente, 100 µL de ágar Sabouraud líquido, 10 µL do inóculo *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, individualmente, em concentração de 10⁶ UFC/g, e, por fim, 100 µL dos compostos naturais. Os ativos cravo, canela, orégano e manjeriço cujas concentrações iniciais foram de 20% e para cinamaldeído a concentração estava a 100%. Para cada microplaca, foram preparados controle negativo (meio de cultura sem inóculo) e controle positivo (com inóculo e sem qualquer ativo). As microplacas foram incubadas a 25 °C por 3 dias (Şahin et al., 2004). O crescimento dos fungos foi avaliado retirando-se 10 µL de cada poço e transferindo-os para placas de Petri contendo ágar Sabouraud solidificado. A CIM foi definida como a menor concentração de compostos naturais que não mostra crescimento visual dos fungos, após 72 horas.

Com base nos resultados obtidos, os testes subsequentes concentraram-se na incorporação do ativo em NCB, o teste de halo invertido e, em seguida, na sua aplicação em uma matriz alimentar.

4.7 Teste de halo invertido e estabilidade

A atividade antifúngica *in situ* dos compostos naturais incorporados na NCB foi avaliada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud solidificado, 200 µL do inóculo fúngico, em concentração de 10⁶ UFC/g, foram aplicados no centro de cada placa. Em seguida, o inóculo foi uniformemente espalhado sobre a superfície do meio de cultura. Posteriormente, poços com diâmetro de 10 mm foram feitos na região central da placa contendo o meio de cultura (Acharya; Hare, 2022). Os poços foram preenchidos com o ativo natural e com o ativo natural incorporado à NCB. Os compostos ativos cravo e canela foram utilizados em concentração de 20%, enquanto o cinamaldeído foi empregado em concentração de 100%. Já a incorporação dos ativos à NCB ocorreu na proporção de 1:1, ou seja, com concentração final de 10% para cravo, canela, orégano e manjeriço, e de 50% para cinamaldeído.

As placas foram incubadas a 25 ± 1 °C, por três dias para a cepa selvagem, *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Şahin et al., 2004). O diâmetro do halo de inibição foi medido diariamente com paquímetro em quatro pontos, e os testes foram realizados em triplicata.

O teste de estabilidade foi realizado utilizando o produto final (ativo incorporado em NCB) nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias. O objetivo foi avaliar a estabilidade do produto e possíveis variações da atividade do ativo, comparando-o com a sua forma pura, sem incorporação. Isso ocorre porque, segundo Nguyen Van Long et al. (2016), OEs são utilizados de forma mais eficiente em alimentos quando encapsulados em sistemas de liberação

adequados. Essa abordagem permite superar limitações relacionadas à dosagem e melhorar a estabilidade biológica dos compostos ativos, potencializando sua eficácia e prolongando sua ação.

Para a análise estatística, a comparação entre cinamaldeído (CIN) e NCB+cinamaldeído (NCIN) foi conduzida por meio do teste T de *Student*, enquanto a comparação entre os diferentes tempos, a cada três dias, foi realizada por meio da ANOVA unifatorial, seguida do teste de Tukey.

4.8 Aplicação em matriz alimentar

Conforme fluxograma apresentado na Figura 1, a aplicação dos ativos em matriz alimentar seguiu uma seleção dos melhores resultados de cada teste. Dessa forma, seis pães foram preparados, sendo dois representando a fase 2, e quatro pães a fase 3. Os pães tinham cerca de 500 ± 30 g cada, e os ingredientes utilizados foram: 288,5 g de farinha de trigo, 5,5 g de leite em pó, 14 g de açúcar, 5 g de sal, 8,5 g de margarina, 85 g de fermento biológico e 170 mL de água morna. O preparo foi realizado sob fluxo laminar para garantir ambiente controlado e condições padronizadas para todas as amostras. A mistura foi processada em máquina de pão, modelo Mondial Master Bread, utilizando a função "rápido", com duração de 1h55min.

Entre os pães preparados, dois foram designados como controle. O primeiro, denominado branco (B), não recebeu ingredientes adicionais, enquanto o segundo (P) foi formulado com a adição de propionato de cálcio na concentração de 0,1%, em conformidade com as diretrizes da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010). O terceiro pão (CR) foi preparado com 7% extrato de cravo, o quarto pão (NCR) recebeu 7% de extrato de cravo incorporado em nanocelulose bacteriana. O quinto pão (CIN) recebeu a adição de 625 μ L de óleo de cinamaldeído. Por fim, o sexto pão (NCIN) foi formulado com 625 μ L de óleo de cinamaldeído incorporado em nanocelulose bacteriana.

Após forneamento, cada pão foi cortado em três fatias com aproximadamente 5 cm de espessura e resfriados ainda sob fluxo laminar. Em seguida, as fatias foram armazenadas em sacos de polietileno previamente esterilizados sob luz UV por 60 minutos. As amostras foram armazenadas em um ambiente fresco, seco, arejado e isento de odores, conforme as orientações presentes nas embalagens de pães comerciais. O monitoramento foi realizado diariamente para avaliar o eventual crescimento fúngico.

A quantidade de extrato de cravo utilizada no estudo está dentro da estimativa da dose diária máxima permitida de eugenol, que é de 2,5 mg/kg, conforme (Valente et al., 2008). Para o cinamaldeído, a referência foi a Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecida em 1967 pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) que fixou o valor de 1,25 mg/kg de peso corporal/dia para o cinamaldeído. Atualmente, não há uma IDA revisada para o composto, e ele não apresenta preocupações significativas de segurança (“Código Monográfico Nome C83 Cinnamomum Cassia”, [S.d.]).

4.9 Teste quantitativo

Para a contagem de crescimento fúngico nas amostras, foi usado um método adaptado de Filipe; Chiu, (2011). O teste foi realizado no 7º, 14º e 21º dia após a fabricação do pão, em triplicata. Inicialmente, uma fatia de pão foi macerada, e 25 g do material foram misturados a 225 mL de água peptonada a 0,1%, constituindo a diluição inicial (10^{-1}). A partir dessa solução, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-2} e 10^{-3} .

De cada diluição, 1 mL foi retirado e inoculado em placas contendo 15 mL de Sabouraud Soft. As placas foram incubadas a 35 ± 1 °C por até 48 horas para o monitoramento do crescimento fúngico.

4.10 Teste de aceitabilidade

O teste de aceitabilidade foi realizado em parceria com o Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial - SENAI Alimentos da Barra Funda – SP. O teste foi conduzido com 100 participantes selecionados aleatoriamente, que foram distribuídos em cabines individuais, a fim de garantir maior imparcialidade nas respostas. Informações sobre idade, frequência de consumo de pães, hábitos alimentares e possíveis alergias ou restrições alimentares foram coletadas (Figura 2A). E cada participante foi instruído a selecionar o termo que melhor representasse sua percepção em relação a cada atributo analisado, utilizando a escala hedônica de 9 pontos, composta pelos seguintes termos: "gostei muitíssimo", "gostei muito", "gostei moderadamente", "gostei ligeiramente", "indiferente", "desgostei ligeiramente", "desgostei moderadamente", "desgostei muito" e "desgostei muitíssimo". Nessa escala, o termo "gostei muitíssimo" equivale ao valor 9, enquanto "desgostei muitíssimo" corresponde ao valor 1. Os participantes avaliaram os atributos aparência, cor, aroma/odor, textura, sabor e aceitação global, conforme ilustrado na Figura 2B.

Figura 2 - Ficha de triagem (2B) e teste de aceitabilidade do produto final (2A)

Nome: _____ Idade: _____ Data: _____

() Feminino () Masculino

Você consome pães?

Sim Não

Se sim, com qual frequência?

Diariamente Até 4x por semana 1x por semana 1x a cada 15 dias

Tem ALERGIA a algum destes componentes?

Glúten, aveia, derivados de cevada e de soja, centeio, derivados de trigo

Amêndoa, amendoim, avelã, castanha-de-caju, castanha-do-brasil, macadâmias, nozes, pecã, pistache

Látex natural, proteínas do leite

Não sou alérgico a nenhum destes itens

Ficha de Avaliação Sensorial Pão de forma

Nome: _____ Idade: _____ Data: ____/____/____

Prove a amostra apresentada e avalie os seguintes atributos marcando com um X a opção que melhor representa sua opinião.

<p>Aparência:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo <p>Aroma/Odor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo <p>Sabor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo 	<p>Cor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo <p>Textura na mastigação:</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo <p>Aceitação global (impressão geral):</p> <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 9 - Gostei muitíssimo <input type="checkbox"/> 8 - Gostei muito <input type="checkbox"/> 7 - Gostei moderadamente <input type="checkbox"/> 6 - Gostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 5 - Indiferente <input type="checkbox"/> 4 - Desgostei ligeiramente <input type="checkbox"/> 3 - Desgostei moderadamente <input type="checkbox"/> 2 - Desgostei muito <input type="checkbox"/> 1 - Desgostei muitíssimo
--	--

Comentários: _____

2A

2B

A interpretação dos dados obtidos foi baseada na Escala de Magnitude Afetiva Rotulada (LAM – *Labeled Affective Magnitude*), na qual os rótulos atribuídos aos extremos da escala proporcionam maior amplitude de expressão sensorial, representando a magnitude hedônica bipolar (Stone; Bleibaum; Thomas, 2021). Seguindo a abordagem proposta por Moskowitz; Dravnieks; Klarman (1976), os valores da escala foram convertidos em números positivos ou negativos, a fim de representar proporções de gosto/desgosto. Assim, as respostas de aceitação foram representadas por valores positivos (notas 7, 8 e 9), as de rejeição por valores negativos (notas 1, 2 e 3), e os valores intermediários (notas 4, 5 e 6) foram considerados como zona neutra. A partir dessa codificação, foi realizada a soma das respostas obtidas para cada categoria, permitindo análise quantitativa mais refinada da percepção dos participantes em relação ao produto (Lim, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização de Nanopartículas

A caracterização das nanopartículas de celulose bacteriana indicou partículas de 18,5 nm de tamanho e concentração de $3,64 \times 10^8$ mL. De acordo com De Amorim et al., (2020), a nanocelulose refere-se a partículas de celulose com pelo menos uma dimensão inferior a 100 nm, podendo ser extraída de fibras naturais de celulose. Esse conceito é corroborado pelos resultados do presente estudo, no qual as partículas produzidas encontram-se dentro dessa escala. Além disso, segundo Soeiro et al. (2021), a hidrólise enzimática é uma alternativa sustentável para a produção de NCB a partir de CB, representando também alternativa eficaz para a obtenção desse material. Ainda de acordo com o estudo, a NCB resultante também pode atuar como solução para prolongar a vida útil de produtos.

Estudo desenvolvido por Rieger; Schiffman, (2014) avaliou o uso de nanofibras de quitosana/poli(óxido de etileno) para incorporação de cinamaldeído (0,5% e 5,0%), utilizando nanofibras de 50 nm, tamanho semelhante ao empregado no presente estudo. Os resultados indicaram melhora na atividade antimicrobiana do óleo de cinamaldeído, reforçando o potencial da nanocelulose como veículo para compostos bioativos.

De acordo com Otoni et al., (2014), a redução do tamanho das gotículas de um óleo essencial melhora suas propriedades antimicrobianas e apresenta implicações significativas para a preservação de alimentos. Isso ocorre porque menores quantidades de conservantes podem ser utilizadas para alcançar a mesma eficiência antimicrobiana, desde que encapsulados em partículas de menor diâmetro.

