



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

BIANCA NATHÁLIA DA SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia* CHEEL) COMO CONSERVANTE NATURAL EM *BROWNIE* DE CHOCOLATE

RECIFE

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA INDUSTRIAL

BIANCA NATHÁLIA DA SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia* CHEEL) COMO CONSERVANTE NATURAL EM *BROWNIE* DE CHOCOLATE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Química Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho

RECIFE

2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Lima, Bianca Nathália da Silva.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA
(Melaleuca alternifolia CHEEL) COMO CONSERVANTE NATURAL EM
BROWNIE DE CHOCOLATE / Bianca Nathália da Silva Lima. - Recife,
2025.

55 : il., tab.

Orientador(a): Pedro Ferreira de Souza Filho

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Química Industrial -
Bacharelado, 2025.

Inclui referências.

1. Antifúngico natural. 2. Conservação de alimentos. 3. Deterioração
microbiológica de alimentos. 4. Melaleuca alternifolia. 5. Vida útil do produto. I.
Filho, Pedro Ferreira de Souza. (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)

BIANCA NATHÁLIA DA SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia* CHEEL) COMO CONSERVANTE NATURAL EM BROWNIE DE CHOCOLATE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Química Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Química Industrial.

Aprovado em: 09/04/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro Ferreira de Souza Filho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a. Glória Maria Vinhas (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Ma. Carla Fabiana da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe, pela sua infinita paciência, apoio incondicional e amor constante. Sua presença em minha vida é a maior fonte de inspiração e força. Este trabalho é dedicado a você, que sempre acreditou em mim e me incentivou a seguir meus sonhos.

Com todo o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, minha gratidão a Deus por toda força, sabedoria e conhecimento que me guiaram não só durante este curso, mas em todas as fases da minha vida até aqui.

Aos meus pais, em especial a minha mãe, que é o pilar da minha vida, por seu amor incondicional, dedicação e apoio inabalável. Sem você, nada disso seria possível. Cada conquista minha é reflexo do seu amor sacrificial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Ferreira, por sua paciência, orientação e conselhos valiosos. Sua expertise foi fundamental para a realização deste trabalho. Sou imensamente grata por ter compartilhado seu conhecimento.

À minha família, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em cada etapa do caminho, sendo a base de tudo o que sou e do que conquisto.

A Daniel, minha pessoa preferida, por quem eu tenho um amor genuíno.

À minha professora de Química do ensino médio, Ana Maria, por quem eu tenho grande respeito e admiração e não só me inspirou na escolha da minha área de formação e me fez amar o ensino.

Aos meus amigos e colegas, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo apoio, risadas e momentos de tranquilidade em meio à intensidade dessa trajetória. Agradeço por cada palavra de incentivo e por entenderem minha dedicação a esse projeto.

Por fim, deixo meu agradecimento à Universidade Federal de Pernambuco, ao Departamento de Engenharia Química e a todos os docentes da graduação de Química Industrial, com os quais tive o privilégio de adquirir conhecimentos valiosíssimos e pela contribuição individual na minha formação acadêmica e profissional.

“Porque dele, e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”

(Romanos 11:36)

RESUMO

O *brownie* de chocolate é um doce tradicional da culinária dos Estados Unidos, geralmente partido em pequenos pedaços quadrados. Sua produção, feita tradicionalmente com cinco ingredientes – manteiga, chocolate, ovos, açúcar e trigo – pode ser artesanal ou industrial, sendo a última sujeita ao uso de conservantes para garantir a preservação do produto. O uso de conservantes artificiais em alimentos pode trazer riscos à saúde, impactar o meio ambiente e reduzir o valor nutricional, gerando preocupações entre consumidores. À vista disso, este trabalho teve como objetivo investigar a eficácia do óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Cheel) como conservante natural na produção de *brownie* de chocolate. Com o intuito de realizar a análise microbiológica, foram preparadas receitas de *brownie* de chocolate, sendo uma receita tradicional sem adição de óleo essencial de melaleuca e formulações com adição do óleo. As amostras dos *brownies* em diferentes concentrações foram levadas ao laboratório para observação do crescimento de fungos, análise de atividade de água e determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial de melaleuca a fim de evitar surgimento de fungo em *brownie* de chocolate. O óleo essencial de melaleuca apresentou efeito antimicrobiano parcial em volumes de 1,5 mL e 2,0 mL. No entanto, devido à alteração significativa no sabor do *brownie*, seu uso se torna limitado para este fim. Pesquisas futuras sugerem o uso de microencapsulação e nanoemulsificação para melhorar sua eficácia antimicrobiana e reduzir o impacto sensorial, oferecendo alternativas promissoras para conservantes naturais em alimentos.

Palavras-chave: Antifúngico natural; Conservação de alimentos; Deterioração microbiológica de alimentos; *Melaleuca alternifolia*; Vida útil do produto.

ABSTRACT

Chocolate brownie is a traditional dessert from the United States, typically cut into small square pieces. Its preparation, traditionally involving five main ingredients – butter, chocolate, eggs, sugar, and flour – can be either artisanal or industrial. In industrial production, the use of preservatives is common to ensure product shelf life. However, the use of artificial preservatives in food has raised health concerns, potential environmental impacts, and a reduction in nutritional value, prompting consumer apprehension. In this context, the aim of this study was to investigate the efficacy of tea tree essential oil (*Melaleuca alternifolia* Cheel) as a natural preservative in chocolate brownie production. For microbiological analysis, chocolate brownie samples were prepared, including a traditional recipe without tea tree essential oil and formulations with the oil added. The samples with different concentrations were taken to the laboratory for fungal growth observation, water activity analysis, and determination of the minimum inhibitory concentration of tea tree essential oil to prevent fungal development in chocolate brownies. The essential oil demonstrated partial antimicrobial activity at volumes of 1.5 mL and 2.0 mL. However, due to a significant alteration in the brownie's flavor, its use is limited for this purpose. Future research suggests the application of microencapsulation and nanoemulsification techniques to enhance antimicrobial efficacy and reduce sensory impact, offering promising alternatives for natural food preservation.

Keywords: Natural antifungal; Food preservation; Microbiological spoilage; *Melaleuca alternifolia*; Product shelf life.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Planta <i>Melaleuca alternifolia</i>	14
Figura 2 – Representação ilustrativa de um <i>brownie</i>	16
Figura 3 – Esquema de destilação a vapor	24
Figura 4 – Aparelho de destilação Clevenger	25
Figura 5 – Processo de prensagem a fio	26
Figura 6 – Método de extração por enfloração	26
Figura 7 – Principais componentes do óleo essencial de melaleuca.....	27
Figura 8 – Amostra de <i>Brownie</i> de chocolate	31
Figura 9 – Oléo essencial de melaleuca By Samia.....	34
Figura 10 – Amostra controle após 13 dias de armazenamento	39
Figura 11 – Fungo 1 após o primeiro e o segundo repique em meio BDA	40
Figura 12 – Fungo 2 após o primeiro e o segundo repique em meio BDA	40
Figura 13 – Fungo 3 após o primeiro e o segundo repique em meio BDA	41
Figura 14 – Hifas do Fungo 1 vistas após crescimento em câmara úmida.....	42
Figura 15 – Hifas do Fungo 2 vistas após crescimento em câmara úmida.....	42
Figura 16 – Hifas do Fungo 1 vistas após crescimento em câmara úmida.....	43
Figura 17 – Crescimento do Fungo 1 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca.....	44
Figura 18 – Crescimento do Fungo 2 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca.....	44
Figura 19 – Crescimento do Fungo 3 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca.....	45
Figura 20 – Amostras de <i>brownies</i> em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca sem adição de fungo.....	47
Figura 21 - Amostras de <i>brownies</i> inoculados com fungos 1,2 e 3 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca (a, b e c, respectivamente).	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivos específicos	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 BROWNIE DE CHOCOLATE	15
2.2 MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS E DETERIORAÇÃO MICROBIOLÓGICA	16
2.3 ALTERAÇÕES QUÍMICAS E SENSORIAIS PROVOCADAS PELO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS	18
2.4 ADITIVOS ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS	19
2.4.1 Classificação dos aditivos alimentares	20
2.5 CONSERVANTES NATURAIS	20
2.5.1 Sal e Açúcar	21
2.5.2 Ácidos Naturais	21
2.5.3 Especiarias	22
2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS	22
2.6.1 Métodos de Extração dos Óleos Essenciais	23
2.7 ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA	27
2.8 ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA COMO CONSERVANTE	28
3 METODOLOGIA	30
3.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DO BROWNIE	30
3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS	31
3.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE CÂMARA ÚMIDA E OBSERVAÇÃO DOS FUNGOS	33
3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA	33
3.5 PREPARO DO BROWNIE COM ÓLEO ESSENCIAL E ENSAIOS DE DETERIORAÇÃO MICROBIANA	35
3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ÁGUA	38
4.2 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS NAS AMOSTRAS DE BROWNIE (CONTROLE)	39

4.3 OBSERVAÇÃO DOS FUNGOS EM PLACAS DE CÂMARA ÚMIDA.....	41
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA.....	43
4.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO	46
5 CONCLUSÃO	50
6 REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

O chocolate é um dos doces mais consumidos no mundo e ocupa lugar de destaque na indústria de alimentos devido à sua versatilidade e popularidade. De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas (ABICAB), o Brasil produziu, em 2021, 693 mil toneladas desse doce (ABICAB, 2021). Além disso, os produtos feitos a partir do chocolate apresentam importância nutricional - se forem consumidos com moderação – e econômica para a sociedade, cuja comercialização e apresentação variam bastante.

Uma sobremesa feita à base de chocolate é o *brownie*. O produto de origem americana é considerado um tipo de produto de panificação e, como tal, deve seguir as normativas gerais das Boas Práticas de Fabricação estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997, para as indústrias de alimentos, independente do porte, e da Resolução RDC nº 52 de 29 de setembro de 2014, para serviços de alimentação (BRASIL, 1997).

O *brownie* pode desenvolver fungos por vários motivos, geralmente relacionados a condições inadequadas de armazenamento como temperatura, umidade e embalagem, ingredientes contaminados, falhas no processo de produção, contaminação cruzada ou exposição prolongada ao ar (Silva *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a busca por alternativas naturais tem aumentado como reflexo da preocupação com os efeitos dos conservantes artificiais à saúde humana. Dentro dessa perspectiva, o uso de óleos essenciais pode ser uma alternativa na indústria de alimentos devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo capazes de prolongar a vida útil dos alimentos sem comprometer a saúde humana (Burt, 2004). Segundo a Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RDC nº 2, de 12 de janeiro de 2007, entende-se por óleos essenciais produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico como destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado (BRASIL, 2007).

Um dos óleos essenciais mais populares é o óleo essencial de melaleuca, que compreende mais de 250 espécies. A espécie *Melaleuca alternifolia* Cheel (*Myrtaceae*), conhecida popularmente como “*tea tree*”, é uma árvore pequena de até 5 m, de casca fina, semelhante a folhas de papel, folhas afiladas de

aproximadamente 20 mm de comprimento e floresce no verão (Figura 1). É nativa da costa nordeste australiana, região de Nova Gales do Sul, crescendo em regiões pantanosas ou próximas a rios. O óleo essencial de *M. alternifolia* possui comprovada ação antimicrobiana contra bactérias e bolores alteradores e/ou patogênicos (Weterman, 1993, *apud* Silva *et al.*, 2003).

Figura 1 – Planta *Melaleuca alternifolia*



Fonte: Azambuja (2019).

1.1 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho consistiu em investigar o potencial do óleo essencial de melaleuca na conservação de *brownies* de chocolate, visando inibir o desenvolvimento de fungos e, assim, aumentar a vida útil do produto.