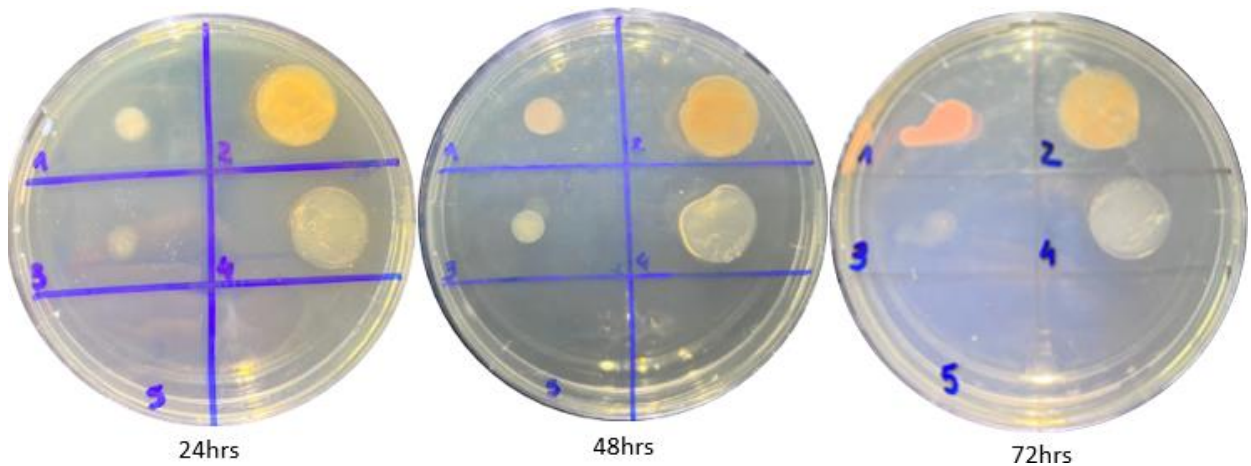
A observação pode ser explicada pela maior biodisponibilidade dos compostos bioativos, que, ao serem encapsulados em gotículas menores, exibem maior relação superfície-volume. Essa característica facilita a penetração das gotículas nas membranas celulares, potencializando a eficácia do ativo (Huang; Yu; Ru, 2010). Assim, o fato da CB estar em nanopartículas pode favorecer a inserção dos ativos, e melhorar a atividade conservante quando aplicado no pão.

5.2 Teste antifúngico piloto com cepa selvagem

Dentre as substâncias testadas, o extrato de cravo apresentou o melhor desempenho antifúngico em comparação aos demais ativos avaliados nesta fase do estudo. Conforme

ilustrado na Figura 2, sua incorporação em NCB e em medalha de CB demonstrou eficácia antifúngica contra a cepa testada. Por esse motivo, o extrato de cravo foi selecionado para incorporação em matriz alimentar.

Figura 3 - Teste antifúngico utilizando cepa selvagem. Poço 1 contém inóculo fúngico e meio de cultura. O poço 2 contém o inóculo e o extrato de cravo incorporado em uma medalha de CB. Poço 3 contém o inóculo e extrato de cravo incorporado em NCB. O poço 4 contém o inóculo e uma medalha de CB, sem incorporação. Poço 5 contém NCB, sem incorporação.



Fonte: próprio autor

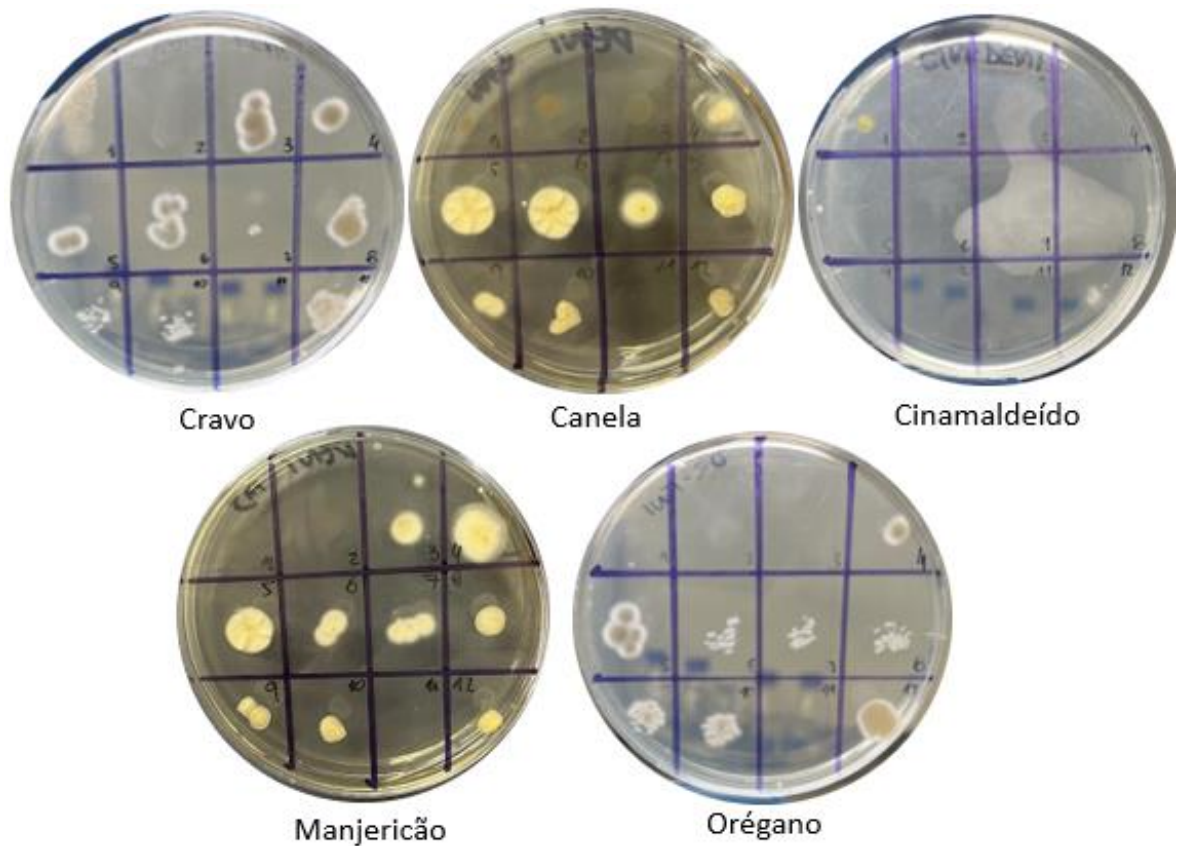
Os resultados obtidos demonstraram a eficácia do extrato de cravo contra a cepa de fungo selvagem testada, o que, segundo Kalemba; Kunicka (2003) podem ser justificados pela composição química do cravo, rica em eugenol. Conforme descrito na literatura, os fenóis — incluindo timol, carvacrol e eugenol — apresentam alta atividade antimicrobiana, atribuída à natureza ácida do grupo hidroxila, que permite a formação de ligações de hidrogênio com centros ativos enzimáticos. Esse mecanismo interfere em processos vitais dos microrganismos, resultando em amplo espectro de ação antifúngica. O cravo, que possui eugenol como seu principal composto, integra esse grupo de óleos essenciais com forte potencial antimicrobiano.

5.3 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados para *Penicillium chrysogenum*, estão reportados na Figura 3. O crescimento do fungo foi observado na concentração de 10% do extrato de cravo e manjerição, e de 5% para os extratos de orégano e canela. O óleo de cinamaldeído não apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM), evidenciando inibição de crescimento do fungo mesmo na menor concentração, que foi de 0,19%.

Os resultados encontrados nesse teste são consistentes com os achados de Sassi et al., (2022), que encontraram maior efetividade antifúngica para OE puro de canela comparado aos OEs puros de manjeriço e cravo, assim como Hossain et al., (2016), que relataram o orégano como melhor resultado de CIM comparado ao manjeriço ao usarem emulsificação dos OEs com Tween 20.

Figura 4 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo *Penicillium chrysogenum*, sendo que o poço 1 contém o respectivo ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.



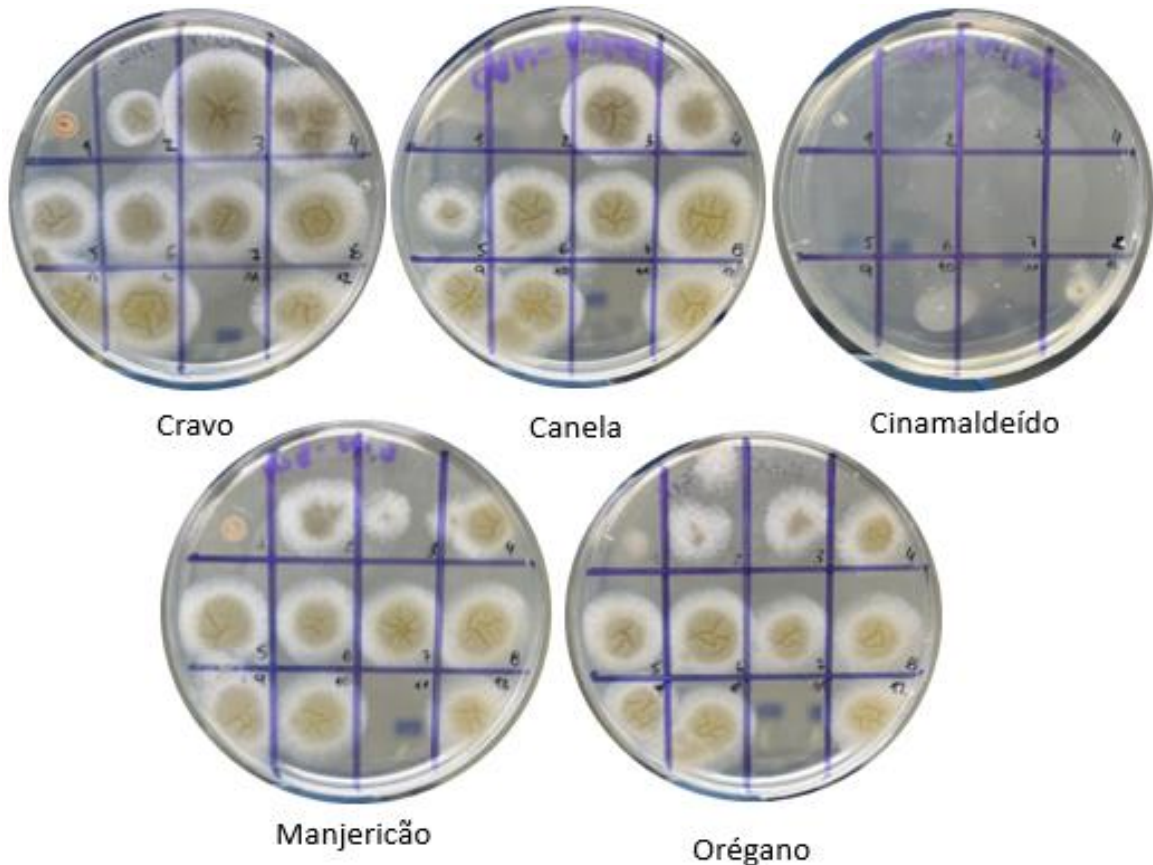
Fonte: próprio autor

Para o fungo *Aspergillus niger*, conforme ilustrado na Figura 4, o seu crescimento ocorreu em concentração superior a 10% para os extratos de cravo, manjeriço e orégano, e de 10% para o extrato de canela. O óleo de cinamaldeído evidenciou inibição de crescimento do fungo mesmo na menor concentração, que foi de 0,19%.

Os resultados encontrados neste estudo para o extrato de manjeriço são consistentes com os de Sassi et al., (2022) — que usou os OEs puros — uma vez que seus resultados de CIM para esse ativo foram melhores para canela em comparação com extratos de cravo, manjeriço e orégano. Já Hossain et al., (2016) — que usou emulsificação de OE com Tween

20 — evidenciaram que canela teve melhor desempenho antifúngico para *Aspergillus niger* em comparação ao manjericão.

Figura 5 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo *Aspergillus niger*, sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.

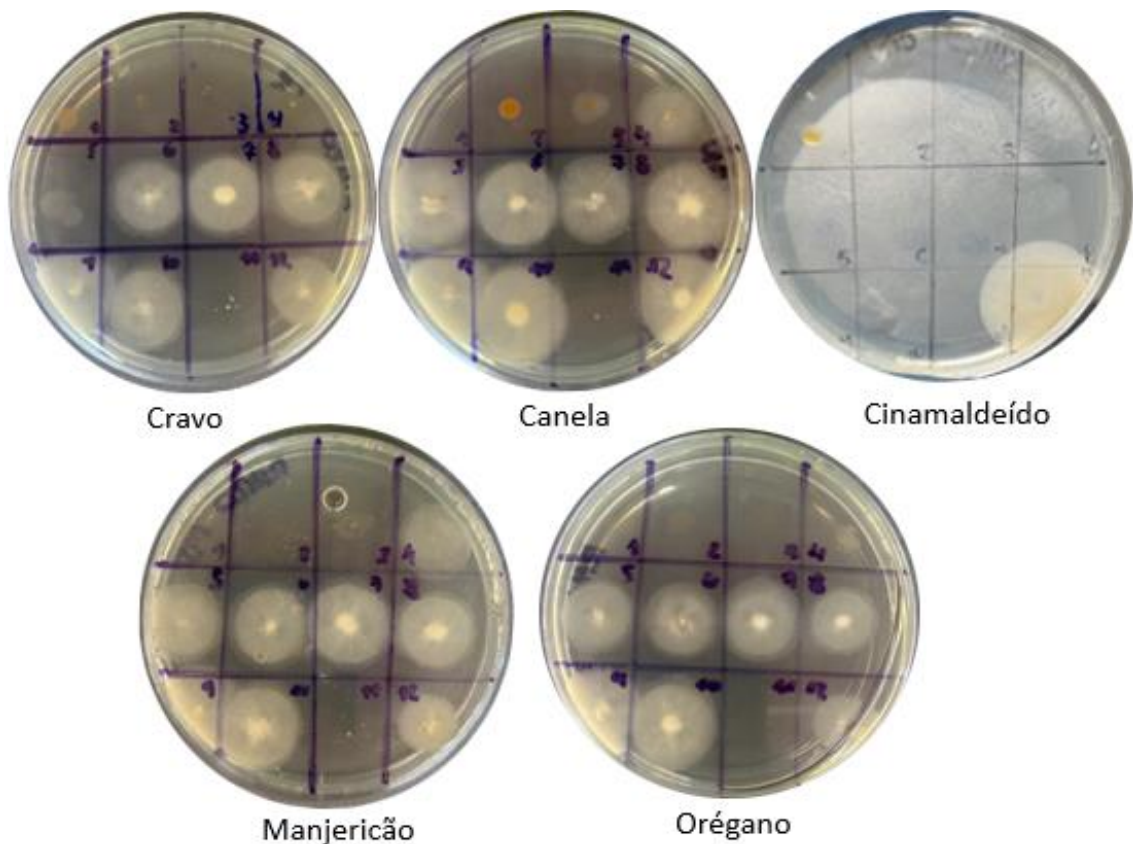


Fonte: próprio autor

Para o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, apresentado na Figura 5, o seu crescimento foi observado em concentração de 5% para extrato de canela e de manjericão, 2,5% para orégano e 1,25% para cravo. O óleo de cinamaldeído não apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM), evidenciando inibição de crescimento do fungo mesmo na menor concentração, que foi de 0,19%.

Este resultado corrobora com o achado de Horváth et al., (2016), que testou OEs diluídos em Tween 40, em concentrações variando entre 0,2 a 25 mg/mL e identificaram que apenas os OEs de cravo, hortelã e tomilho apresentaram atividade inibitória contra *R. microsporus*.

Figura 6 – Concentração Inibitória Mínima para o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*, sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.

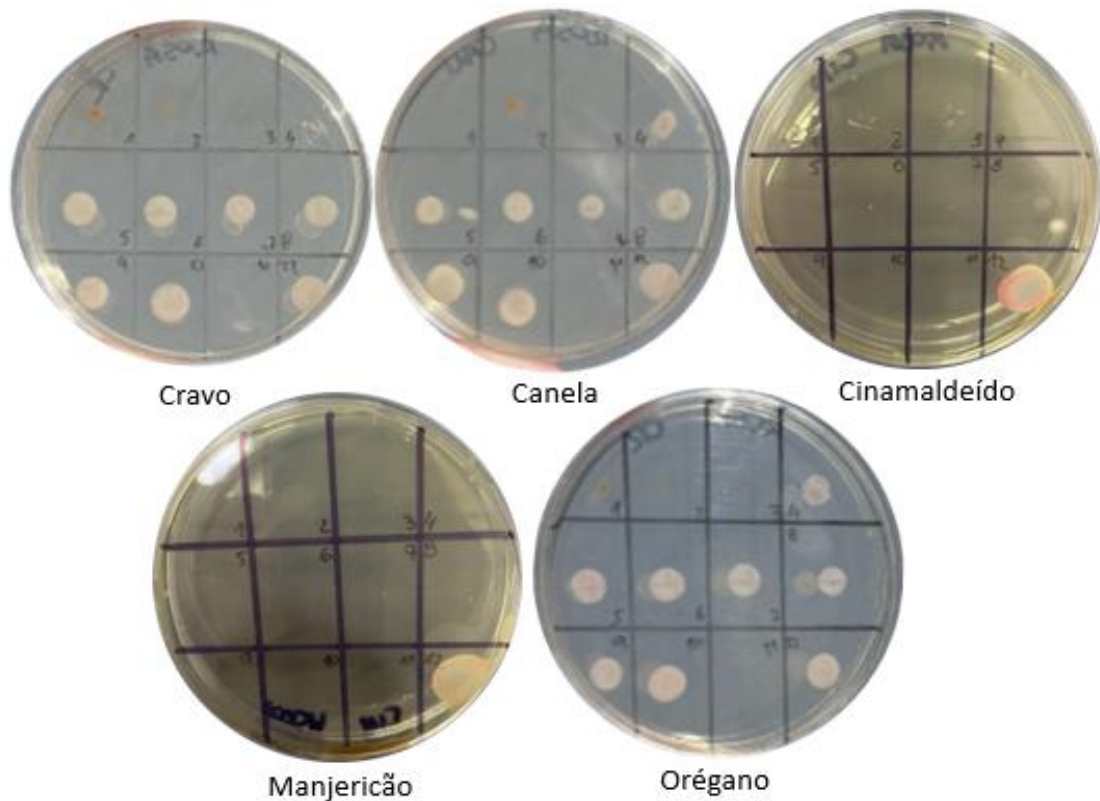


Fonte: próprio autor

O crescimento da cepa selvagem, ilustrado na Figura 6, ocorreu em concentração de 5% para os extratos de orégano e canela, e de 2,5% para o extrato de cravo. O óleo de cinamaldeído evidenciou inibição de crescimento do fungo mesmo na menor concentração, que foi de 0,19%.

Estudo conduzido por Hu et al., (2019) comparou a atividade antifúngica de diferentes OEs em diversas diluições com Tween 80 com diluições entre 800 a 6.25 mg/mL, contra três cepas fúngicas isoladas de pão de trigo mofado. Entre os OEs analisados, o de canela se destacou, apresentando a maior atividade antifúngica, evidenciada pela maior zona de inibição em todas as cepas testadas. Este resultado corrobora os achados do presente estudo, no qual o cinamaldeído, principal composto da canela, demonstrou ser o mais eficaz contra a cepa selvagem avaliada.

Figura 7 – Concentração Inibitória Mínima para cepa de fungo selvagem, sendo que o poço 1 contém o ativo testado e o fungo. O poço 11 representa o controle negativo. O poço 12 representa controle positivo. Os demais poços representam a diluição seriada.



Fonte: próprio autor

Com base nos resultados do teste de CIM, o cravo e a canela se destacaram como antifúngicos mais eficazes contra duas das quatro cepas avaliadas. Assim, eles foram selecionados como para o teste subsequente de formação de halo. Além disso, o cinamaldeído foi selecionado por impedir completamente o crescimento fúngico em todas as cepas avaliadas, sendo eficaz mesmo na menor concentração testada, destacando-se como o composto mais promissor entre os avaliados.

A atividade antifúngica se justifica pois estruturas fenólicas, como o eugenol presente no OE de cravo, demonstram elevada atividade contra microrganismos como *A. flavus*, *A. niger* e *Penicillium sp.*, (Muñoz Castellanos et al., 2020). Essa atividade antifúngica se dá devido à sua capacidade de desnaturar proteínas e interagir com fosfolipídios das membranas celulares, o que altera sua permeabilidade (Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, 2012).

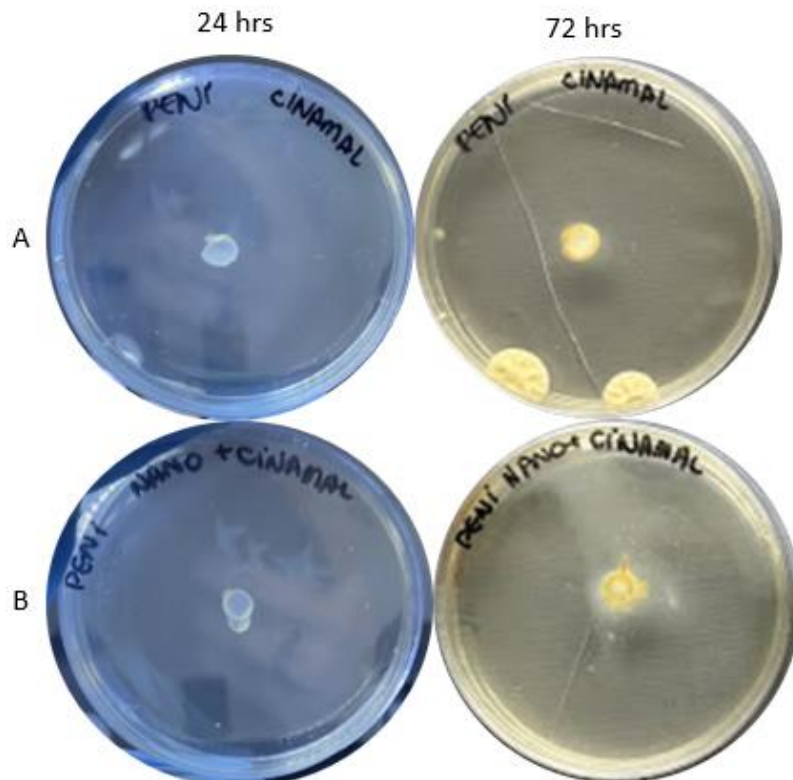
Além disso, Huang et al., (2019) demonstraram que o trans-cinamaldeído exerce sua atividade antifúngica por meio de mecanismo de lesão na membrana. Este composto se dissolve na parte hidrofóbica da membrana citoplasmática, desintegrando a membrana externa

da célula fúngica e, conseqüentemente, induzindo a morte celular, justificando, assim, a alta atividade antifúngica do cinamaldeído com relação às cepas testadas.