1.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a influência do óleo essencial de melaleuca em meio semi-sintético sobre o crescimento de fungos isolados de *brownie* de chocolate;
- Caracterizar as formulações de *brownie* quanto à atividade de água;
- Determinar a concentração ideal de óleo essencial de melaleuca para garantir a eficiência antimicrobiana sem comprometer a qualidade do produto.
- Avaliar a atuação do óleo essencial de melaleuca aplicado ao *brownie*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O objetivo deste capítulo é apresentar o embasamento teórico necessário para a compreensão e desenvolvimento do estudo, abordando conceitos relacionados à microbiologia de alimentos, conservação natural, propriedades dos óleos essenciais, e suas aplicações na preservação de produtos alimentícios, com ênfase em *brownies* de chocolate. Além disso, busca contextualizar o tema a partir de pesquisas científicas e discussões relevantes na área.

2.1 BROWNIE DE CHOCOLATE

O *brownie* é um tipo de bolo caracterizado por sua textura densa e ausência de fermentação, sendo amplamente apreciado por seu elevado teor de chocolate e, frequentemente, pela adição de nozes em sua composição. Sua coloração marrom-escura justifica a nomenclatura "*brownie*", termo derivado da palavra inglesa "*brown*", que significa marrom. Considerado um dos doces assados mais populares nos Estados Unidos, o *brownie* rapidamente conquistou espaço na gastronomia brasileira. Assim como ocorre com diversas preparações culinárias, a origem exata do *brownie* permanece incerta e envolta em especulações. No entanto, indícios históricos sugerem que sua criação remonta ao início do século XX, com relatos apontando para sua possível origem na região da Nova Inglaterra, localizada no nordeste dos Estados Unidos. Uma das narrativas mais difundidas a respeito de sua invenção refere-se a uma dona de casa que, ao preparar um bolo de chocolate, inadvertidamente omitiu o fermento na receita. O resultado foi um bolo de estrutura densa e sem crescimento, que, mesmo assim, foi servido e apreciado (Finarte Alimentos, 2023). Um exemplo pode ser observado na Figura 2, a seguir.

Figura 2 - Representação ilustrativa de um *brownie*



Fonte: BIANCHINI BALAN (2023).

O renomado compêndio gastronômico "Larousse Gastronomique" indica que as primeiras aparições registradas de receitas de *brownie* datam de 1896 e foram encontradas no livro "*The Boston Cooking-School Cook Book*". Apesar da incerteza acerca da identidade de seu criador, é inegável que o *brownie* passou por diversas adaptações ao longo dos anos, especialmente no que diz respeito à concentração de chocolate em sua massa, que se intensificou progressivamente em novas versões da receita. Dessa forma, sua evolução reflete a constante inovação e aprimoramento das preparações culinárias ao longo do tempo (Finarte Alimentos, 2023).

2.2 MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS E DETERIORAÇÃO MICROBIOLÓGICA

A deterioração microbiana dos alimentos continua a ser um desafio global, mesmo com a variedade de técnicas de conservação existentes e a constante busca por melhorias nos processos de produção, armazenamento e distribuição dos alimentos. Os obstáculos enfrentados pela indústria alimentícia se estendem desde o cultivo nas áreas agrícolas até a distribuição em regiões urbanas distantes, alcançando o consumidor final. A complexidade da cadeia de produção exige maior profissionalização do setor, um controle mais rigoroso em todas as fases de produção e uma conscientização do consumidor, a fim de reduzir as possibilidades de contaminação dos alimentos (REDAÇÃO FISPAL, 2023). Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* FAO (2011), aproximadamente 1/3 de todos os alimentos destinados ao consumo humano são perdidos em todo o mundo, o que

equivale a uma quantidade de 1,3 bilhões de toneladas de alimentos desperdiçadas anualmente. As razões para essa alta taxa de desperdício são diversas e os alimentos são descartados ou perdidos durante toda a cadeia de produção, iniciando no campo até o consumidor final (Benítez, 2016).

Os micro-organismos dependem de condições favoráveis para sua multiplicação. As características inerentes aos próprios alimentos têm grande influência no tipo e diversidade microbiana capaz de se desenvolver nos produtos. Essas características são conhecidas como fatores intrínsecos e incluem a atividade de água (a_w), a acidez ou pH, o potencial de oxirredução (Eh), a composição química (presença de nutrientes), a presença de inibidores antimicrobianos naturais e a própria estrutura biológica que pode representar uma barreira à multiplicação microbiana. Já os fatores extrínsecos, relacionados ao ambiente em que o alimento está exposto, também são importantes para multiplicação dos micro-organismos, sendo exemplificados pela temperatura, umidade relativa de equilíbrio e a atmosfera gasosa. Os materiais das embalagens e a exposição à luz também podem influenciar nos processos de deterioração, assim como a qualidade da matéria-prima e dos ingredientes e as condições higiênicas do processamento (Veld, 1996).

Apesar dos diversos fatores que influenciam o crescimento microbiano, os micro-organismos demonstram uma notável capacidade de adaptação, com grupos especializados para se desenvolverem conforme as condições de disponibilidade de água, acidez, composição química, potencial redox e temperatura. Além dessas características, esses micro-organismos são capazes de interagir entre si de maneira tanto benéfica quanto adversa, por meio da produção de metabólitos e moléculas sinalizadoras, impactando os processos de deterioração (Remenant; Jaffres, 2015).

A atividade de água (a_w), quantidade de água disponível para crescimento microbiano e outras funções biológicas como reações enzimáticas e químicas, é um fator crucial na determinação do potencial de deterioração dos alimentos. Há milhares de anos, a humanidade utiliza a desidratação como uma estratégia para prolongar a vida útil de diversos produtos alimentícios. A diminuição da a_w nos alimentos pode ser alcançada por diferentes métodos, como a desidratação térmica (secagem), a desidratação a frio e a vácuo por liofilização, além da adição de solutos como sal ou açúcar, entre outros processos. Dessa forma, alimentos com alta a_w , como os produtos frescos, tendem a se deteriorar mais rapidamente devido à

multiplicação acelerada de bactérias. Cada micro-organismo possui limites específicos de a_w para seu crescimento, incluindo valores mínimos, ideais e máximos. De maneira geral, bactérias deterioradoras não se desenvolvem bem em a_w abaixo de 0,91; as leveduras começam a crescer a partir de 0,88, enquanto os bolores conseguem deteriorar produtos com a_w acima de 0,80 (Herrera; Bolaños; Lutz, 2003)

2.3 ALTERAÇÕES QUÍMICAS E SENSORIAIS PROVOCADAS PELO CRESCIMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

O crescimento de fungos filamentosos pode provocar diversas alterações químicas e sensoriais nos alimentos. Essas mudanças incluem a produção de metabólitos secundários, que podem gerar compostos indesejáveis, como toxinas, além de causar deterioração visível, afetando a textura, cor e sabor dos produtos. Os fungos podem induzir modificações na aparência dos alimentos, causando descoloração, formação de colônias visíveis. Além disso, a produção de metabólitos voláteis pode gerar odores e sabores desagradáveis, tornando o alimento inaceitável para o consumo. A atividade enzimática dos fungos pode degradar os componentes estruturais dos alimentos, como proteínas e carboidratos, promovendo a quebra de macromoléculas e reduzindo a qualidade nutricional. Essas alterações são influenciadas por fatores ambientais, como temperatura, umidade e disponibilidade de nutrientes, que favorecem ou inibem o crescimento fúngico e a intensidade das modificações nos alimentos (Dagnas; Membré, 2013).

Os fungos filamentosos têm a capacidade de crescer em uma ampla gama de valores de a_w , pH e temperaturas, utilizando diversos substratos, como ácidos orgânicos, proteínas, lipídeos e, principalmente, carboidratos. Dessa forma, eles são responsáveis pela deterioração de produtos ácidos, como frutas e sucos, além de alimentos com umidade intermediária, como produtos de panificação, cereais, bebidas e produtos fermentados, ocasionando consideráveis perdas econômicas. Um dos problemas mais frequentes causados pela deterioração de produtos por fungos filamentosos é a presença de micélio, fragmentos de hifas e esporos, que podem ser visíveis ao consumidor, tornando o produto impróprio para consumo. O micélio consiste em um conjunto de hifas com características visuais que podem variar, apresentando-se seco ou úmido, gelatinoso, aveludado e podendo ter

coloração em diferentes tons de verde, cinza, preto, castanho ou amarelo e vermelho (Dagnas; Membré, 2013).

A produção de micotoxinas é outro aspecto muito relevante que resulta do crescimento de fungos filamentosos em alimentos. Existem mais de 400 micotoxinas conhecidas atualmente, sendo as aflatoxinas as mais conhecidas. A produção de micotoxinas pode estar contida no próprio micélio ou excretada no alimento, especialmente alimentos líquidos que facilitam sua difusão. Um grande problema relacionado às micotoxinas é que são normalmente termorresistentes. Dessa forma, a formação de micotoxinas pelos fungos micotoxigênicos deve ser evitada, pelo controle dos parâmetros de armazenamento (Filtenborg; Frisvad; Thrane, 1996).

2.4 ADITIVOS ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS

Desde os tempos antigos, diversas técnicas de conservação têm sido empregadas pela humanidade para manter as características dos alimentos, atendendo à necessidade de sobrevivência durante longos períodos de escassez, com o objetivo de evitar reações como fermentação, oxidação e decomposição dos alimentos. Com a larga produção de alimentos impulsionada pelas indústrias, o uso de conservantes e antioxidantes artificiais tornou-se um ponto importante para evitar alterações e/ou reduzir a deterioração no alimento, além de desperdícios e prejuízo financeiro (Silva, 2019).

De modo geral, os conservantes, sejam naturais ou artificiais, têm como objetivo exercer ação antimicrobiana e antioxidante. A ação antimicrobiana atua reduzindo ou interrompendo a atividade de certos microrganismos, enquanto a ação antioxidante busca retardar ou minimizar a degradação de gorduras e óleos, que, em contato com o oxigênio, podem oxidar, resultando em um sabor rançoso e comprometendo a qualidade do produto (Ramos, 2015).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), entende-se por aditivos qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se, poderá resultar em que

o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento (BRASIL, 2000). A principal discussão sobre o emprego de aditivos na produção de alimentos resulta da controvérsia entre a necessidade e a segurança de seu uso. Embora sob o ponto de vista tecnológico haja benefícios alcançados com a utilização de aditivos alimentares, existe a preocupação constante quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas. Com base em princípios da análise de risco, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece quais são os aditivos permitidos para as diferentes categorias de alimentos e em que funções e limites máximos de uso, visando alcançar o seu efeito tecnológico sem oferecer risco à saúde humana (BRASIL, 2023).

2.4.1 Classificação dos Aditivos Alimentares

Os aditivos podem ter diversas origens e são classificados de maneira geral com base em sua fonte de obtenção, sendo: naturais, extraídos diretamente de fontes naturais; semi-sintéticos, derivados de substâncias naturais por fracionamento ou síntese; e sintéticos. Além disso, os aditivos também podem ser categorizados conforme sua função, como: agentes conservantes (antioxidantes ou antimicrobianos), acidulantes, emulsificantes, espessantes, umectantes, anti-umectantes, corantes, flavorizantes (realçadores de sabor) e edulcorantes (Randhawa; Bahna, 2009).