5.4 Teste de halo invertido e estabilidade

No teste de halo invertido, em que o inóculo fúngico foi espalhado sobre a superfície do meio de cultura e os ativos foram adicionados no centro da placa, não houve formação de halo de inibição tanto para os ativos cravo e canela, bem como para suas incorporações em NCB, em qualquer das cepas fúngicas testadas (figuras não apresentadas pelo fato de as placas estarem tomadas pelos fungos testados). Por outro lado, o cinamaldeído e o cinamaldeído incorporado em NCB apresentaram formação de halo (ou até inibição total do crescimento do fungo) em todas as cepas de fungos testadas. Na Figura 7 está apresentado o resultado da inibição total do crescimento para o fungo *Penicillium chrysogenum*.

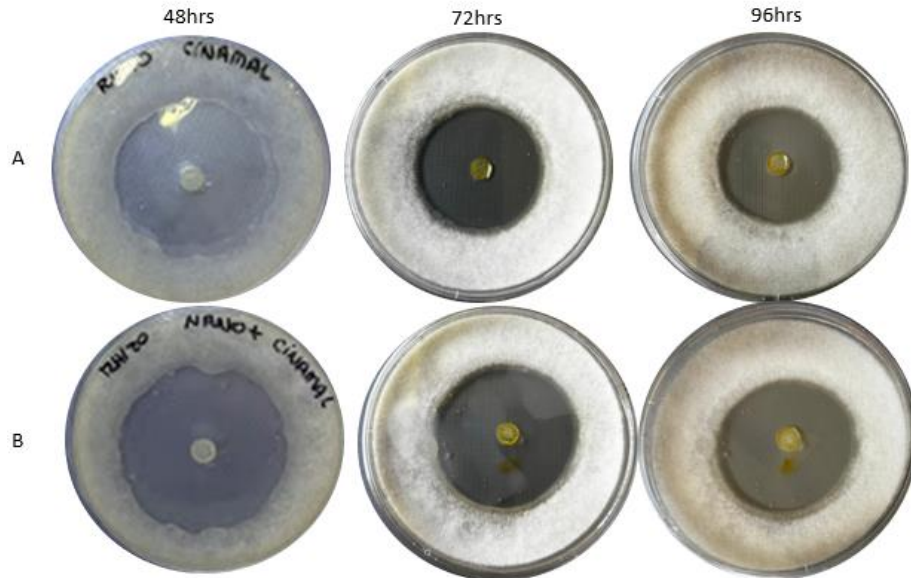
Figura 8 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo *Penicillium chrysogenum* na estabilidade tempo 0 de incorporação.



Fonte: próprio autor

A Figura 8 está apresentando os halos de inibição para o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. É possível observar formação de halo para ambas as apresentações de cinamaldeído.

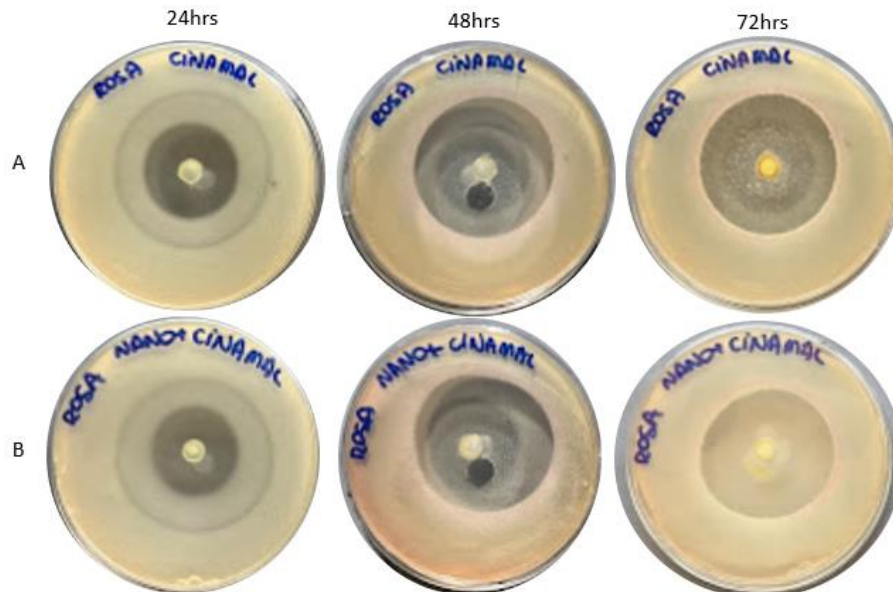
Figura 9 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* na estabilidade tempo 0 de incorporação.



Fonte: próprio autor

A Figura 9 está apresentado os halos de inibição para fungo de cepa selvagem. É possível observar formação de halo para ambas as apresentações de cinamaldeído.

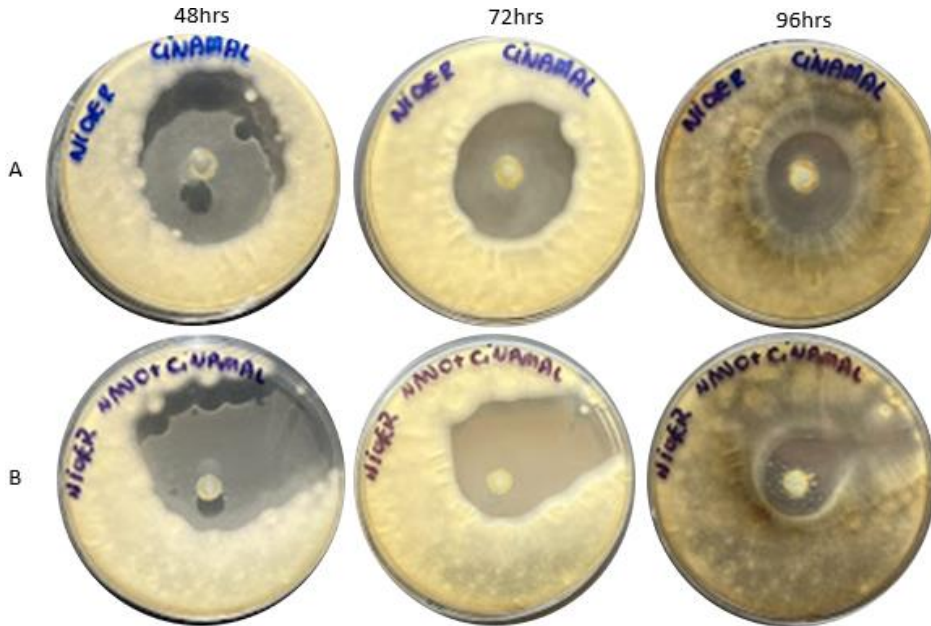
Figura 10 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com cepa selvagem na estabilidade tempo 0 de incorporação.



Fonte: próprio autor

A Figura 10 está apresentando os halos de inibição para o fungo *Aspergillus niger*. É possível observar formação de halo para ambas as apresentações de cinamaldeído. Os dias de observação desse fungo são contabilizados a partir de 48 horas, uma vez que o crescimento só foi detectado a partir desse período.

Figura 11 - Halo invertido com cinamaldeído (linha A) e cinamaldeído incorporado à nanocelulose bacteriana (linha B), com o fungo *Aspergillus niger* na estabilidade tempo 0 de incorporação.



O estudo conduzido por Sassi et al., (2022) avaliou a eficácia de diversos antimicrobianos naturais utilizando CIM, incluindo OEs puros, extratos cítricos e outros derivados naturais, contra cepas fúngicas. Os resultados indicaram que os extratos cítricos e o OE de canela puro foram os mais eficazes contra todas as cepas testadas. Esses achados corroboram os resultados do presente estudo, que demonstrou a formação de halo de inibição apenas com o uso do cinamaldeído — principal componente do OE de canela (Sun et al., 2020) — destacando-o como o composto mais eficaz na inibição do crescimento fúngico.

Da mesma forma Kalemba; Kunicka, (2003) evidenciaram que a atividade dos componentes dos OEs segue a seguinte ordem decrescente: fenóis > aldeídos > cetonas > álcoois > éteres > hidrocarbonetos. Embora o cinamaldeído seja classificado como um aldeído — e, portanto, teoricamente menos ativo que os fenóis —, seu desempenho superior pode ser atribuído à maior concentração da substância pura, o que favorece a formação de halos de inibição mais amplos. Além disso, Kalemba; Kunicka, (2003) também destacaram que extratos com compostos alcoólicos predominantes apresentam atividade antifúngica

ligeiramente inferior, o que justifica a menor eficácia dos extratos de cravo e canela em comparação ao óleo puro de cinamaldeído.

Observou-se efeito inibitório do cinamaldeído sobre o *Penicillium chrysogenum* no teste de halo invertido em todos os períodos que avaliaram a estabilidade do NCIN, o que corrobora os achados Huang et al., (2019) que demonstraram o forte potencial do trans-cinamaldeído em inibir o crescimento micelial de espécies de *Penicillium*, devido à sua capacidade de causar danos à membrana plasmática. Esse efeito pode estar associado à habilidade do composto de se dissolver no domínio hidrofóbico da membrana citoplasmática, promovendo a desestruturação da membrana externa e, conseqüentemente, levando à morte celular.

O cinamaldeído sem incorporação foi avaliado em único tempo de estabilidade, considerando que, por ser de origem comercial e não ter passado por alterações em sua composição, não há expectativa de perda de atividade.

Os resultados da estabilidade da formulação NCIN frente ao fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* estão apresentados na Tabela 1. Os dados revelam que a formulação NCIN e o CIN tiveram a mesma atividade antifúngica logo após a incorporação do cinamaldeído na NCB (tempo 0; $p > 0.05$). Por outro lado, 7 dias após a incorporação houve diminuição significativa de eficácia antifúngica na formulação NCIN. No entanto, o aumento no halo de inibição decorridos 14 dias da incorporação sugere que a formulação passa por uma possível fase de reorganização ou estabilização ao longo desse período. A redução significativa do halo após 21 dias, contudo, indica que a formulação pode ter limites de estabilidade que precisam ser otimizados para garantir ação antimicrobiana mais duradoura.

Os resultados obtidos estão em concordância com os achados de Horváth et al., (2016) que destacaram a resistência das espécies de *Rhizopus* à maioria dos antifúngicos comuns, atribuída à presença de numerosas enzimas hidrolisantes capazes de degradar compostos ativos.

Tabela 1 - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus*. Os dados são apresentados como média do halo de inibição \pm DP (n = 3/grupo) * $p < 0,05$ comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; # $p < 0,05$ comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$ $p < 0,05$ comparado ao mesmo grupo no Dia 2.

Tempo de observação da placa	Cinamaldeído	Nano+Cinamaldeído
Estabilidade tempo 0 de incorporação		
24hrs	49,5 \pm 1,22	50,75 \pm 1,06
48hrs	51 \pm 4,66 [#]	52,5 \pm 1,87

72hrs	48,5±4,41 [#]	43,5±0,47 [#] \$
Estabilidade tempo 7 de incorporação		
24hrs	49,5±1,22	43±2,65 [*]
48hrs	51±4,66 [#]	35,5±0,23 ^{*#}
72hrs	48,5±4,41 [#]	27±2,09 ^{*#} \$
Estabilidade tempo 14 de incorporação		
24hrs	49,5±1,22	50,5±0,40
48hrs	51±4,66 [#]	49±0,81
72hrs	48,5±4,41 [#]	43±0,40 [#] \$
Estabilidade tempo 21 de incorporação		
24hrs	49,5±1,22	42,5±0,23 [*]
48hrs	51±4,66 [#]	40,5±0,40 [*]
72hrs	48,5±4,41 [#]	31,5±0,23 ^{*#} \$

Os resultados da estabilidade da formulação NCIN frente ao fungo *Aspergillus niger* estão reportados na Tabela 2. Os dias de observação desse fungo são contabilizados a partir de 48 horas, uma vez que o crescimento só foi detectado a partir desse período.

Os dados nos mostraram que a incorporação do cinamaldeído em matriz nanoestruturada impacta significativamente sua atividade antimicrobiana ao longo do tempo. Nos tempos iniciais (0 e 7 dias após incorporação), diminuição significativa da atividade antimicrobiana é observada na formulação NCIN em comparação ao CIN. No entanto, a partir de 14 dias de incorporação, a formulação NCIN apresenta melhora na estabilidade, e os halos de inibição se mostram semelhantes aos CIN, sem apresentar diferença estatística.

Esse comportamento sugere que a formulação nanoestruturada pode proporcionar liberação mais prolongada do ativo após um determinado período de estabilização. Entretanto, nos tempos mais longos (21 dias), há indícios de que a degradação do ativo pode comprometer sua eficácia.

Tabela 2 - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo *Aspergillus niger*. Os dados são apresentados como média do halo de inibição ± DP (n = 3/grupo) *p<0,05 comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; #p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 2.

Tempo de observação da placa	Cinamaldeído	Nano+Cinamaldeído
Estabilidade tempo 0 de incorporação		
48hrs	52±2,24	42±2,39 [*]

72hrs	37,5±1,24 [#]	32,5±4,93 [#]
96hrs	25±0,40 [#] \$	21±0 ^{*##} \$
Estabilidade tempo 7 de incorporação		
48hrs	52±2,24	36±0,23 [*]
72hrs	37,5±1,24 [#]	26±0,81 ^{*#}
96hrs	25±0,40 [#] \$	17,5±1,43 ^{*##} \$
Estabilidade tempo 14 de incorporação		
48hrs	52±2,24	47,5±0,70
72hrs	37,5±1,24 [#]	43,5±0,23 [*]
96hrs	25±0,40 [#] \$	43±0,62 ^{*##} \$
Estabilidade tempo 21 de incorporação		
48hrs	52±2,24	41±0,62 [*]
72hrs	37,5±1,24 [#]	32,5±0,40 [*]
96hrs	25±0,40 [#] \$	18,5±0,23 ^{*##} \$

Os resultados mostraram comportamento contrário da formulação nanoestruturada contra a cepa selvagem (Tabela 3). Inicialmente, a formulação proporcionou halos de inibição significativamente maiores, possivelmente devido a uma liberação inicial rápida do ativo encapsulado. Entretanto, à medida que o tempo de incorporação avançou, a atividade antifúngica de NCIN caiu progressivamente, especialmente após 14 dias, indicando instabilidade ou perda gradual da liberação controlada. A leve recuperação observada no tempo 21 sugere possível reorganização estrutural da nanoformulação, mas sem alcançar a eficácia inicial.

Tabela 3 - Teste de estabilidade avaliado pelo halo de inibição (em mm) com fungo de cepa selvagem. Os dados são apresentados como média do halo de inibição ± DP (n = 3/grupo) *p<0,05 comparado a Cinamaldeído no mesmo dia; #p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 1 \$p<0,05 comparado ao mesmo grupo no Dia 2.

Tempo de observação da placa	Cinamaldeído	Nano+Cinamaldeído
Estabilidade tempo 0 de incorporação		
24hrs	42,5±1,64	54±0,47 [*]
48hrs	41,5±1,64	44±1,22 [#]
72hrs	41±1,02	43,5±1,31 [#]
Estabilidade tempo 7 de incorporação		
24hrs	42,5±1,64	54±0,47

48hrs	41,5±1,64	41,5±0,23 [#]
72hrs	41±1,02	39±0,84 [#]
Estabilidade tempo 14 de incorporação		
24hrs	42,5±1,64	32±0,47 [*]
48hrs	41,5±1,64	31,5±0,40 [*]
72hrs	41±1,02	30,5±0,81 ^{*#}
Estabilidade tempo 21 de incorporação		
24hrs	42,5±1,64	40±0,81
48hrs	41,5±1,64	39,5±0,84
72hrs	41±1,02	37,5±0,40 ^{*#}

O estudo de De Fátima Souto Maior et al., (2019) demonstrou que, em testes de difusão em meio sólido, o cinamaldeído a 15% de concentração exerceu inibição significativa e estatisticamente relevante sobre *Candida albicans* em comparação ao controle. Além disso, apresentou comportamento semelhante ao observado nas cepas testadas neste estudo. Os autores também verificaram que concentrações mais elevadas resultaram na formação de halos de inibição maiores, evidenciando resposta dose-dependente ao longo de todos os períodos avaliados (24 e 48 horas, 4 e 7 dias).

Apesar de a estabilidade da nanoformulação não ter seguido um padrão e possivelmente ser um limitante do estudo, é importante ressaltar que a formulação NCIN tem o cinamaldeído incorporado em NCB na proporção 1:1, ou seja, encontra-se na metade da concentração em relação ao cinamaldeído comercial. Assim, mesmo estando o cinamaldeído diluído, a formulação NCIN manteve sua eficácia de inibição, em muitos tempos de estabilidade avaliados, estatisticamente igual ao CIN, o que sugere possível ação sinérgica da NCB com o CIN, ou efeito de proteção e liberação controlada proporcionado pela matriz de nanocelulose.

5.5 Aplicação em matriz alimentar

As fatias de pão de todos os grupos foram monitoradas visualmente e diariamente, e o número de colônias fúngicas observadas em análise macroscópica foi registrado (Tabela 4).

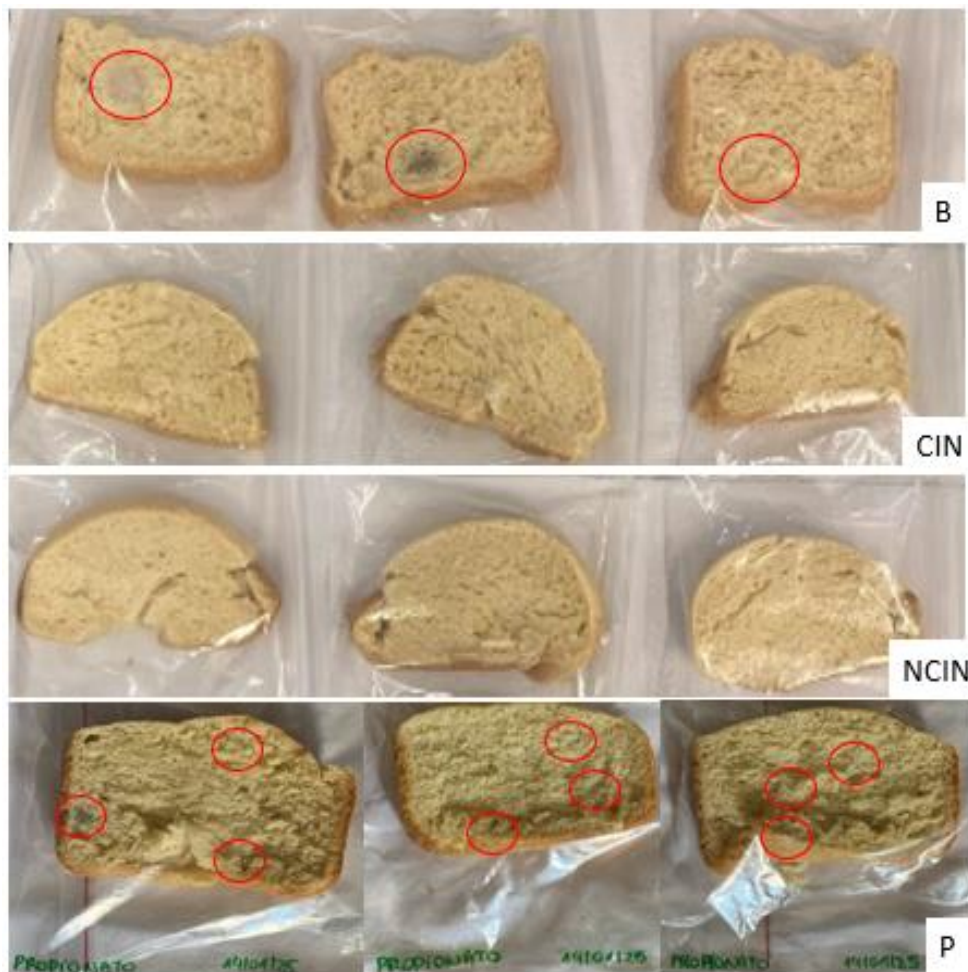
Tabela 4 - Dia de crescimento fúngico de cada amostra e média de colônias observadas visualmente. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3/grupo).

Amostra	Dia do crescimento fúngico	Média de colônias
---------	----------------------------	-------------------

Pão controle branco (B)	5	8,0 ± 0,8
Pão controle propionato (P)	5	3,0 ± 1,9
Pão extrato de cravo (CR)	5	1,0 ± 0,5
Pão nano+extrato de cravo (NCR)	8	1,0 ± 0,5
Pão cinamaldeído (CIN)	-	-
Pão nano+cinamaldeído (NCIN)	-	-

Conforme Figura 11, no 5º dia, o crescimento fúngico foi observado nos pães do grupo branco (B), em todas as amostras da triplicata, com contagem visual de nove, sete e oito colônias. No grupo controle com adição de propionato de cálcio (P), o crescimento fúngico também foi observado no 5º dia, porém com menor número de contagens visuais de colônias (três, sete e três colônias nas três fatias de pão da triplicata). Já as fatias de pão contendo CIN e NCIN não apresentaram crescimento visual fúngico até o 21º dia de conservação.

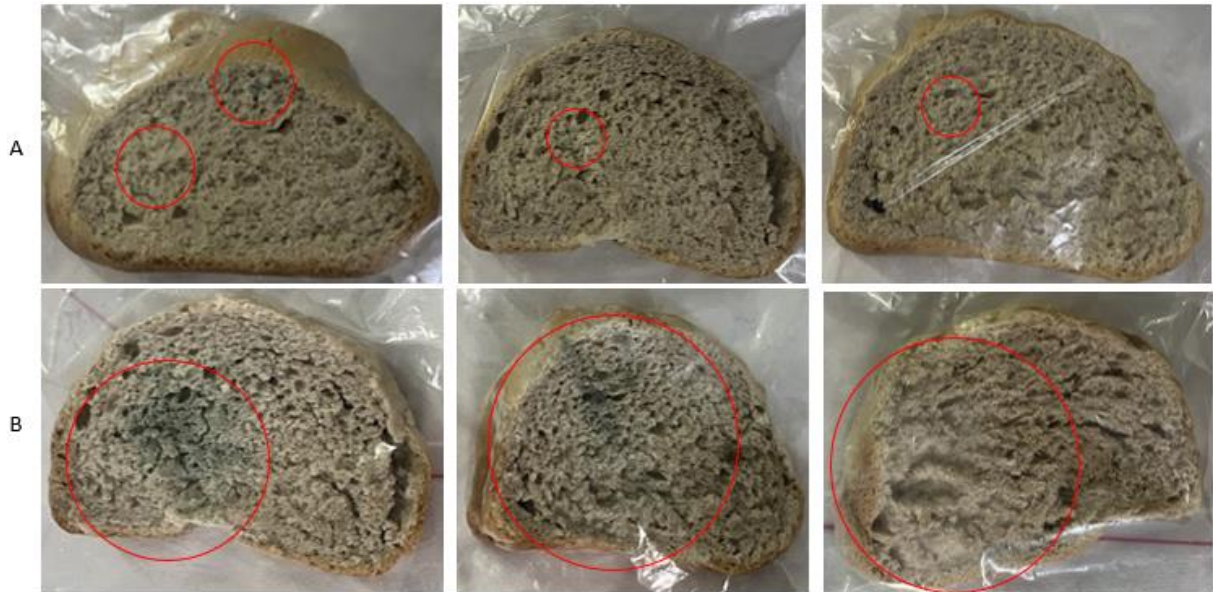
Figura 12 – Registro fotográfico do crescimento fúngico visual observado no quinto dia na triplicata do pão branco (B) e pão controle (P). Sem crescimento nas amostras com CIN e NCIN. Os círculos vermelhos indicam a presença de colônias fúngicas observadas visualmente.