2.5 CONSERVANTES NATURAIS

Os conservantes naturais têm se tornado cada vez mais relevantes na indústria alimentícia, surgindo como opções aos conservantes sintéticos. Essas substâncias contribuem para aumentar a durabilidade dos alimentos, preservando sua qualidade e segurança. Os conservantes naturais são substâncias de origem vegetal, animal ou mineral, usadas para evitar o crescimento de micro-organismos, a oxidação e outras mudanças que podem comprometer a qualidade dos alimentos. São valorizados por consumidores que buscam opções mais naturais e saudáveis. Exemplos incluem o sal e o açúcar, que preservam os alimentos por osmose, além do vinagre e do limão, comumente usados em casa (REDAÇÃO FISA, 2024).

Entre os conservantes naturais, destacam-se também os bioconservantes, que são micro-organismos benéficos capazes de promover a segurança ao inibir reações causadas por outros micro-organismos considerados patogênicos. Eles apresentam ação antioxidante, contribuem para características sensoriais e nutricionais, além de oferecerem benefícios à saúde. O uso desses bioconservantes auxilia na melhoria dos processos de fabricação de alimentos mais seguros e saudáveis, sem a necessidade de conservantes sintéticos e sem riscos de efeitos negativos para os consumidores (Kourkoutas; Proestos, 2020).

A conservação dos alimentos pode ter o uso de óleos essenciais, extrato de plantas, o uso de quitosana como conservante natural de origem animal e o uso de produtos resultantes de ação microbiana para conservar os alimentos. No geral, existem diversas fontes de conservantes naturais que visam a diminuição na velocidade da ação microbiana e quando usado em conjunto com outros métodos de conservação, visa a melhora da validade do produto (Baptista; Horita; Sant'Ana, 2020).

2.5.1 Sal e Açúcar

O uso de sal e açúcar como métodos de conservação é uma prática antiga que reduz a atividade da água (a_w), dificultando o crescimento de micro-organismos. Em concentrações elevadas, como em salmouras e xaropes, ocorre osmose, fazendo com que a água das células bacterianas migre para o meio, inibindo sua sobrevivência. No entanto, algumas espécies de fungos, leveduras e bolores conseguem se desenvolver mesmo em ambientes com alto teor de sal ou açúcar (Vaclavik; Christian, 2014).

2.5.2 Ácidos Naturais

O ácido atua na conservação ao desnaturar proteínas bacterianas, ajudando a preservar os alimentos, especialmente quando combinado com calor, o que aumenta sua eficácia. Um pH baixo nos alimentos contribui para a conservação, pois dificulta o crescimento de micro-organismos. Ácidos cítrico e málico, encontrados em frutas cítricas e tomate, são conservantes naturais. Para inibir bactérias, o pH deve

ser inferior a 4,0, enquanto leveduras e bolores podem se desenvolver em pH entre 1,6 e 3,0, causando deterioração, mas não intoxicação (Russell; Gould, 2003).

2.5.3 Especiarias

O uso de especiarias é uma alternativa eficiente para conservar alimentos devido à sua ação antioxidante, atribuída à presença de compostos como flavonoides e terpenoides (como timol, carvacrol e eugenol). Especiarias como alecrim, manjerição, orégano, sálvia e tomilho ajudam a evitar a deterioração e podem servir como suplementos. A pimenta-do-reino contém piperina, que estimula a digestão e circulação. O cravo-da-índia (com eugenol), a canela (com aldeído cinâmico) e a noz-moscada (com miristicina) também apresentam efeitos antimicrobianos e aromáticos (Rodrigues; Silva, 2010).

2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais podem ser descritos como compostos voláteis encontrados em certas plantas, geralmente caracterizados por um aroma intenso e resultantes do metabolismo secundário das plantas. Eles são considerados misturas complexas, já que a composição química da maioria dos óleos essenciais inclui diversos derivados de terpenoides ou fenilpropanoides (Amorim, 2007). Os óleos essenciais possuem diversas propriedades farmacológicas, sendo algumas destacadas por oferecerem vantagens significativas em relação a outros medicamentos. Um exemplo é a sua volatilidade, que os torna ideais para aplicação em nebulizações, banhos de imersão ou inalações. A combinação entre a volatilidade e o baixo peso molecular de seus componentes facilita a rápida eliminação do organismo por meio das vias metabólicas (Bandoni; Czepak, 2008).

Os compostos voláteis podem ser extraídos de diversas partes vegetais como raízes, folhas, flores, cascas, sementes e frutos. Independente da sua localização nos vegetais, os voláteis são conhecidos por desempenharem importantes funções biológicas. A composição química dos óleos essenciais pode variar conforme diversos fatores, como localização geográfica, clima, tipo de solo, intensidade de luz solar e volume de precipitação. Essas variações resultam na formação de diferentes quimiotipos, que correspondem a organismos da mesma espécie, subespécie ou

variedade, produzindo metabólitos secundários distintos ou os mesmos metabólitos em proporções variadas (Polatoglu, 2013).

A utilização de óleos essenciais contribui para a atividade antimicrobiana e antioxidante, sendo eficaz mesmo em pequenas quantidades que não alteram as características sensoriais do produto, com a concentração recomendada em torno de 0,1%. A combinação de óleos com especiarias, como cravo e canela, demonstrou efeito bactericida e fungicida. A rancidez, que está entre as principais causas de deterioração lipídica, pode ser controlada com a ação antioxidante e inibitória de micro-organismos proporcionada pela mistura de óleos essenciais (Purkait *et al.*, 2020). As bactérias gram-positivas apresentam maior sensibilidade em comparação às gram-negativas. Os efeitos indesejáveis relacionados às características sensoriais podem ser minimizados por meio de uma seleção mais criteriosa do tipo de óleo e do alimento a ser preservado (Burt, 2004).

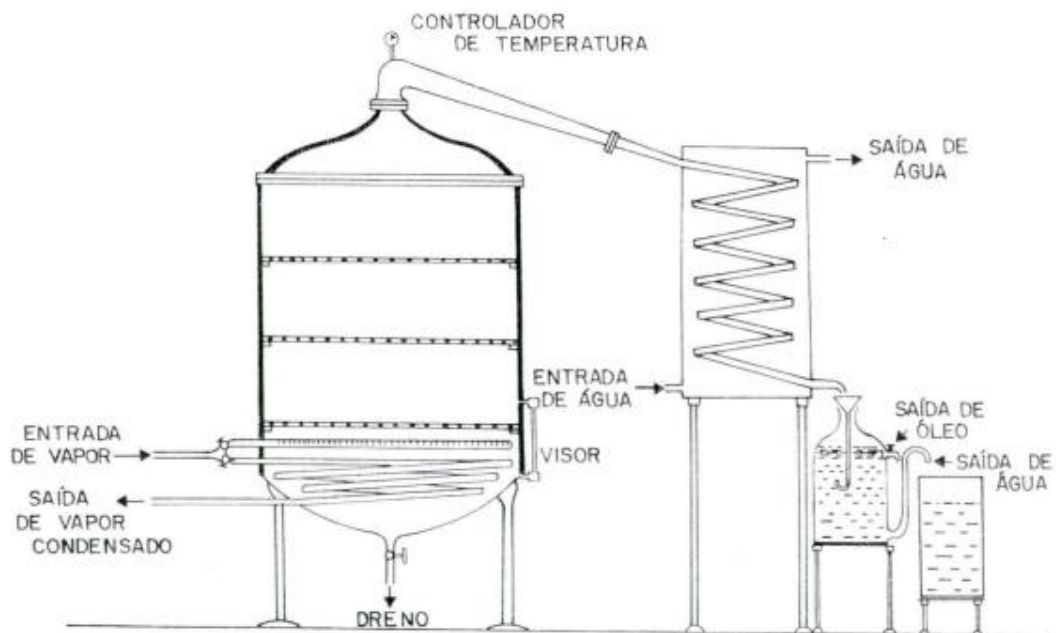
2.6.1 Métodos de Extração dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos de diferentes partes das plantas utilizando diversos métodos, que são selecionados de acordo com a natureza do óleo e o tipo de material vegetal. Entre as principais técnicas empregadas estão a destilação a vapor, a hidrodestilação e a prensagem a frio, que são amplamente usadas devido à sua eficiência na preservação das propriedades aromáticas. Além disso, enfloração e o uso de fluidos supercríticos também são aplicados, especialmente para compostos mais delicados ou de difícil obtenção. O desenvolvimento tecnológico tem contribuído para o aprimoramento dessas técnicas, tornando o processo de extração mais eficiente e com maior rendimento (Borges, 2024).

A destilação a vapor é um método utilizado para extrair óleos essenciais e destilar bebidas alcoólicas, baseado na passagem de vapor gerado por um recipiente através do material orgânico ou líquido a ser processado. Durante o processo, os componentes voláteis, sensíveis à temperatura, são separados por destilação simples e se vaporizam a temperaturas relativamente baixas quando expostos ao vapor dentro da câmara de vapores ou da coluna do alambique. Esse fenômeno possibilita a separação dos óleos essenciais, que têm baixa solubilidade em água em ebulição, das substâncias químicas mais complexas presentes no

material. Quando o vapor atravessa a matéria orgânica, as pequenas cavidades contendo os óleos essenciais se rompem, liberando as moléculas dos óleos sem danificar ou degradar esses compostos sensíveis. O destilado resultante é uma mistura de vapor de água e óleos essenciais, que se condensam no recipiente de resfriamento, permitindo a separação por meio de um processo de coleta, como o uso de um essenciador tipo "leiteira". Além dos óleos essenciais, a destilação a vapor também produz a água floral ou hidrolatos, que são coletados juntamente com os óleos. O processo de destilação é similar ao utilizado na destilação simples, com a diferença de que a separação ocorre por meio do vapor. Este método, além de ser amplamente utilizado na extração de óleos essenciais de plantas aromáticas, que são posteriormente usados para aromatizar licores, também pode ser empregado na destilação de bebidas alcoólicas. Nesse caso, a matéria orgânica fermentada, como o bagaço do vinho, é colocada na coluna do alambique, permitindo a extração de substâncias aromáticas e alcoólicas de forma suave, preservando os sabores e aromas delicados que seriam alterados por temperaturas mais elevadas (Iberian Coppers, 2023). O esquema de destilação a vapor pode ser observado na Figura 3, a seguir.

Figura 3 – Esquema de destilação a vapor



Fonte: KOKETSU & GONÇALVES (1991).

O método de hidrodestilação é um dos métodos mais antigos de extração e, hoje, é usada principalmente em laboratórios para pequenas quantidades, utilizando o aparelho Clevenger. O processo envolve submergir a matéria-prima vegetal na água, permitindo que o óleo essencial evapore com a água em ebulição. Após a condensação, o óleo é separado do hidrolato com base na diferença de densidade (Jakiemiu, 2008). A seguir, é possível observar um aparelho de destilação (Figura 4).

Figura 4 - Aparelho de destilação Clevenger



Fonte: MARCON (2025).

A técnica de prensagem a frio, é uma técnica que envolve a moagem das sementes ou amêndoas e a aplicação de pressão para forçar a liberação do óleo. Utilizam-se prensas de diversos tamanhos, desde pequenas para uso doméstico até grandes comerciais. As sementes são colocadas em um cilindro com uma rosca sem fim que as tritura e comprime, permitindo a extração do óleo, que é então coletado. Embora haja uma geração mínima de calor pela fricção, a temperatura não deve ultrapassar 60 °C para preservar as propriedades naturais do óleo. Esse método garante um óleo 100% puro, embora seja um processo demorado, exigindo cerca de cinco quilos de matéria-prima para produzir um litro de óleo (VITAL ATMAN, 2016). Um exemplo do processo de prensagem a frio pode ser observado na Figura 5, a seguir.

Figura 5 - Processo de prensagem a frio



Fonte: NEVES (2011).

A enfloração ou *enfleurage* é uma técnica milenar que consiste na extração de óleos essenciais com a utilização de gordura vegetal ou animal. Além disso, o processo de extração é menos degradativo, resultando em um óleo essencial com maior valor comercial e empregado principalmente para flores. O processo de *enfleurage* consiste em colocar as pétalas em um recipiente com fundo de vidro, recoberto por uma camada de cera e gorduras vegetais ou animais (Figura 6). Diariamente, as pétalas são substituídas por novas, mais frescas. Com o tempo, a cera absorve os compostos aromáticos das pétalas, formando uma mistura de óleo essencial e gordura. Essa mistura é, então, destilada com álcool para separar o óleo essencial (Silva, 2021).

Figura 6 – Método de extração por enfloração

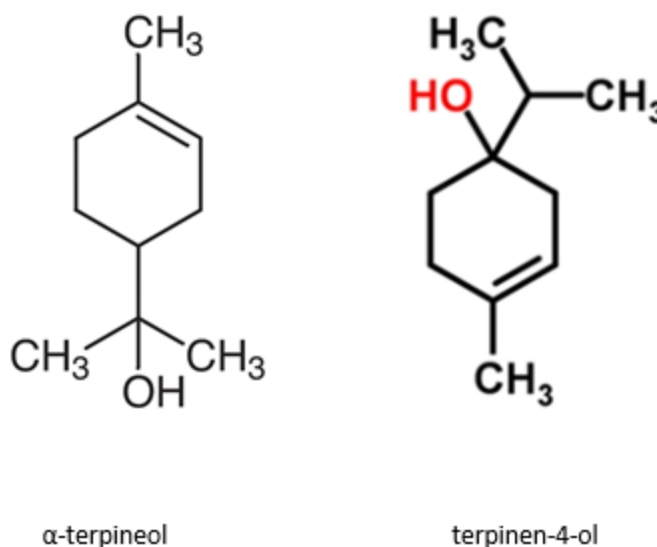


Fonte: AZAMBUJA (2019).

2.7 ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA

O óleo essencial de *tea tree* (melaleuca) é um líquido amarelado, de odor característico, extraído por arraste de vapor das folhas e ramos terminais desta planta. Seu rendimento médio é de 1- 2% em óleo, e, para a extração, costuma-se picotar os galhos e folhas com o intuito de compactar a biomassa (Azambuja, 2019). Dentre os principais componentes do óleo essencial de melaleuca, o terpinen-4-ol e o α -terpineol (Figura 7) foram identificados como compostos antifúngicos capazes de inibir o crescimento do micélio e a germinação dos esporos, sendo os principais contribuintes para a atividade antifúngica do óleo. Esses componentes individualmente mostram um efeito destrutivo na morfologia das hifas, esporos e membrana plasmática (Silva *et al.*, 2024).

Figura 7 – Principais componentes do óleo essencial de melaleuca



Fonte: AZAMBUJA (2019).

Pesquisas revelam que o óleo essencial de melaleuca apresenta-se como inibidor do crescimento de bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e dos fungos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium sp.* (Carson, C.F.; Hammer, K.A.; Riley, T.V, 2006).

2.8 ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA COMO CONSERVANTE EM ALIMENTOS

A utilização dos óleos essenciais (OE) como alternativa de conservação tornou-se bastante empregada nesses últimos tempos, visto que indústrias buscam a possibilidade de reduzir o uso de aditivos químicos aos alimentos, favorecendo o aumento da ingestão dos aditivos naturais de forma mais saudável, posto que são extraídos de plantas medicinais. Alguns OE têm demonstrado importante potencial antioxidante e antimicrobiano para alimentos, atuando no controle do crescimento microbiano (Oliveira *et al.*, 2021).

Martins e Bicas (2024) realizaram uma revisão abrangente sobre a atividade antifúngica de alguns óleos essenciais, incluindo melaleuca, e destacando seus principais compostos bioativos e mecanismos de ação. A pesquisa ressaltou que os óleos essenciais são compostos voláteis e naturais, extraídos de diferentes partes das plantas, como folhas, flores e cascas. Eles possuem propriedades antimicrobianas e antifúngicas significativas, atribuídas principalmente a compostos como terpinen-4-ol, timol, carvacrol e cinamaldeído. O estudo demonstrou que esses compostos bioativos atuam de maneira eficiente contra fungos patogênicos ao desestabilizar a membrana celular, interferir em processos enzimáticos e induzir danos estruturais às hifas e esporos. Por exemplo, o óleo essencial de melaleuca, rico em terpinen-4-ol e α -terpineol, mostrou capacidade de inibir o crescimento de fungos como *Aspergillus niger* e *Botrytis cinerea*, comuns em alimentos perecíveis. A desorganização da membrana celular, a redução da permeabilidade e a perda de conteúdo intracelular foram identificadas como os principais efeitos nos fungos tratados com esses óleos.

A revisão também abordou a relevância de substituir conservantes sintéticos, frequentemente associados a efeitos adversos, por alternativas naturais, como óleos essenciais. Esses compostos são amplamente reconhecidos como seguros para consumo humano (*status* GRAS) e possuem o benefício adicional de oferecer proteção antioxidante aos alimentos. No entanto, os autores destacaram limitações práticas, como a volatilidade dos óleos essenciais, que pode reduzir sua eficácia em aplicações alimentares, além do impacto sensorial em altas concentrações, que pode comprometer a aceitação do consumidor.

Para superar esses desafios, o estudo sugeriu estratégias como a encapsulação e o uso de nanoemulsões, que podem melhorar a estabilidade e a

eficácia antifúngica dos óleos essenciais, além de minimizar os impactos no sabor e no aroma dos alimentos. Outra abordagem discutida foi a combinação de óleos essenciais com outras tecnologias de conservação, como embalagens ativas, para ampliar sua eficácia no controle microbiológico.

Por fim, os autores enfatizaram a necessidade de mais estudos que explorem a aplicação prática de óleos essenciais em diferentes matrizes alimentares, especialmente em produtos complexos, como confeitaria. A pesquisa concluiu que, com o avanço das técnicas de formulação e aplicação, os óleos essenciais têm grande potencial para se tornarem substitutos eficazes e sustentáveis para os conservantes convencionais na indústria alimentícia.

3 METODOLOGIA

A metodologia desta pesquisa foi elaborada com o objetivo de avaliar a eficácia do óleo essencial de melaleuca como conservante natural em *brownies* de chocolate. Para isso, foram definidos procedimentos envolvendo experimentos microbiológicos e a incorporação do óleo essencial na formulação do *brownie*. A seguir, são descritos os métodos, equipamentos, vidrarias, reagentes e procedimentos utilizados para operacionalizar cada etapa do trabalho.

3.1 DESENVOLVIMENTO DA FORMULAÇÃO DO *BROWNIE*

Inicialmente, foi preparada uma receita padrão de *brownie* sem a adição de óleo essencial de melaleuca, a fim de servir como controle no experimento (Figura 8). Esse procedimento permitiu uma comparação eficaz entre os *brownies* com e sem o conservante natural, possibilitando a avaliação do impacto da adição do óleo essencial na qualidade e conservação do produto.

A massa do *brownie* foi obtida por meio da mistura dos ingredientes secos e líquidos, seguindo a ordem tradicional utilizada em receitas de *brownies* para garantir a textura e a estrutura desejadas. Os ingredientes selecionados para a preparação incluíram chocolate meio amargo da marca Garoto (200 g), margarina da marca Deline (45 g), ovos (3 unidades equivalente a 135 g), farinha de trigo da marca Rosa Branca (120 g), açúcar cristal da marca Do Sítio (160 g) e chocolate em pó 70% cacau da marca Mavalério (45 g). Durante o preparo, foram utilizados diversos utensílios para garantir precisão e padronização. Entre eles, uma balança digital para a pesagem exata dos ingredientes, uma batedeira elétrica para facilitar a homogeneização da massa, além de tigelas de vidro e espátulas de silicone para o manuseio seguro dos componentes da receita. A massa foi disposta em forma de alumínio, garantindo um formato uniforme para todas as amostras.

Os *brownies* foram assados em um forno pré-aquecido a 180 °C e permaneceram no forno por um tempo total de 30 minutos, respeitando o tempo necessário para que adquirissem a textura ideal, com uma crosta externa levemente crocante e um interior macio (Figura 8). Após a conclusão do processo de assamento, os *brownies* foram retirados do forno e deixados em temperatura

ambiente até atingirem o resfriamento completo. Uma vez resfriadas, as amostras foram cuidadosamente armazenadas em embalagens apropriadas, que permitiram a observação natural do desenvolvimento de mofos ao longo do tempo. Paralelamente, as amostras foram submetidas a testes de atividade de água, utilizando o medidor de atividade de água Hanna Instruments WA-60A. Esse teste foi essencial para determinar o grau de umidade disponível no produto, fator diretamente relacionado ao crescimento microbiano.

Figura 8 – Amostra de *brownies* de chocolate



Fonte: A autora (2025)

3.2 ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

À medida que os fungos surgiram nas amostras de *brownie* (ao longo de 13 dias), eles foram isolados e inoculados em dois meios de cultura distintos: Czapeck (CZ) e BDA (Batata Dextrose Ágar), um substrato amplamente utilizado para o crescimento de fungos filamentosos. Composto principalmente por batata, dextrose (açúcar) e ágar (um agente solidificante), esse meio oferece nutrientes essenciais que promovem o crescimento vigoroso de uma variedade de microrganismos. O ágar é uma substância natural extraída de algas marinhas vermelhas e fornece a consistência gelatinosa ao meio. A batata fornece nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias e fungos presentes nas amostras biológicas. Já a dextrose serve como fonte de energia para as células que crescem no meio. Um litro

de meio é composto de 4,0 g de infusão de batata, 20,0 g de glicose e 15,0 g de ágar (SP LABOR, 2024). A preparação do meio CZ envolveu a adição dos seguintes componentes: 0,3 g de nitrato de sódio (NaNO_3), 0,1 g de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), 0,05 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,05 g de cloreto de potássio (KCl), 0,001 g de sulfato ferroso (FeSO_4), 3,0 g de sacarose e 2,0 g de ágar. Todos os componentes foram dissolvidos em água destilada, garantindo a homogeneização do meio antes da esterilização.

Em seguida, cada meio de cultura foi distribuído de forma igualitária em três placas de Petri, totalizando seis placas, sendo três contendo o meio CZ e três contendo o meio BDA. Os fungos presentes nas amostras foram então inoculados nesses meios para possibilitar seu crescimento e posterior identificação. Após seis dias de incubação, foi possível observar o desenvolvimento de fungos. Para garantir um cultivo mais específico e isolado de cada tipo de fungo, eles foram repicados em novas placas de Petri contendo exclusivamente o meio BDA, por sete dias. Nesse processo, foram utilizadas três placas para cada tipo de fungo, totalizando nove placas.

Após a diferenciação visual dos fungos isolados, foi realizado um novo repique para garantir a pureza e a manutenção das culturas fúngicas. Esse procedimento consistiu na transferência asséptica dos micro-organismos para novas placas de Petri contendo meio de cultura BDA, utilizando a técnica de estrias para favorecer o crescimento isolado das colônias. Para cada tipo de fungo, foram preparadas três novas placas de Petri. O repique foi conduzido sob condições estéreis para evitar contaminações cruzadas. Com o auxílio de uma alça de inoculação esterilizada, pequenas amostras de cada fungo foram cuidadosamente transferidas e distribuídas em estrias sobre a superfície do meio de cultura, facilitando o crescimento de colônias isoladas e bem definidas.

As placas foram devidamente identificadas de acordo com o tipo de fungo correspondente e incubadas em condições apropriadas para permitir seu desenvolvimento por seis dias. Esse novo repique foi fundamental para garantir a obtenção de culturas puras, facilitando a análise das características morfológicas e possibilitando a continuidade dos testes relacionados à eficácia do óleo essencial de melaleuca como conservante natural.