Fonte: próprio autor

As fatias de pão contendo extrato de cravo (CR) tiveram crescimento fúngico no 5º dia, e as fatias contendo extrato de cravo incorporado na NCB (NCR) apresentaram presença visual de fungos no 8º dia, conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 13 – Registro fotográfico dos pães CR (Linha A, em triplicata) no quinto dia e NCR (Linha B, triplicata) no oitavo dia. Os círculos vermelhos indicam a presença de colônias fúngicas observadas visualmente.



Fonte: próprio autor

5.6 Teste quantitativo

Além da avaliação visual, o teste quantitativo de crescimento microbiano foi realizado, visando sempre a segurança alimentar. O resultado do teste quantitativo realizado, no 7º dia mostrou crescimento microbiano apenas no pão branco (B) conforme ilustrado na Figura 13. A contagem das colônias foi realizada, resultando em $2,88 \times 10^5$ UFC/g.

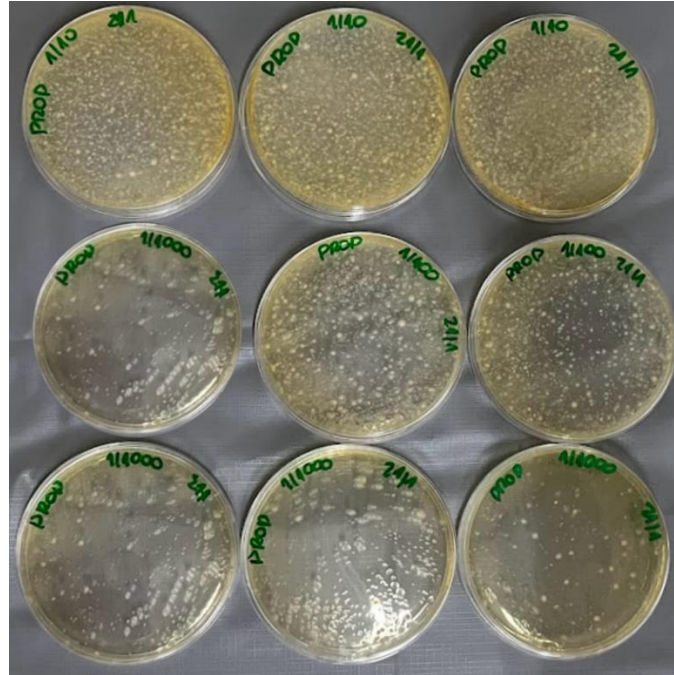
Figura 14 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação da amostra de pão branco (B). Cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).



Fonte: próprio autor

O pão com propionato de cálcio (P) teve contagem de colônias também no 7º dia e obteve resultado de $1,72 \times 10^5$ UFC/g conforme ilustrado na Figura 14. Esses achados demonstram que sua utilização é efetiva na conservação do produto por até sete dias após a produção, quando comparado ao pão controle, sem qualquer conservante.

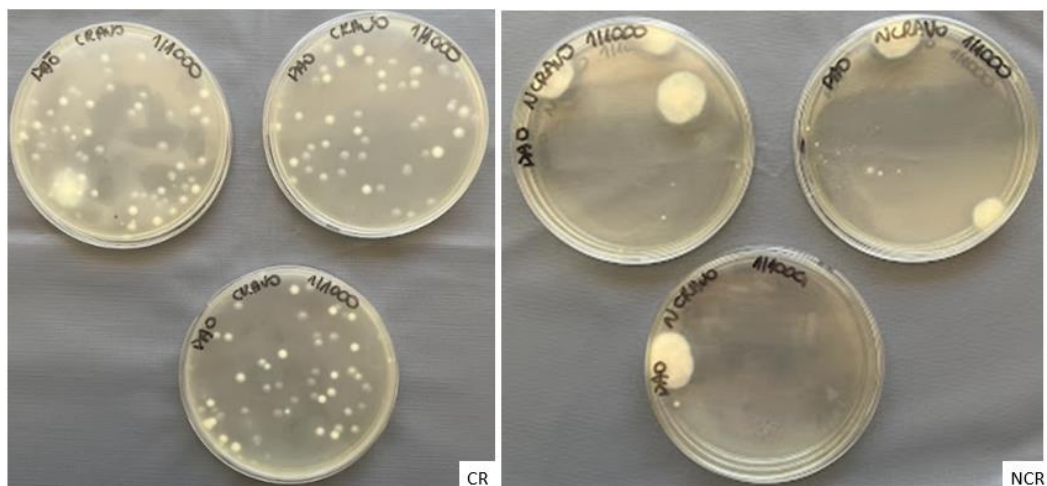
Figura 15 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação da amostra de pão propionato (P). Cada linha representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).



Fonte: próprio autor

Para o pão CR, a contagem quantitativa de colônias, no 7º dia do teste, foi de $7,3 \times 10^4$ UFC/g, enquanto para o pão NCR, a contagem foi de $6,06 \times 10^4$ UFC/g conforme Figura 15.

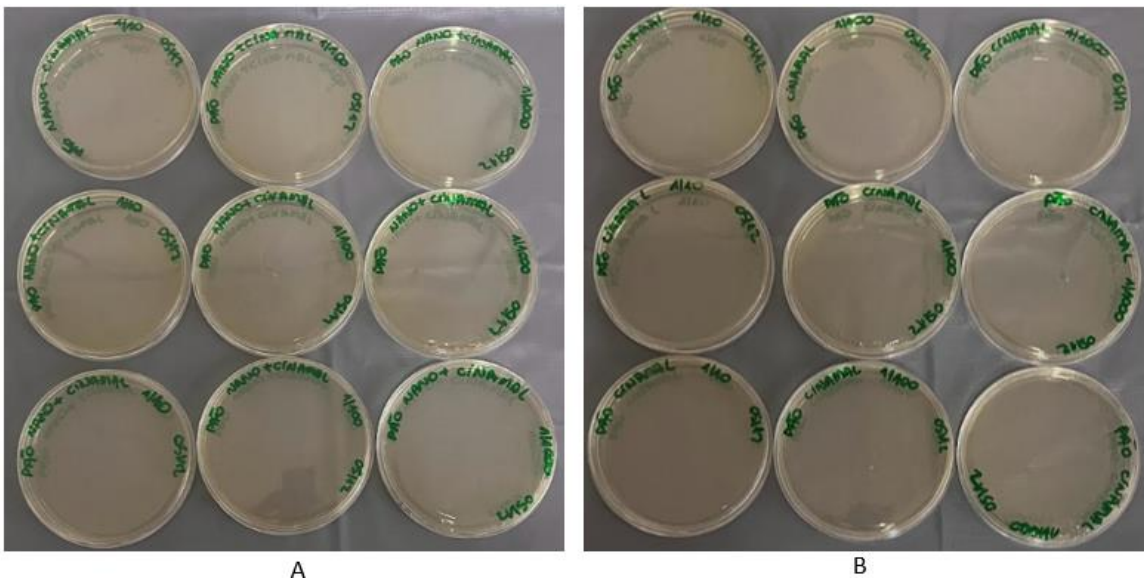
Figura 16 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação do pão CR e NCR em diluição 10^{-3} .



Fonte: próprio autor

Nas demais placas referentes aos pães CIN e NCIN, não foi apresentado qualquer sinal de crescimento fúngico ao longo do período de análise em nenhuma das diluições conforme Figura 16.

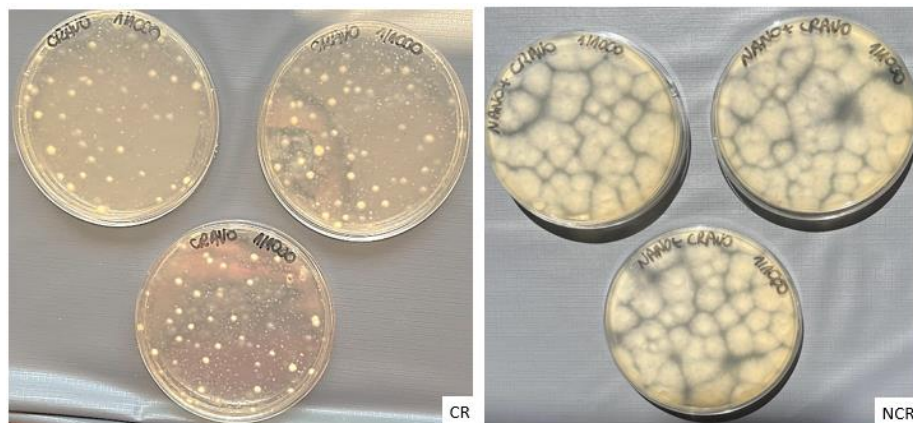
Figura 17 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao sétimo dia de observação do pão NCIN (Figura A) e CIN (Figura B). Em ambas, cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).



Fonte: próprio autor

No 14º dia, foi realizado um novo teste quantitativo, utilizando triplicatas para cada diluição aplicada em placas. Para as amostras de pão branco (B) e com propionato (P), todas as diluições foram incontáveis, excedendo o limite aceitável de ingestão diária. Para o pão CR, a contagem de colônias no 14º dia do teste quantitativo foi incontável, enquanto para o pão NCR, a contagem foi de $4,33 \times 10^4$ UFC/g, conforme ilustrado na Figura 17. Embora as placas de NCR apresentem colônias maiores, a quantidade total de colônias é consideravelmente inferior à observada nas placas de CR.

Figura 18 - Teste quantitativo do crescimento microbiano referente ao 14º dia de observação referente aos pães CR e NCR na diluição 10^{-3} .

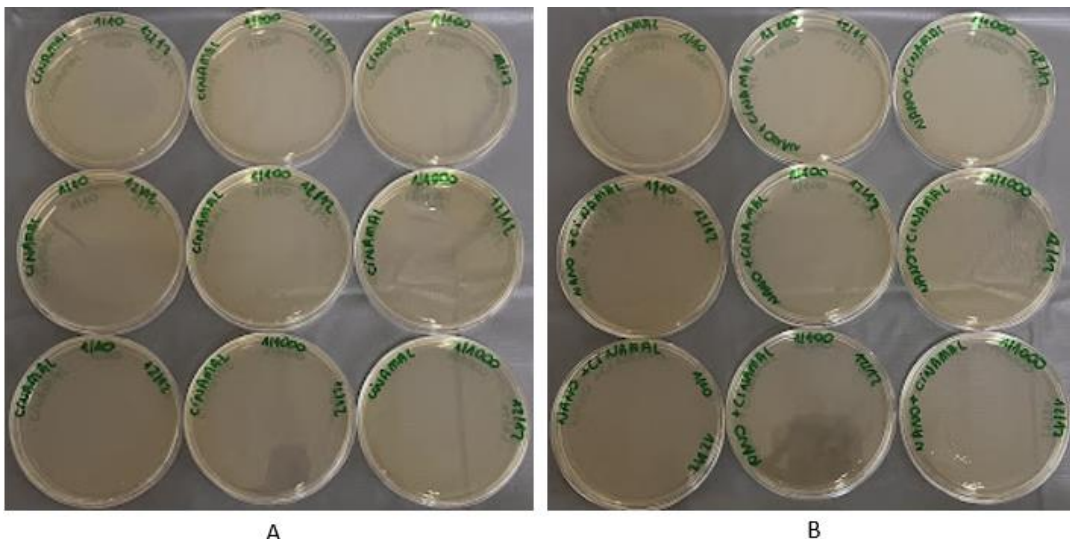


Fonte: próprio autor

Nos testes realizados no 21º dia, as amostras de pães B, P e CR novamente apresentaram placas com contagens incontáveis em suas respectivas diluições. Da mesma forma, o pão NCR também exibiu resultados incontáveis em suas placas de teste. Assim, foi demonstrado que a incorporação do ativo em nanocelulose potencializa sua atividade, corroborando com os achados de Otoni et al. (2014), que avaliou pães tratados com CR e NCR. Eles observaram que os pães tratados com NCR apresentaram resultados mais eficazes na redução da contagem de colônias fúngicas aos 10 e 15 dias, em comparação com os pães tratados apenas com CR.