3.3 PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE CÂMARA ÚMIDA E OBSERVAÇÃO DOS FUNGOS

Após o repique dos fungos para garantir culturas puras, foram preparadas placas de câmara úmida para favorecer o desenvolvimento adequado dos fungos. Foram preparadas três placas de câmara úmida, uma para cada tipo de fungo (Fungo 1, Fungo 2 e Fungo 3).

Cada placa foi montada com uma camada de papel filtro umedecido com água destilada estéril, criando um ambiente úmido ideal para o crescimento das colônias fúngicas. As placas de câmara úmida foram posicionadas dentro da estufa de incubação, à temperatura de 30 °C, para promover as condições ideais de umidade e temperatura. Após sete dias de incubação, foi possível observar o crescimento dos fungos nas placas de câmara úmida. As colônias fúngicas foram analisadas microscopicamente, utilizando um microscópio ótico (Nikon Eclipse E100) para observar detalhes das características morfológicas das colônias, como cor, forma e textura. Essa observação foi essencial para identificar o desenvolvimento dos fungos e comparar as diferenças entre as colônias.

3.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA

Nessa etapa, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de melaleuca, com o objetivo de avaliar sua eficácia antimicrobiana. A avaliação seguiu o procedimento proposto por Ju *et al.* (2018). O meio de cultura utilizado para o crescimento de fungos filamentosos foi o BDA, preparado conforme as instruções do fabricante e esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

O óleo essencial de melaleuca foi adquirido da marca *By Samia* (Figura 9), sendo um produto comercial 100% puro. Para o preparo das soluções, o óleo essencial foi diluído em uma solução estoque apropriada. As vidrarias utilizadas durante a experiência incluíram placas de Petri estéreis, pipetas, ponteiras estéreis e erlenmeyers de 50 mL. Os equipamentos utilizados para a execução do protocolo incluíram a autoclave (Phoenix Luferco), estufa de incubação (Leec Mk II), balança

analítica (Celtac, FA-2104N), microscópio ótico (Nikon Eclipse E100) e medidor de pH (MS Tecnopon Instrumentação, mPA210).

Figura 9 – Óleo essencial de melaleuca



Fonte: BY SAMIA.

Após o preparo e a esterilização do meio BDA, 14 ml de meio fundido a aproximadamente 45 °C foram adicionados a uma placa de Petri contendo 1 mL do óleo essencial diluído em água destilada estéril. O óleo foi diluído apropriadamente para obtenção dos seguintes valores: 50, 25, 12,5, 6,3, 3,2 e 1,7 μL para 14 mL de meio. Para preparar as diluições do óleo essencial, foram utilizados seis erlenmeyers, cada um contendo 6 mL de água estéril. No primeiro erlenmeyer, foi adicionado 300 μL do óleo essencial de melaleuca; no segundo, 125 μL ; no terceiro, 95 μL ; no quarto, 38 μL ; no quinto, 19 μL ; e no sexto, 10 μL de óleo essencial. Cada uma dessas soluções foi então pipetada, com 1 mL de cada concentração sendo transferido para 6 placas de Petri, totalizando 6 repetições para cada concentração do óleo essencial.

Com o auxílio de uma alça, uma amostra de cada fungo inicialmente isolado do *brownie* foi transferido para o centro de cada placa de Petri, que continha os 14 mL do meio de cultura com as diferentes concentrações do óleo essencial. As placas foram então incubadas a 30 °C por sete dias.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir completamente o crescimento fúngico, observada pela ausência de crescimento visível nas placas de Petri. Após a determinação da CIM, foram produzidas quatro receitas de *brownie* utilizando

diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca estabelecidas como eficazes.

3.5 PREPARO DO *BROWNIE* COM ÓLEO ESSENCIAL E ENSAIOS DE DETERIORAÇÃO MICROBIANA

Para avaliar a eficácia do óleo essencial de melaleuca como conservante natural em *brownies* de chocolate, foram preparadas quatro formulações de *brownie*, diferenciadas pela concentração de óleo essencial incorporada à massa. O objetivo dessa etapa foi comparar a qualidade e a conservação dos *brownies*, considerando o efeito antimicrobiano do óleo essencial em diferentes concentrações. Inicialmente, foi utilizada a mesma receita padrão de *brownie* descrita na seção 3.1, com os mesmos ingredientes e proporções, sendo a única variação a quantidade de óleo essencial de melaleuca adicionada. Os volumes de óleo essencial testados foram 0 mL (controle), 1,5 mL, 2,0 mL e 2,5 mL.

As amostras foram cuidadosamente armazenadas em embalagens apropriadas para posterior avaliação da conservação. Cada amostra foi identificada de acordo com a concentração de óleo essencial utilizada para facilitar a análise comparativa dos resultados microbiológicos e de conservação. Paralelamente, foi realizada a medição da atividade de água de cada amostra utilizando o medidor de atividade de água Hanna Instruments WA-60A, a fim de determinar o grau de umidade disponível no produto e sua relação com o crescimento microbiano.

Esse procedimento foi essencial para permitir a análise detalhada do impacto do óleo essencial de melaleuca sobre a conservação dos *brownies*, possibilitando a comparação entre as diferentes concentrações e a amostra controle (sem adição de óleo essencial).

3.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

Para avaliar a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca nas formulações de *brownie*, foi realizado um teste de avaliação do potencial antifúngico, que tem como objetivo final determinar a resistência de um produto ou material à contaminação microbiana, refletindo diretamente a eficácia do sistema conservante. Através deste teste é possível verificar se a dosagem de conservante está adequada

ao produto final, e se o produto está apto a resistir às intempéries na qual será submetida, durante o período de validade do produto (ABIHPEC, 2015). Assim, foi possível determinar capacidade inibitória do óleo essencial frente ao crescimento de diferentes tipos de fungos filamentosos previamente isolados das amostras de *brownie*, além de analisar o impacto do óleo essencial na estabilidade e conservação do produto.

Inicialmente, todas as amostras de *brownie* foram individualmente pesadas utilizando uma balança analítica (Celtac, FA-2104N) para garantir a padronização dos resultados. Foram utilizadas quatro formulações de *brownie* contendo diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca: 0 mL (controle), 1,5 mL, 2,0 mL e 2,5 mL. Para cada concentração, foram preparadas 4 amostras: três submetidas à inoculação de fungos e outra mantida sem a presença de fungos, totalizando doze amostras para o teste de desafio.

O teste de desafio consistiu na inoculação de três tipos de fungos filamentosos, identificados como Fungo 1, Fungo 2 e Fungo 3. Os fungos foram cultivados previamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubados até o desenvolvimento completo das colônias. Para a preparação da suspensão fúngica, foi adicionada uma alíquota de água estéril sobre a superfície de cada colônia de fungo. Em seguida, com o auxílio de uma espátula esterilizada, os fungos foram raspados cuidadosamente para permitir a homogeneização com a água, formando uma suspensão fúngica.

Cada suspensão de fungo foi cuidadosamente transferida para as amostras de *brownie* utilizando uma pipeta estéril. Os três tipos de fungos (Fungo 1, Fungo 2 e Fungo 3) foram inoculados separadamente em todas as amostras de *brownie*, independentemente da concentração de óleo essencial utilizada. Ou seja, cada tipo de fungo foi depositado nos *brownies* contendo 0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL e 2,5 mL de óleo essencial de melaleuca. Além das amostras inoculadas, foi mantida uma amostra de *brownie* para cada concentração de óleo essencial sem a adição de fungos, servindo como controle negativo. Esse procedimento permitiu a análise comparativa entre o crescimento fúngico nas amostras contaminadas e o comportamento das amostras sem contaminação direta, avaliando o efeito conservante do óleo essencial em condições naturais de armazenamento.

Após a inoculação, todas as amostras foram armazenadas em placas de Petri estéreis e incubadas a 30 °C por sete dias em uma estufa de incubação (Leec Mk II). Durante o período de incubação, as amostras foram monitoradas diariamente para observar o desenvolvimento de colônias fúngicas na superfície dos *brownies*.

O crescimento fúngico foi avaliado visualmente e registrado por meio de fotografias digitais para documentar o efeito inibitório do óleo essencial de melaleuca em diferentes concentrações. A eficácia antimicrobiana foi determinada com base na ausência ou redução do crescimento fúngico nas amostras inoculadas, comparando os resultados com o grupo controle (sem óleo essencial).

Esse teste foi essencial para determinar a capacidade de preservação do óleo essencial de melaleuca em matrizes alimentares, fornecendo dados objetivos sobre sua ação antimicrobiana em *brownies* de chocolate submetidos a desafios microbiológicos específicos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção, são apresentados de maneira mais detalhada os resultados obtidos a partir das atividades desenvolvidas durante o experimento. Os dados são organizados de forma a fornecer uma análise clara e objetiva sobre a eficácia do óleo essencial de melaleuca como conservante natural nos *brownies* de chocolate. A seguir, serão discutidos os resultados das análises microbiológicas, a avaliação do crescimento fúngico nas amostras, os testes de atividade de água, bem como a observação do desenvolvimento das colônias fúngicas nas amostras de *brownie* com diferentes concentrações do óleo essencial.

4.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE ÁGUA

Os valores obtidos de atividade de água para os *brownies* preparados com diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Análise da atividade de água.

Composição	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média	Desvio Padrão
Sem óleo essencial (Controle)	0,70	0,72	0,73	0,72	0,02
0 ml de óleo essencial	0,70	0,71	0,71	0,71	0,01
1,5 ml de óleo essencial	0,70	0,72	0,71	0,71	0,01
2,0 ml de óleo essencial	0,70	0,73	0,71	0,71	0,02
2,5 ml de óleo essencial	0,71	0,72	0,72	0,72	0,01

Fonte: A Autora (2025)

Para a amostra de controle, sem a adição de óleo essencial, os valores indicam uma atividade de água relativamente alta, o que pode ter favorecido o crescimento microbiano, como observado no desenvolvimento de fungos nas amostras de controle. Os resultados indicam que, em geral, a adição de óleo essencial de melaleuca não provocou mudanças significativas na atividade de água das amostras de *brownie*. No entanto, as variações observadas entre as concentrações de óleo essencial podem sugerir um pequeno impacto do óleo na

retenção de umidade do produto, com a amostra de controle (sem óleo) apresentando uma atividade de água ligeiramente mais alta, embora as diferenças entre as amostras com óleo essencial não tenham sido estatisticamente significativas.

4.2 INOCULAÇÃO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS NAS AMOSTRAS DE *BROWNIE* (CONTROLE)

Na amostra de *brownie* sem adição de óleo essencial de melaleuca (controle), foi possível observar o crescimento natural dos fungos após treze dias de armazenamento, conforme foi informado no item 3.2, sendo possível observar na Figura 10, a seguir.

Figura 10 – Amostra controle após 13 dias de armazenamento.



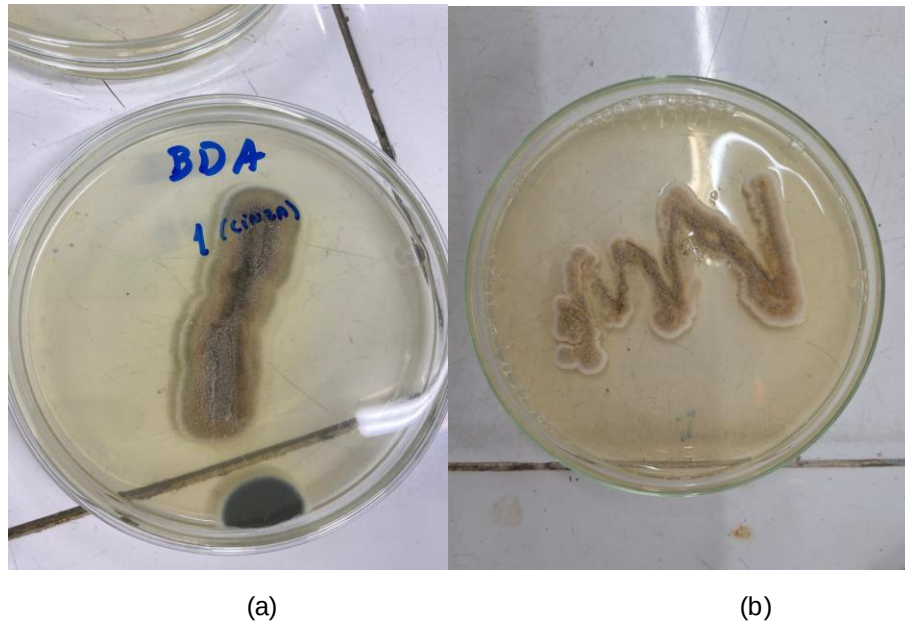
Fonte: A autora (2025).

A inoculação dos fungos filamentosos resultou em três tipos distintos de crescimento, os quais foram diferenciados visualmente por suas colorações e texturas após 6 dias de incubação para o primeiro repique e depois mais seis dias de incubação para o segundo repique.

Fungo 1: Apresentou um crescimento filamentoso com bordas bem definidas. A coloração das colônias era predominantemente cinza-escuro no centro, com uma transição gradual para tons mais claros nas bordas. A extremidade da colônia exibiu uma área mais escura, indicando uma possível esporulação intensa, característica

de algumas espécies de fungos filamentosos. Os repiques do fungo 1 podem ser observados na Figura 11, a seguir.

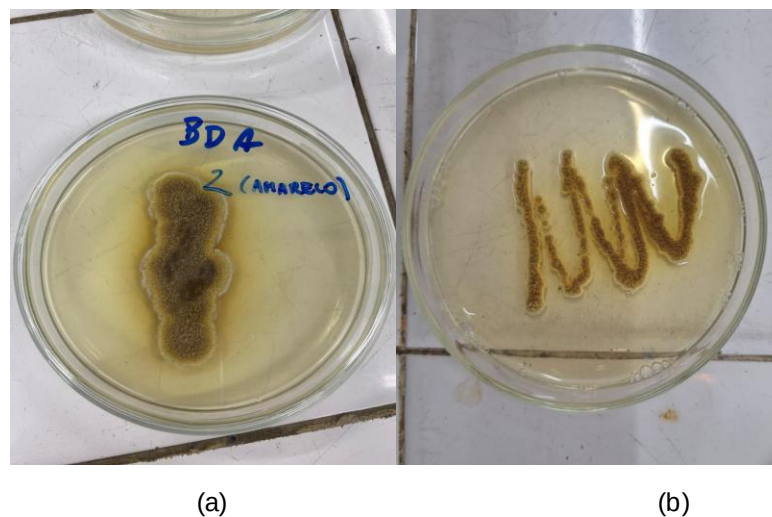
Figura 11 – Fungo 1 após o primeiro e segundo repiques em meio BDA (a e b, respectivamente).



Fonte: A autora (2025).

Fungo 2: Demonstrou um crescimento denso e compacto, com uma textura aveludada. A coloração era amarelo-escuro no centro, com bordas esbranquiçadas e difusas. Esse tipo de fungo apresentou uma estrutura radial, sugerindo um padrão de crescimento concêntrico típico de algumas espécies fúngicas. Os repiques do fungo 2 podem ser observados na Figura 12, a seguir.

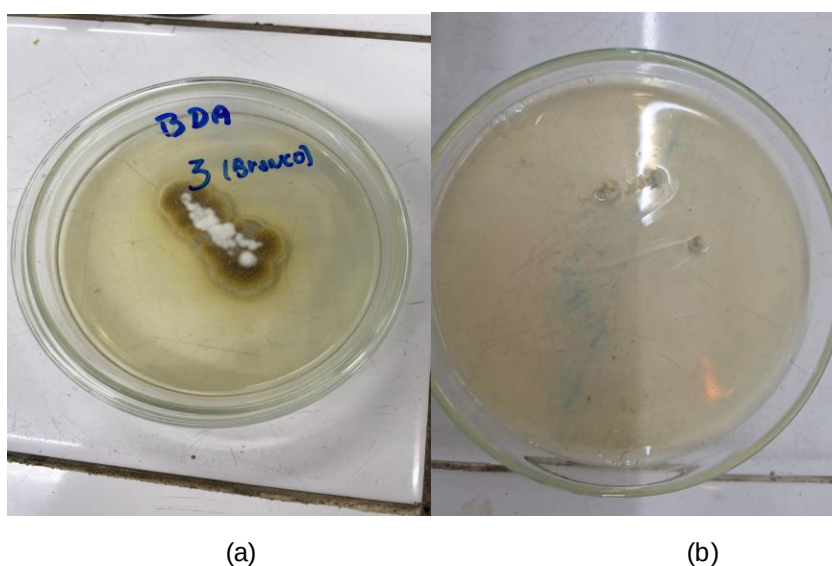
Figura 12 – Fungo 2 após o primeiro e segundo repiques em meio BDA (a e b, respectivamente).



Fonte: A autora (2025).

Fungo 3: Exibiu um crescimento com uma mistura de colorações, apresentando um centro branco-algodoadado, cercado por uma região amarelada e bordas marrons. A textura no centro era aveludada, com um crescimento difuso nas extremidades. O fungo mostrou um crescimento elevado no centro da colônia, o que pode indicar intensa produção de micélio aéreo. Os repiques do fungo 3 podem ser observados na Figura 13, a seguir.

Figura 13 – Fungo 3 após o primeiro e segundo repiques em meio BDA (a e b, respectivamente).



Fonte: A autora (2025).

Após o período de incubação, todos os tipos de fungos mostraram um crescimento visível nas amostras, aumento do diâmetro das colônias e a intensificação das características morfológicas observadas. A análise desses dados confirma que as amostras controle, sem a adição do óleo essencial, forneceram condições adequadas para o crescimento microbiano, favorecendo o desenvolvimento dos fungos.

4.3 OBSERVAÇÃO DOS FUNGOS EM PLACAS DE CÂMARA ÚMIDA

As placas de câmara úmida foram montadas com a adição de uma pequena quantidade de água destilada, formando um ambiente úmido adequado para a manutenção das culturas fúngicas. Essa configuração permitiu a observação detalhada das características morfológicas das colônias sob o microscópio.

Após a preparação das placas, foi possível observar, ao microscópio, o comportamento dos fungos durante o crescimento. As colônias apresentaram características típicas de suas espécies, com estruturas bem definidas e evidentes:

Fungo 1: Observou-se a formação de hifas, que compõem o micélio do fungo. Além disso, há estruturas mais espessas e arredondadas na extremidade de algumas hifas, que podem ser conidióforos ou esporângios, indicando que este fungo pode pertencer a gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Rhizopus*. As hifas do fungo 1 podem ser observadas na Figura 14, a seguir.

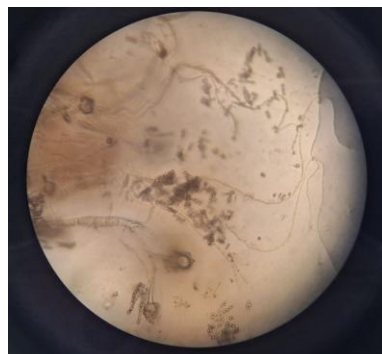
Figura 14 – Hifas do Fungo 1 vistas ao microscópio após crescimento em câmara úmida



Fonte: A autora (2025)

Fungo 2: É possível notar hifas (filamentos alongados) e possivelmente esporângios ou conídios, que são estruturas reprodutivas de fungos. As hifas parecem estar interligadas e algumas regiões contêm agrupamentos de esporos. A tonalidade e textura também indicam que pode ser um fungo filamentoso, como espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Rhizopus*. As hifas do fungo 2 podem ser observadas na Figura 15, a seguir.

Figura 15 – Hifas do Fungo 2 vistas ao microscópio após crescimento em câmara úmida



Fonte: A autora (2025)

Fungo 3: Grande quantidade de hifas fúngicas entrelaçadas, formando uma rede densa. A aparência dessas estruturas é característica de fungos filamentosos, possivelmente de gêneros como *Rhizopus*, *Mucor* ou outros zigomicetos, conhecidos por suas hifas cenocíticas (sem septos visíveis). As hifas do fungo 3 podem ser observadas na Figura 16, a seguir.

Figura 16 – Hifas do Fungo 3 vistas ao microscópio após crescimento em câmara úmida



Fonte: A autora (2025).

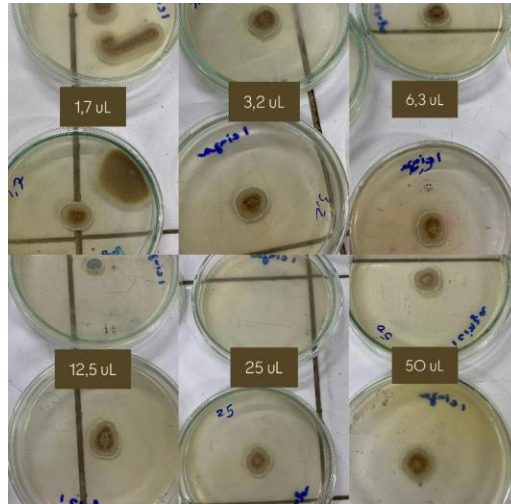
4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO ÓLEO ESSENCIAL DE MELALEUCA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Melaleuca foi realizada com base na metodologia descrita por Ju *et al.* (2018), visando avaliar a eficácia antimicrobiana do óleo contra os fungos filamentosos isolados das amostras de brownie. Para cada volume de óleo essencial (50 μ L, 25 μ L, 12,5 μ L, 6,3 μ L, 3,2 μ L e 1,7 μ L), foram preparadas placas em duplicata, totalizando 12 placas para cada tipo de fungo. As observações foram realizadas após sete dias de incubação a 30 °C.

Fungo 1: Apresentou inibição de crescimento em apenas uma das placas que continha 25 μ L de óleo essencial. A ausência de crescimento em apenas uma das placas pode indicar que a inoculação do fungo não foi homogênea ou eficiente naquela amostra específica — talvez por falha na pipetagem ou na aderência do inóculo ao meio. Nas demais placas, independentemente da concentração, o crescimento fúngico foi semelhante, com diâmetros e características visuais praticamente idênticas aos observados nas placas controle, ou seja, com

crescimento de fungo ativo. O crescimento do fungo 1 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca pode ser observado na Figura 17, a seguir.

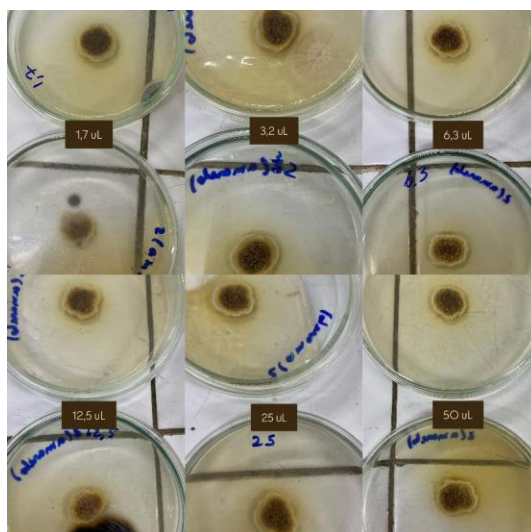
Figura 17 – Crescimento do fungo 1 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca



Fonte: A autora (2025).