Para as amostras CIN e NCIN no 21º dia, conforme ilustrado na Figura 18, nenhuma das placas apresentou crescimento fúngico. Esses resultados indicam uma durabilidade de conservação 16 dias superior para os pães submetidos ao tratamento, em comparação com os pães sem tratamento.

Figura 19 - Teste quantitativo do crescimento microbiano dos pães CIN (Figura A) e NCIN (Figura B) referente ao 21º dia de observação. Em ambas, cada coluna representa uma diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} , respectivamente).



A

B

Fonte: próprio autor

De acordo com a Instrução Normativa - IN nº 161, de 1º de julho de 2022 (“IN 161 de 2022”, [S.d.]), e a Resolução RDC nº 724, de 1º de julho de 2022 (“RDC 724 de 2022”, [S.d.]), o limite máximo permitido para bolores e leveduras em produtos de panificação, como bolos, bolachas, biscoitos e outros itens do gênero, sejam eles estáveis ou não à temperatura ambiente, é de 5×10^4 UFC/g. Dessa forma, todas as contagens obtidas para as amostras de pães na contagem de 21 dias ultrapassaram esse limite, com exceção do pão com cinamaldeído (CIN) e do pão com NCB incorporada ao cinamaldeído (NCIN), cujas placas não indicaram presença de colônias fúngicas.

Vale ressaltar que, segundo Silveira, (2019), os pães comerciais costumam apresentar durabilidade média de 21 dias, utilizando-se aplicação de conservantes tanto na massa, quanto na superfície. Sendo assim, o resultado desta forma de aplicação apresenta-se como uma maneira eficiente para aumentar a vida útil do produto.

Os resultados deste estudo indicam que o cinamaldeído é o mais eficaz na inibição do crescimento fúngico em comparação ao óleo essencial de cravo, corroborando com a pesquisa de Ju et al., (2018) sobre sua superior atividade antimicrobiana. A incorporação desses compostos à NCB aumentou a estabilidade e prolongou a vida útil dos pães, especialmente quando se tem metade da concentração do cinamaldeído utilizada na formulação incorporada.

Ainda no estudo conduzido por Ju et al., (2018) que avaliaram o uso de OE de canela para prolongar a vida útil de bolos de feijão verde e bolos crocantes de cidra em embalagens convencionais, a durabilidade observada foi de 9 a 10 dias e 3 a 4 dias, respectivamente. Em contraste, o nosso estudo alcançou um *shelf life* superior a 21 dias, resultado atribuído ao uso de cinamaldeído — composto mais concentrado e ativo que o OE de canela — incorporado diretamente à massa (Sun et al., 2020).

Conforme apresentado na Figura 20, não foram observadas alterações no processo fermentativo do pão contendo nanocelulose incorporada ao cinamaldeído (NCIN), assim como não houve variações significativas no tamanho e na distribuição dos alvéolos nas fatias, em comparação à amostra controle com propionato de cálcio (P), conservante amplamente utilizado pela indústria. A altura média das fatias foi de 8,75 cm para a amostra P e de 9 cm para a amostra NCIN, indicando que a substituição do conservante não comprometeu a estrutura do produto.

Figura 20 – Registro fotográfico da altura das fatias e da morfologia dos alvéolos comparando a amostra controle com propionato de cálcio (P) e a amostra contendo nanocelulose incorporada ao cinamaldeído (NCIN).



Fonte: próprio autor

A figura 20 mostra a fatia do pão produzido com o produto final NCIN, evidenciando que a aplicação do conservante natural conferiu maior *shelf life* ao alimento, alinhando-se a propostas de produção mais sustentável, sem comprometer suas características estruturais e visuais. Esses resultados corroboram os achados de Shreaz et al., (2016), que destacam a importância da encapsulação para garantir atividade antifúngica eficaz, com efeitos colaterais mínimos ou inexistentes.

O óleo de cinamaldeído, comumente encontrado em lojas especializadas em óleos essenciais e produtos de aromaterapia, apresenta um custo superior ao do propionato de cálcio — aproximadamente R\$ 0,74 por quilograma de pão, em comparação aos R\$ 0,03 do conservante sintético (considerando o propionato no valor R\$ 50,00/kg). No entanto, seu uso se destaca pelas vantagens associadas ao apelo natural e à formulação de produtos *clean label*. Além de sua função conservante, o cinamaldeído também oferece propriedades aromáticas e potenciais efeitos antioxidantes, agregando valor funcional ao produto final. Assim, mesmo com um custo mais elevado, o cinamaldeído representa uma alternativa viável para atender a um mercado *premium*, formado por consumidores dispostos a pagar mais por alimentos naturais e sem presença de aditivos sintéticos.

5.7 Teste de aceitabilidade

O teste foi aplicado a 100 participantes selecionados aleatoriamente, sendo 59 mulheres e 41 homens. A média de idade foi de 20,14 anos para o grupo feminino e 30,98 anos para o grupo masculino. A maioria dos participantes relatou consumir pães diariamente, o que reforça a familiaridade do público com o tipo de produto avaliado.

Os resultados obtidos por meio da magnitude hedônica bipolar estão apresentados na Tabela 5. Destaca-se que, no critério de aceitação global — o qual representa de maneira mais abrangente a percepção final do consumidor — a maioria das respostas foi indiferente, superando tanto as avaliações positivas quanto negativas.

Tabela 5 - Resultado da soma da magnitude hedônica bipolar

	Gosto	Indiferente	Desgosto
Aparência	67	29	4
Cor	75	24	1
Aroma/Odor	33	55	12
Textura	37	48	15

Sabor	28	41	31
Aceitação Global	30	51	19

É importante destacar que a maioria dos participantes do teste de aceitabilidade estava na faixa etária de 26 a 30 anos, caracterizando um público predominantemente jovem. Estudos reunidos por Sergi et al., (2017) apontam que esse grupo etário tende a apresentar maior preferência por alimentos com sabor adocicado, enquanto adultos mais velhos, tanto homens quanto mulheres, demonstram preferência por sabores mais salgados.

No que diz respeito às preferências de sabor, o estudo de Barragán et al., (2018), que avaliou diferentes faixas etárias, identificou diferenças estatisticamente significativas. Em especial, o grupo de indivíduos mais velhos (51–80 anos) apresentou classificações de gosto mais baixas para o sabor amargo, sugerindo maior tolerância a esse perfil sensorial em comparação aos participantes mais jovens. Complementando essas evidências, estudos incluídos na revisão qualitativa de Bawajeeh et al., (2020) indicaram que adolescentes relataram menor preferência por alimentos de sabor amargo, enquanto adultos demonstraram maior aceitação e consumo de vegetais com esse perfil gustativo.

Dessa forma, é possível estabelecer uma relação entre os resultados do teste de aceitabilidade conduzido com o produto desenvolvido neste estudo e os dados da literatura. A predominância de respostas "indiferente" nos critérios de sabor e aceitação global pode estar associada ao perfil etário dos participantes, indicando uma possível variação de preferência sensorial relacionada à idade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A eficácia do cinamaldeído foi confirmada tanto nas análises macroscópicas quanto nos testes quantitativos, demonstrando que os pães tratados com esse composto — especialmente quando associado à nanocelulose bacteriana — apresentaram maior resistência ao crescimento fúngico. Além disso, verificou-se que as propriedades estruturais do pão de forma foram preservadas, validando a viabilidade da proposta desenvolvida. Contudo, os resultados do teste de aceitabilidade apontaram uma predominância de respostas indiferentes, especialmente nos critérios de sabor e aceitação global, o que pode limitar a aceitação do produto por um público mais amplo. Esse achado levanta duas possibilidades: direcionar o produto a um nicho de consumidores mais restrito, ou buscar estratégias de mascaramento de sabor, com o objetivo de minimizar o gosto residual do cinamaldeído e ampliar sua aceitação sensorial.

O estudo oferece uma contribuição relevante para o desenvolvimento de soluções mais sustentáveis e seguras, reforçando a viabilidade da substituição de aditivos artificiais por ingredientes naturais com funcionalidade comprovada.

Os achados desta pesquisa abrem caminhos para estudos futuros que visem otimizar a formulação e a aceitabilidade do produto, além de explorar a aplicação da tecnologia desenvolvida em diferentes matrizes alimentares, fortalecendo seu potencial de uso na indústria de alimentos.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, Tankeshwar; HARE, Janelle. Sabouraud Agar and Other Fungal Growth Media. *In: [S.l.: S.n.]*. p. 69–86.

ADAK, Atanu; KHAN, Mojibur R. An insight into gut microbiota and its functionalities. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 3, p. 473–493, 13 fev. 2019.

ANVISA. Regulamento Técnico sobre Aditivos Alimentares Permitidos para Uso em Alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 20 fev. 2025

ASCHEMANN-WITZEL, Jessica; VARELA, Paula; PESCHEL, Anne Odile. Consumers' categorization of food ingredients: Do consumers perceive them as 'clean label' producers expect? An exploration with projective mapping. **Food Quality and Preference**, v. 71, p. 117–128, jan. 2019.

AXEL, Claudia *et al.* Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 239, 2016.

BAI, Long *et al.* Pickering emulsions by combining cellulose nanofibrils and nanocrystals: phase behavior and depletion stabilization. **Green Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1571–1582, 2018.

BARRAGÁN, Rocio *et al.* Bitter, Sweet, Salty, Sour and Umami Taste Perception Decreases with Age: Sex-Specific Analysis, Modulation by Genetic Variants and Taste-Preference Associations in 18 to 80 Year-Old Subjects. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1539, 18 out. 2018.

BAWAJEEH, Areej O. *et al.* Impact of Taste on Food Choices in Adolescence—Systematic Review and Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 12, n. 7, p. 1985, 3 jul. 2020.

BERNARDI, Angélica Olivier *et al.* Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi. **Food Microbiology**, v. 83, p. 59–63, out. 2019.

BOUARAB CHIBANE, Lynda *et al.* Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 4, p. 1457–1474, 15 mar. 2019.

BRASILEIRA, Farmacopeia. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>.

CASALINI, Sara; GIACINTI BASCHETTI, Marco. The use of essential oils in chitosan or cellulose-based materials for the production of active food packaging solutions: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 103, n. 3, p. 1021–1041, 26 fev. 2023.

CASANOVA, Francisca *et al.* Novel Micro- and Nanocellulose-Based Delivery Systems for Liposoluble Compounds. **Nanomaterials**, v. 11, n. 10, p. 2593, 1 out. 2021.

CHALESHTORI, Farhad Sharafati; ARIAN, Ayda; CHALESHTORI, Reza Sharafati. Assessment of sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in some products in Kashan, Iran with estimation of human health risk. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 634–638, out. 2018.

CÓDIGO MONOGRÁFICO NOME C83 CINNAMOMUM CASSIA. . [S.l.: S.n.].