Fungo 2: Não apresentou inibição em nenhuma das concentrações testadas. Todas as 12 placas exibiram crescimento de fungo com características e diâmetros próximos aos das placas controle, sugerindo que o óleo essencial de Melaleuca não foi eficaz contra esse fungo nas concentrações testadas. O crescimento do fungo 2 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca pode ser observado na Figura 18, a seguir.

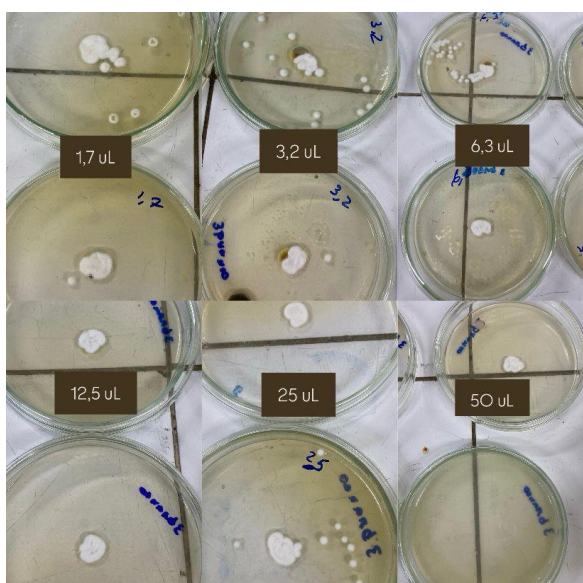
Figura 18 – Crescimento do fungo 2 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca



Fonte: A autora (2025).

Fungo 3: Apresentou inibição em apenas uma placa contendo 50 µL de óleo essencial, enquanto as outras placas, com concentrações menores, não demonstraram inibição visível, com crescimento de fungo semelhante ao das placas controle. A ausência de crescimento em apenas uma das placas pode indicar que a inoculação do fungo não foi homogênea ou eficiente naquela amostra específica — talvez por falha na pipetagem ou na aderência do inóculo ao meio. O crescimento do fungo 3 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca pode ser observado na Figura 19, a seguir.

Figura 19 – Crescimento do fungo 3 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca



Fonte: A autora (2025).

Com base nos resultados da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Melaleuca, foram selecionadas as concentrações de 25 µL e 50 µL para a formulação dos *brownies*. Para ajustar essas concentrações à massa total de brownie preparada, foi realizado o seguinte cálculo:

50 µL de óleo essencial de melaleuca em um volume de 15 mL de meio, corresponde a 3,3 mL por L de meio. Considerando os ingredientes utilizados na formulação do *brownie* — 120 g de farinha, 200 g de chocolate em barra, 135 g de ovo, 45 g de margarina, 160 g de açúcar e 45 g de chocolate em pó — obteve-se uma massa total de 705 g de *brownie*.

Assim, para adaptar a concentração de óleo essencial à massa de *brownie*:

- Para 50 µL de óleo essencial de melaleuca (3,3 mL/Kg), a quantidade proporcional para 705 g é:

$$\frac{3,3 \text{ mL}}{1000 \text{ g}} \times 705 \text{ g} = 2,35 \text{ mL}$$

- Para 25 µL de óleo essencial de melaleuca, a quantidade proporcional para 705 g é:

$$\frac{1,65 \text{ mL}}{1000 \text{ g}} \times 705 \text{ g} = 1,16 \text{ mL}$$

Dessa forma, foram elaboradas quatro formulações de *brownie*, sendo uma receita com 2,5 mL de óleo essencial, uma receita com 2,0 mL de óleo essencial, uma receita com 1,5 mL de óleo essencial e uma receita sem adição de óleo essencial (controle).

4.5 TESTE DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO

O teste de avaliação do potencial antifúngico foi realizado para avaliar a eficácia antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca em *brownies* de chocolate, inoculados com os três tipos de fungos filamentosos isolados da amostra inicial (Fungo 1, Fungo 2 e Fungo 3). Foram utilizados diferentes volumes de óleo essencial de melaleuca (0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL e 2,5 mL) para verificar seu efeito inibitório sobre o crescimento fúngico.

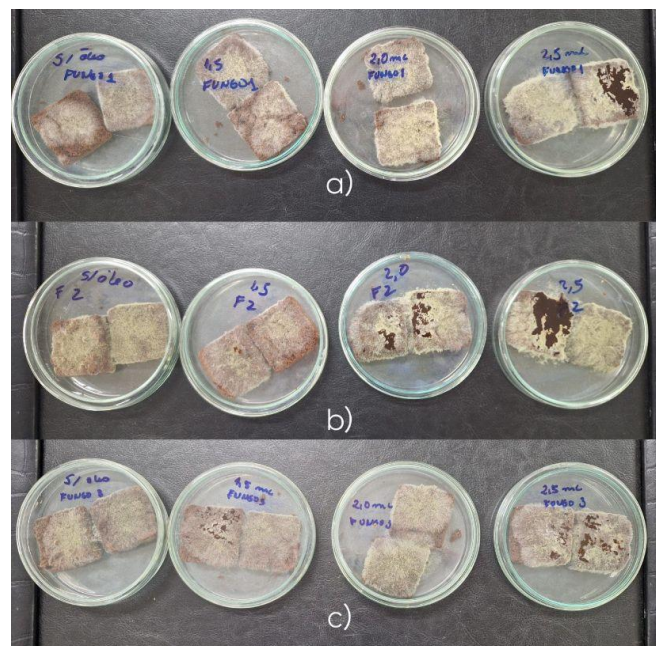
Os resultados mostraram que, para todos os tipos de fungo, foi observada formação de micélio em todas as amostras inoculadas, independentemente da concentração de óleo essencial. No entanto, as amostras com 1,5 mL e 2,0 mL de óleo essencial, sem adição de fungo, apresentaram menor crescimento fúngico visível, em comparação com as amostras com 0 mL (controle) e 2,5 mL (Figura 20). As amostras de *brownies*, com diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca, após 21 dias de inoculação, estão apresentadas nas Figuras 20 e 21, a seguir.

Figura 20 – Amostras de *brownies* em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca sem adição de fungo



Fonte: A autora (2025).

Figura 21 – Amostras de *brownies* inoculados com fungos 1,2 e 3 em diferentes concentrações de óleo essencial de melaleuca (a, b e c, respectivamente).



Fonte: A autora (2025).

Os resultados do estudo atual, que investigaram a eficácia do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na conservação de *brownies*, mostraram uma redução parcial no crescimento fúngico, especialmente nos volumes de 1,5 mL e 2,0 mL. Esses achados são consistentes com os de outros estudos que também observaram

a atividade antimicrobiana do óleo de Melaleuca. Por exemplo, um estudo realizado com carne de frango cozida (GONDIM; SILVA; SILVA, 2023) relatou que o óleo essencial de Melaleuca alternifolia foi eficaz na inibição do crescimento bacteriano de *Staphylococcus aureus*, indicando seu potencial como conservante natural. No entanto, assim como no presente estudo, concentrações mais altas do óleo não mostraram benefícios adicionais, o que sugere que há uma concentração ideal para o efeito antimicrobiano, além da qual não há melhoria significativa.

Esses achados também podem ser relacionados ao estudo de Hall et al. (2021), que avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores observaram halos de inibição de $20,67 \pm 2,31$ mm para *S. aureus* e $18,44 \pm 2,84$ mm para *E. coli*, além de concentrações inibitórias mínimas variando entre $11,65 \mu\text{L mL}^{-1}$ e $2,91 \mu\text{L mL}^{-1}$, indicando alta atividade antibacteriana. Apesar da diferença entre os microrganismos testados, ambos os estudos evidenciam a ação antimicrobiana do óleo de melaleuca, reforçando seu potencial como conservante natural. No entanto, enquanto Hall et al. (2021) identificaram inibição expressiva contra bactérias, o presente estudo observou apenas uma redução parcial no crescimento fúngico, sem inibição total. Esse contraste pode ser atribuído às diferentes estruturas celulares de bactérias e fungos, bem como à necessidade de concentrações específicas do óleo essencial para alcançar eficácia máxima contra cada tipo de microrganismo.

Esse resultado contrasta com os achados de Cunha (2019), que observou uma ação antimicrobiana significativa do óleo essencial contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*, sugerindo que sua eficácia pode ser maior contra bactérias do que contra fungos. A diferença nos resultados pode estar relacionada à estrutura celular dos microrganismos, já que os fungos possuem parede celular mais complexa e resistente, o que pode reduzir a ação dos compostos ativos do óleo essencial.

Além disso, a matriz alimentar pode ter influenciado a eficácia do óleo essencial. No presente estudo, o óleo foi incorporado diretamente à massa do *brownie*, um produto com alto teor de gordura e açúcares, fatores que podem ter impactado sua dispersão e disponibilidade para ação antimicrobiana. Já no estudo de Cunha (2019), os ensaios microbiológicos foram realizados em meio de cultura,

onde o contato direto do óleo com os microrganismos pode ter potencializado seu efeito. Esse fator sugere que a aplicação do óleo essencial em matrizes alimentares complexas pode demandar estratégias adicionais para otimizar sua ação conservante.

Outro ponto relevante é que, no presente estudo, a concentração de 2,5 mL não apresentou uma melhoria significativa na preservação do *brownie* em comparação com as concentrações menores. Esse resultado indica que o aumento da concentração do óleo nem sempre está associado a um efeito antimicrobiano mais pronunciado, podendo haver um limite de eficácia dentro da formulação alimentar. Por outro lado, Cunha (2019) verificou que concentrações mais elevadas do óleo essencial aumentaram a inibição bacteriana, sugerindo que a efetividade do óleo pode ser dependente do tipo de microrganismo e da forma de aplicação.

Os achados de Cunha (2019) sobre a incorporação do óleo essencial de melaleuca em filmes ativos também abrem uma perspectiva interessante para futuros estudos. No presente trabalho, a aplicação direta do óleo na matriz do *brownie* pode ter limitado sua eficácia antifúngica, enquanto a incorporação em embalagens pode permitir uma liberação controlada dos compostos antimicrobianos ao longo do tempo, proporcionando uma proteção mais efetiva contra o crescimento de fungos. Dessa forma, pesquisas futuras poderiam explorar a aplicação do óleo essencial de melaleuca em revestimentos ou embalagens para verificar sua eficácia na preservação de produtos de panificação.

Em síntese, a comparação entre os estudos indica que o óleo essencial de melaleuca possui potencial antimicrobiano, mas sua eficácia depende de diversos fatores, incluindo o tipo de microrganismo, a concentração utilizada e a forma de aplicação. Os resultados sugerem que, embora o óleo possa contribuir para a conservação de alimentos, sua aplicação em produtos assados, como *brownies*, pode demandar estratégias adicionais para otimizar sua ação antifúngica.

5 CONCLUSÃO

O óleo essencial de melaleuca demonstrou efeito antimicrobiano parcial em *brownies*, com redução do crescimento fúngico nas amostras preparadas com 1,5 e 2,0 mL de óleo para 705 g de massa (concentrações de 0,00213 mL/g e 0,00284 mL/g, respectivamente). No entanto, não foi observada inibição total e concentrações mais elevadas não proporcionaram maior eficácia. Esse resultado pode estar relacionado à composição do *brownie*, rica em açúcares e gorduras, que pode dificultar a ação do óleo, além da possibilidade de perda por volatilização durante o processo de assamento. Concentrações mais altas também resultaram em alterações sensoriais indesejadas, como mudança no sabor, o que limita sua aplicação direta em alimentos.