DA SILVA, Juliana Kelly *et al.* Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 882–890, out. 2013.

DARWICHE, Gassan *et al.* Measurements of the gastric emptying rate by use of ultrasonography: studies in humans using bread with added sodium propionate. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 2, p. 254–258, ago. 2001.

DE AMORIM, Julia Didier Pedrosa *et al.* Plant and bacterial nanocellulose: production, properties and applications in medicine, food, cosmetics, electronics and engineering. A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 851–869, 23 maio 2020.

DE FÁTIMA SOUTO MAIOR, Laura *et al.* **Antifungal activity and Shore A hardness of a tissue conditioner incorporated with terpinen-4-ol and cinnamaldehyde.** **Clinical Oral Investigations** Springer Verlag, , 1 jul. 2019.

DE JESUS, J. H. F. *et al.* Thermal behavior of food preservative sorbic acid and its derivatives. **Food Chemistry**, v. 337, p. 127770, fev. 2021.

DEBONNE, Els *et al.* The use of essential oils as natural antifungal preservatives in bread products. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, n. 5, p. 309–318, 3 set. 2018.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Clean label market trends and consumer preferences. *Euromonitor International*, 2023. Disponível em: <https://www.euromonitor.com/>. Acesso em: 20 fev. 2025.

EXAME. Alimentos clean label desenham o futuro da indústria de alimentos. *Exame*, 2021. Disponível em: <https://exame.com/bussola/alimentos-clean-label-desenham-o-futuro-da-industria-de-alimentos/>. Acesso em: 20 fev. 2025

FILIPE, Gustavo; CHIU, Wong. **UNIVERSIDADE FEREDAL DO RIO DE JANEIRO ESCOLA DE QUÍMICA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE PÃES DE FORMA INTEGRAIS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO.** [S.l.: S.n.].

FRANCO, Talita Szlapak *et al.* Nanocellulose and Its Application in the Food Industry. *In*: Basel Switzerland: MDPI, 6 nov. 2023.

GARCIA, Marcelo Valle *et al.* Spoilage fungi in a bread factory in Brazil: Diversity and incidence through the bread-making process. **Food Research International**, v. 126, p. 108593, dez. 2019.

- GAVAHIAN, Mohsen *et al.* Essential oils as natural preservatives for bakery products: Understanding the mechanisms of action, recent findings, and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 2, p. 310–321, 19 jan. 2020.
- GONÇALVES, Nathalia Dias *et al.* Encapsulated thyme (*Thymus vulgaris*) essential oil used as a natural preservative in bakery product. **Food Research International**, v. 96, p. 154–160, 1 jun. 2017.
- GÜLTEKIN, Fatih. Food Additives And Microbiota. **Northern Clinics of Istanbul**, 2019.
- HARO-GONZÁLEZ, José Nabor *et al.* Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 22 out. 2021.
- HORVÁTH, Györgyi *et al.* Effects of essential oil combinations on pathogenic yeasts and moulds. **Acta Biologica Hungarica**, v. 67, n. 2, p. 205–214, 1 jun. 2016.
- HOSSAIN, Farah *et al.* Evidence for synergistic activity of plant-derived essential oils against fungal pathogens of food. **Food Microbiology**, v. 53, p. 24–30, 1 fev. 2016.
- HRNCIROVA, Lucia *et al.* Human gut microbes are susceptible to antimicrobial food additives in vitro. **Folia Microbiologica**, v. 64, n. 4, p. 497–508, 17 jul. 2019.
- HU, Fei *et al.* Comparison of antifungal activity of essential oils from different plants against three fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 134, p. 110821, dez. 2019.
- HUANG, Fei *et al.* Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 490, 24 jan. 2019a.
- HUANG, Fei *et al.* Membrane damage mechanism contributes to inhibition of trans-cinnamaldehyde on *Penicillium italicum* using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 490, 24 jan. 2019b.
- HUANG, Qingrong; YU, Hailong; RU, Qiaomei. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 11 jan. 2010.
- IN 161 de 2022. [S.d.].
- JOZALA, Angela Faustino *et al.* Bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* by employing alternative culture media. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 3, p. 1181–1190, 4 fev. 2015.
- JU, Jian *et al.* Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. **Food Chemistry**, v. 240, p. 850–855, fev. 2018.
- KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813–829, 1 maio 2003.

LEMOS, Jéssica Gonçalves *et al.* Potential of electrolyzed water to inactivate bread and cheese spoilage fungi. **Food Research International**, v. 162, p. 111931, dez. 2022.

LIM, Juyun. Hedonic scaling: A review of methods and theory. **Food Quality and Preference**, jun. 2011.

MALHEIROS, Patrícia S. *et al.* Immobilization of antimicrobial peptides from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a in bacterial cellulose: Structural and functional stabilization. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 17, p. 25–29, set. 2018.

MATAN, N. *et al.* Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, n. 2, p. 180–185, mar. 2006.

MELINI, Valentina; MELINI, Francesca. Strategies to Extend Bread and GF Bread Shelf-Life: From Sourdough to Antimicrobial Active Packaging and Nanotechnology. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 9, 2 fev. 2018.

MOHAMMAD NAZRUL ISLAM BHUIYAN. Constituents of the essential oil from leaves and buds of clove (*Syzigium caryophyllatum* (L.) Alston). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 16, 29 abr. 2012.

MOON, Robert J. *et al.* Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 7, p. 3941, 2011.

MOSKOWITZ, Howard R.; DRAVNIIEKS, Andrew; KLARMAN, Leon A. Odor intensity and pleasantness for a diverse set of odorants. **Perception & Psychophysics**, v. 19, n. 2, p. 122–128, mar. 1976.

MUCHA, Weronika; WITKOWSKA, Dorota. The Applicability of Essential Oils in Different Stages of Production of Animal-Based Foods. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3798, 22 jun. 2021.

MUÑOZ CASTELLANOS, Laila *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Antifungal Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata*) and Pepper (*Piper nigrum* L.) Essential Oils and Functional Extracts Against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus niger* in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–8, 1 maio 2020.

NANASOMBAT, S. *et al.* Combined Effect of Cinnamon Essential Oil and Water Activity on Growth Inhibition of *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus flavus* and Possible Application in Extending the Shelf Life of Bread. In: **Water Properties in Food, Health, Pharmaceutical and Biological Systems: ISOPOW 10**. [S.l.]: Wiley, 2010. p. 545–550.

NGUYEN VAN LONG, N.; JOLY, Catherine; DANTIGNY, Philippe. Active packaging with antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 220, p. 73–90, mar. 2016.

OTONI, Caio G. *et al.* Edible Films from Methylcellulose and Nanoemulsions of Clove Bud (*Syzygium aromaticum*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils as Shelf Life Extenders for Sliced Bread. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5214–5219, 4 jun. 2014.

- PHECHKRAJANG, Chutima Matayatsuk; YOOYONG, Surin. Fast and simple method for semiquantitative determination of calcium propionate in bread samples. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 25, n. 2, p. 254–259, abr. 2017.
- PIPER, Peter. Potential Safety Issues Surrounding the Use of Benzoate Preservatives. **Beverages**, v. 4, n. 2, p. 33, 11 abr. 2018.
- R, Reshmy *et al.* Bacterial nanocellulose: engineering, production, and applications. **Bioengineered**, v. 12, n. 2, p. 11463–11483, 20 dez. 2021.
- RASTOGI, Akanksha *et al.* An Understanding of Bacterial Cellulose and Its Potential Impact on Industrial Applications. *In: Principles and Applications of Fermentation Technology*. [S.l.]: Wiley, 2018. p. 437–458.
- RASTOGI, Akanksha; BANERJEE, Rintu. Statistical optimization of bacterial cellulose production by *Leifsonia soli* and its physico-chemical characterization. **Process Biochemistry**, v. 91, p. 297–302, abr. 2020.
- RDC 724 de 2022. [S.d.].
- REZAEI, Atefe; FATHI, Milad; JAFARI, Seid Mahdi. Nanoencapsulation of hydrophobic and low-soluble food bioactive compounds within different nanocarriers. **Food Hydrocolloids**, v. 88, p. 146–162, mar. 2019.
- RIEGER, Katrina A.; SCHIFFMAN, Jessica D. Electrospinning an essential oil: Cinnamaldehyde enhances the antimicrobial efficacy of chitosan/poly(ethylene oxide) nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 561–568, nov. 2014.
- RINNINELLA, Emanuele *et al.* Food Additives, Gut Microbiota, and Irritable Bowel Syndrome: A Hidden Track. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 23, p. 8816, 27 nov. 2020.
- ŞAHİN, F. *et al.* Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 7, p. 549–557, out. 2004.
- SANTOS SILVA SILVA FIGUEIREDO, Cristiane *et al.* **Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas Cinnamon essential oil (cinnamaldehyde) and its applications**. [S.l.: S.n.].
- SASSI, Ghada *et al.* Development of a natural antifungal formulation for grated cheese and a microencapsulation approach using whey protein isolate and maltodextrin blend. **Journal of Food Science**, v. 87, n. 9, p. 3822–3840, 1 set. 2022.
- SERGI, Giuseppe *et al.* Taste loss in the elderly: Possible implications for dietary habits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 17, p. 3684–3689, 22 nov. 2017.

SHAH, Manzoor Ahmad; BOSCO, Sowriappan John Don; MIR, Shabir Ahmad. **Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products.** *Meat Science* Elsevier BV, , 2014.

SHREAZ, Sheikh *et al.* Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. *Fitoterapia*, v. 112, p. 116–131, jul. 2016.

SILVEIRA, Mariana Pereira. **UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI Programa de Pós-Graduação em Ciência em Ciência e Tecnologia de Alimentos.** [S.l.: S.n.].

SMITH, James P. *et al.* Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products—A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 44, n. 1, p. 19–55, jan. 2004.

SOEIRO, Victória S. *et al.* Production of bacterial cellulose nanocrystals via enzymatic hydrolysis and evaluation of their coating on alginate particles formed by ionotropic gelation. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, v. 2, p. 100155, dez. 2021.

STONE, Herbert; BLEIBAUM, Rebecca N.; THOMAS, Heather A. Measurement. *In: Sensory Evaluation Practices.* [S.l.]: Elsevier, 2021. p. 79–116.

SUEZ, Jotham *et al.* Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature*, v. 514, n. 7521, p. 181–186, 17 out. 2014.

SUN, Qi *et al.* The antifungal effects of cinnamaldehyde against *Aspergillus niger* and its application in bread preservation. *Food Chemistry*, v. 317, 1 jul. 2020.

TAKAHASHI, T.; KOKUBO, R.; SAKAINO, M. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 39, n. 1, p. 60–64, jul. 2004.

TESHOME, Ejigayehu *et al.* Potentials of Natural Preservatives to Enhance Food Safety and Shelf Life: A Review. *The Scientific World Journal*, v. 2022, p. 1–11, 23 set. 2022.

VALENTE, Rômulo *et al.* estudo tox de cravo em roedores - Valente. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, p. 1–4, nov. 2008.

VIRAJ, * *et al.* **SYNERGISTIC ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND CHEMICAL FOOD PRESERVATIVES AGAINST BAKERY SPOILAGE FUNGI**(Online) *An Online International Journal Available at.* [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.cibtech.org/cjm.htm>>.

WANG, Jing; TAVAKOLI, Javad; TANG, Youhong. Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods – A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 219, p. 63–76, set. 2019.

WU, Hao *et al.* Antifungal mechanism of essential oil against foodborne fungi and its application in the preservation of baked food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 64, n. 9, p. 2695–2707, 2 abr. 2024.

XU, Yi-xin *et al.* The food preservative sodium propionate induces hyperglycaemic state and neurological disorder in zebrafish. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 93, p. 107123, set. 2022.