Para pesquisas futuras, recomenda-se a exploração de técnicas como a microencapsulação e a nanoemulsificação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* visando aprimorar sua eficácia como conservante natural em alimentos. A microencapsulação pode proteger o óleo contra fatores ambientais e reduzir seu impacto sensorial, mantendo sua atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares. Enquanto isso, a nanoemulsificação melhora sua dispersão em sistemas alimentícios e pode minimizar a percepção sensorial negativa. Essas abordagens oferecem alternativas promissoras para o desenvolvimento de conservantes naturais que assegurem a segurança microbiológica e a qualidade sensorial dos alimentos.

REFERÊNCIAS

ABICAB – Associação Brasileira da Indústria de Chocolates, Amendoim e Balas. Disponível em: <https://www.abicab.org.br>. Acesso em: 20 nov. 2024.

AMORIM, A. C. L. Pitangueira (*Eugenia uniflora* L.): Fitoquímica e Avaliação Farmacológica do Óleo Essencial Bruto e Frações. 2007. Disponível em: http://www.dominiopublico.gov.br/pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=146909. Acesso em: 13 fev. 2025.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS (ABIHPEC). Guia de Microbiologia. São Paulo: ABIHPEC, 2015. Disponível em: <https://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/basic-html/index.html>. Acesso em: 15 mar. 2025.

AZAMBUJA, W. Óleos essenciais. Métodos de extração de óleos essenciais. Disponível em: <https://www.oleosessenciais.org/metodos-de-extracao-de-oleos-essenciais/>. Acesso em: 17 mar. 2025.

BALAN, I. B. Receita de brownie molhadinho. TudoReceitas, 11 jul. 2023. Disponível em: <https://www.tudoreceitas.com/receita-de-brownie-molhadinho-5864.html>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BANDONI, A. L.; CZEPACK, M. P. Os recursos vegetais aromáticos no Brasil. Vitória: Edufes, 2008. 624p.

BAPTISTA, R. C.; HORITA, C. N.; SANT'ANA, A. S. Natural products with preservative properties for enhancing the microbiological safety and extending the shelf-life of seafood: A review. Food Research International, v. 127, p. 108762, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882098/>. Acesso em: 14 mar. 2025.

BENÍTEZ, R. O. Perdas e desperdícios de alimentos na América Latina e no Caribe. FAO, 01 mar. 2016. Disponível em: <https://www.fao.org/americas/news/news-detail/pda-benitez/pt>. Acesso em: 24 jan. 2025.

BORGES, G. G. Técnicas de extração de óleos essenciais: revisão e estudo de caso de hortelã-pimenta. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2024. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/44187/1/T%C3%A9cnicasExtra%C3%A7%C3%A3o%C3%93leos.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 23, de 15 de março de 2000. Dispõe sobre aditivos alimentares autorizados. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2000/rdc0023_15_03_2000.html. Acesso em: 12 mar. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Resolução - RDC nº 778, de 1º de março de 2023*. Dispõe sobre os princípios gerais, as funções tecnológicas e as condições de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia em alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 1 mar. 2023. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-no-778-de-1o-de-marco-de-2023-420487292>. Acesso em: 30 mar. 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico para Aditivo Aromatizantes. Resolução – RDC Nº 2, de 15 de janeiro de 2007. Diário Oficial da União, de 15 de jan. de 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1 ago. 1997. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1997/prt0326_30_07_1997.html. Acesso em: 20 nov. 2024.

BURT, S. A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-238, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168160504001680>. Acesso em: 20 nov. 2024.

BY SAMIA. Óleo Essencial de Tea Tree (Melaleuca) 10 ml. São Paulo, [s.d.]. Disponível em: <https://www.bysamia.com.br>. Acesso em: 16 mar. 2025.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.19, p.50-62, 2006.

DAGNAS. S.; MEMBRÉ, J-M. Predicting and preventing mold spoilage of food products. **J Food Protec.**, v. 76(3), p. 538-551, 2013

FILTENBORG, O.; FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, p. 85-102, 1996.

FINARTEALIMENTOS. Conheça de onde vem a receita e como foi criado o brownie. Medium, 18 abr. 2023. Disponível em: <https://medium.com>. Acesso em: 30 jan. 2025.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Food wastage footprint: impacts on natural resources. Rome: FAO, 2013. Disponível em: <https://www.fao.org>. Acesso em: 30 jan. 2025.

FURTADO, Kamila. Desenvolvimento e aplicação de filmes ativos incorporados com óleos essenciais para conservação de pão de queijo. 2020. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020. Disponível em: <https://guaiaca.ufpel.edu.br/bitstream/handle/prefix/4744/Dissertacao%20Kamila%20Furtado%20pdf.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2025.

GONDIM, Renata Freire Alves; SILVA, Jaqueline Damos da; SILVA, Claudileide de Sá. Aplicação de óleo essencial de tea tree (*Melaleuca alternifolia*) e óleo bálsamo de copaíba (*Copaifera officinalis*) no controle de *Staphylococcus aureus* em carne de frango cozida. *Revista Contribuciones en Ciencias de la Salud*, v. 16, n. 5, p. 34-45, 2023. DOI: 10.55905/revconv.16n.5-034. Recebido em: 25 abr. 2023. Aceito em: 23 maio 2023.

HALL, M. C.; MARTELLI, E.; DALCANTON, F.; SILVA, L. L.; FIORI, M. A.; MELLO, J. M. M. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de melaleuca com potencial aplicação como conservante natural. In: SIMPÓSIO EM SAÚDE E ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – CAMPUS CHAPECÓ, 3., 2021, Chapecó. Anais [...]. Chapecó: UFFS, 2021.

HERRERA R., C. H.; BOLAÑOS V., N.; LUTZ C., G. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. San José: Editorial Universidad de Costa Rica, 2008. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=8VpJ8foyDilC>. Acesso em: 31 jan. 2025.

IBERIAN COPPERS. Destilação a vapor. 2023. Disponível em: copper-alembic.com. Acesso em: 15 mar. 2025.

JAKIEMIU, E.A.R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Curitiba: UFPR, 2008. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br>. Acesso em: 10 fev. 2025.

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

KOKETSU, M.; GONÇALVES, L. S. Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, 1991. 24p.

KOURKOUTAS, Y.; PROESTOS, C.. Food Preservation: Challenges and Efforts for. [s.l.], p. 1–2, 2020.

MARCONI. Destilador para óleos essenciais tipo Clevenger. Disponível em: <https://www.marconi.com.br/produto/122/destilador-para-oleos-essenciais-tipo-clevenger>. Acesso em: 12 mar. 2025.

MARTINS, Gustavo Aparecido; BICAS, Juliano Lemos. Antifungal activity of essential oils of tea tree, oregano, thyme, and cinnamon, and their components. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 27, p. e2023071, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1981-6723.07123>. Acesso em: 17 jan. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 52, de 29 de setembro de 2014**. Altera a Resolução RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas para os Serviços de Alimentação. Diário Oficial da União, 29 set. 2014.

NEVES, J. S. Aromaterapia: Um tema para o ensino de química. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso Superior de Química, Instituto de Química da Universidade de Brasília: Brasília (DF), 2011. Disponível em: https://bdm.unb.br/bitstream/10483/1728/1/2011_JulieteSilvaNeves.pdf. Acesso em: 17 mar. 2025.

OLIVEIRA, C. D.; ALVARENGA, G. F.; VENÂNCIO, A. H.; BALDUINO, B. A. Utilização dos óleos essenciais nos alimentos: uma revisão. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DA AGROINDÚSTRIA (CIAGRO), 2., 2021. Anais [...]. [S. l.: s. n.], 2021.

POLATOGLU, K. "Chemotypes" – A fact that should not be ignored in natural product studies. The Natural Products Journal, vol. 3, p. 10-14, 2013.

PURKAIT, S. et al. Synergistic antibacterial, antifungal and antioxidant efficacy of cinnamon and clove essential oils in combination. Archives of Microbiology, [s. l.], v. 202, n. 6, p. 1439–1448, 2020.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01858-3>

RAMOS, Anderson Valdeiney Gomes. *Atividade antioxidante e antimicrobiana de produtos naturais e seus efeitos na associação com conservantes sintéticos de alimentos e cosméticos*. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2015.

RANDHAWA, S.; BAHNA, S. L. Hypersensitivity reactions to food additives. **Curr Opin Allergy Clin Immunol** 2009;9:278-83.

REDAÇÃO FiSA. O que são conservantes naturais? Veja quais são as vantagens e desvantagens para a indústria alimentícia. Food Connection, 30 ago. 2024. Disponível em: <https://www.foodconnection.com.br>. Acesso em: 15 mar. 2025.

REDAÇÃO FISPAL TECNOLOGIA. Deterioração de alimentos: desafios para as indústrias alimentícias no Brasil. Food Connection, 08 mar. 2023. Disponível em: <https://www.foodconnection.com.br/artigos/deterioracao-de-alimentos-desafios-para-industrias-alimenticias-no-brasil>. Acesso em: 24 jan. 2025.

REMENANT, B., JAFFRES, E., Dousset, X., Pilet, M-F, Zagorec, M. Bacterial spoilers of food: behavior, fitness and functional properties. 2015; 45:45-53.

RODRIGUES, Ronaldo da Silva; SILVA, Roberto Ribeiro da. A História sob o Olhar da Química: As Especiarias e sua Importância na Alimentação Humana. Química Nova na Escola, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 84–89, 2010.

RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. Food Preservatives. Boston, MA: Springer US, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-0-387-30042-9>.

SILVA, C. C. B.; SOUSA, N. F. C.; DIAS, R. J.; COSTA, M. S. Q.; MARQUES, I. S.; MEDEIROS JÚNIOR, F. C.. Verificação das condições físico-químicas e microbiológicas de bolos caseiros comercializados por ambulantes. Research, Society and Development, v. 9, n. 11, e68891110270, 2020. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/download/10270/9239/141358>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SILVA, D. Conservação de alimentos: entenda seu surgimento e evolução. GEPEA, 2019. Disponível em: <https://gepea.com.br/conservacao-de-alimentos/>. Acesso em: 31 jan. 2025.

SILVA, J. L. A.; SOUSA, P. H. M.; PEREIRA, R. M.; FERREIRA, E. R. S.; SANTOS, F. R. A.; LIMA, S. S.; CUNHA, A. T.; ALVES, F. A. Antifungal activity of essential oils of tea tree, oregano, thyme, and cinnamon, and their components. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 27, 2024. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjft/a/6LZqrbHQ7GQfY7Cn76mpYMK/>. Acesso em: 15 mar. 2025.

SILVA, J. L. da. O método enfleurage na extração de óleos essenciais: revisão. *Brazilian Journal of Development*, v. 7, n. 3, p. 41361-41371, 2021. Disponível em: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/article/view/41361>. Acesso em: 17 mar. 2025.

SILVA, S.R.S., Demuner, A.J., Barbosa, L.C.A., Andrade, N.J., Nascimento, E.A., & Pinheiro, A.L. 2003. *Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de Melaleuca alternifolia Cheel*. Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SP LABOR. O que é Ágar Batata Dextrose – Guia do Comprador. 2024. Disponível em: <https://www.splabor.com.br/blog/meio-de-cultura-2/agar-batata-dextrose-guia-do-comprador/>. Acesso em: 16 mar. 2025.

VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. *Essentials of Food Science*. New York, NY: Springer New York, 2014. (Food Science Text Series). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9138-5>.

Veld, J.H.J.H. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int J Food Microbiol*. 1996; 33:1-18.

VITAL ATMAN. Prensagem a frio: o que é isso? Disponível em: <https://vitalatman.com.br/blog/prensagem-a-frio-o-que-e-isso/?srsltid=AfmBOorGUX5xT0PoT3k0aUvo4DfnKVOFZi4rF-PAZ6UI-3rbJ8wMsHjo>. Acesso em: 17 mar. 2025.