

APLICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EXTRAÍDOS DE FONTES NATURAIS EM MASSA DE PIZZA: QUALIDADE E ARMAZENAMENTO.

Cristiana Costa Bretanha ✉

Anelise Christ Ribeiro

Gregory Giacobbo Luz

Michele Moraes de Souza

Eliana Badiale-Furlong

Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – RS.

✉ crisbretanha@hotmail.com

RESUMO

O consumo de pizzas prontas aumentou nos últimos anos dado à praticidade do produto e ao baixo custo e valor nutritivo. Aliado a isso, o consumidor demanda alimentos mais seguros, despertando o interesse pelo uso de conservantes naturais. Este trabalho visou estudar o modo de aplicação do conservador na massa de pizza empregando diferentes atmosferas, a fim de aumentar a vida útil do produto. Um conservador natural foi utilizado, a partir da biomassa fermentada de farelo arroz, para inibir o crescimento fúngico, visando um produto de maior valor nutricional. A extração dos compostos fenólicos foi obtida a partir do farelo de arroz fermentado com *Rhizopus oryzae*, utilizando o metanol como solvente e quantificados colorimetricamente com reagente de Folin-Ciocalteu. Na fermentação, o substrato foi acondicionado em biorreatores de bandeja e autoclavados para adição da solução nutriente e de esporos cuja concentração inicial foi

de 4×10^6 esporos.g⁻¹ de farelo do fungo. Os extratos foram aplicados para a inibição do crescimento fúngico na concentração média de 5,75 mg.g⁻¹ adquiridas no comércio local. A massa de pizza tratada com o conservador produzido e armazenada em embalagem normal, apresentou maior tempo de vida útil, tornando o produto mais adequado para garantir sua segurança.

Palavras-chave: Fermentação. Conservantes naturais. Embalagens.

ABSTRACT

The consumption of ready-made pizzas increased in recent years given the product practicality and low cost and nutritional value. Allied to this, consumers demand safer, awakening interest in the use of natural conservatives. This work aims to study the conservative mode of application in pizza dough using different atmospheres in order to extend the life of the product. A natural conservative was used, the biomass from the fermented rice bran to inhibit fungal growth, targeting a

product with higher nutritional value. The extraction of phenolic compounds was obtained from fermented rice bran with *Rhizopus oryzae*, using methanol as solvent, and quantitated colorimetrically by the Folin-Ciocalteu method. In fermentation, the substrate was placed in tray bioreactors and autoclaved for adding nutrient solution and spores whose initial concentration was 4×10^6 spores.g⁻¹ fungus bran. The extracts were applied for inhibiting fungal growth in the mean concentration of 5.75 mg.g⁻¹ acquired in the local market. The pizza dough treated with conservative produced and stored in normal packaging, had higher lifetime, making the most suitable product to ensure food safety.

Keywords: Fermentation. Natural conservatives. Packing.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a segurança alimentar vem norteando a busca por conservantes naturais na forma nativa ou extraídos de suas fontes,

podendo ser aplicados aos próprios derivados. Estudos estão voltados para a identificação e purificação de novos compostos com atividade antifúngica que possam atuar sozinhos ou sinergicamente, minimizando a deterioração e o uso dos antifúngicos químicos em alimentos (BRUL; KLIS, 1999).

Deste modo, aditivos químicos vêm sendo substituídos, com maior frequência, por conservadores naturais pois, além de enriquecer com nutrientes o produto, podem prevenir a deterioração microbiana, como forma de aumentar a vida útil e garantir a segurança dos alimentos. No caso específico da redução da deterioração causada por fungos, a utilização de compostos naturais com ação antifúngica é uma alternativa interessante (TASSOU; DROSINOS; NYCHAS, 1995).

Os compostos fenólicos presentes em tecidos vegetais podem inibir o desenvolvimento fúngico e a produção de micotoxinas que se localizam especialmente nos tecidos externos que têm papel de proteção da estrutura (SOUZA et al., 2010). Com essa propriedade, destacam-se os ácidos fenólicos e seus derivados presentes em vegetais. Dentre as funções protetoras destes compostos, especialmente no caso de cereais, a ação antifúngica é frequentemente buscada para aplicação em alimentos susceptíveis à contaminação fúngica (OLIVEIRA et al., 2007). Sendo assim, encontram-se o arroz e seus derivados de beneficiamento, que são ricos em ácido ferúlico e cumárico (OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008; WANG et al., 2005).

Com os avanços e as mudanças do mundo moderno, os consumidores tendem a buscar a facilidade no preparo de alimentos, gerando, na indústria, a necessidade de uma crescente produção de alimentos prontos e semi-prontos, como a pizza que consiste em um dos alimentos mais

consumidos nos últimos anos devido à praticidade do produto, contudo, sofre intensa manipulação durante o processamento, o que contribui para sua contaminação, perda de qualidade e um intervalo restrito de vida útil. Por esse motivo, a perda é dependente de vários fatores, bem como, a composição, embalagem e condições de estocagem do alimento (OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2004; WANG et al., 2005).

Este trabalho consistiu em analisar a inibição do crescimento fúngico utilizando um composto natural a partir da biomassa fermentada de farelo de arroz, a fim de aumentar a vida útil de massas de pizza visando um produto de maior valor nutricional e funcional.

MATERIAL E MÉTODOS

Farelo de arroz

O farelo de arroz integral com granulometria padronizada de 32 mesh foi fornecido por uma agroindústria beneficiadora de arroz da região.

A biomassa de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 (Banco de Colônias da Fundação Tropical André Tosello) foi cultivada em substrato farelo de arroz integral. As culturas foram mantidas em Ágar Batata-dextrose a 4°C e os esporos incubados durante 7 dias a 30°C. Para a realização da fermentação, foi empregada uma solução de esporos de 4×10^6 esporos. mL⁻¹ obtidos dos esporos dos meios de cultura com solução 0,2% de Tween 80, filtração e enumeração de esporos em câmara de Neubauer.

Condições de extração do conservador

A extração dos compostos fenólicos foi realizada a frio com metanol e a biomassa fermentada, sob agitação orbital de 160 rpm, durante 2h à temperatura ambiente, seguida de partição com hexano, clarificação

com hidróxido de bário 0,1M e sulfato de zinco 5%, centrifugação e filtração. Os extratos metanólicos foram secos em rotaevaporador, ressuspensos em etanol 40% e aplicados como conservadores nas massas de pizza. O conteúdo de fenóis totais foi determinado por meio do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, tendo como padrão o ácido ferúlico (1,7 a 12,2 µg mL⁻¹) (SOUZA et al., 2010).

Os indicativos de qualidade do produto foram avaliados de acordo com a umidade, pH e acidez (AOAC, 2000), a determinação do conteúdo de glicosamina (AIDOO, 1981), enumeração de bolores e leveduras (NELSON; TOUSSON; MARASAS, 1983) realizadas a cada 5 dias durante 15 dias, utilizadas como indicativo de ação dos conservadores nas diferentes embalagens aplicadas.

Aplicação do conservador

As massas de pizzas foram adquiridas do comércio local, sob os cuidados adequados de higienização. A aplicação do conservador na massa de pizza foi estudada adicionando como ingrediente (0,05%) ou borrifando após o forneamento nas mesmas proporções, comparados entre si e com o controle (etanol 40%). Além disso, foram testadas embalagens de polietileno (0,12mm) em condições sob vácuo, atmosfera normal e atmosfera de nitrogênio armazenados a temperatura ambiente (25°C) até o produto apresentar contaminação fúngica perceptível a olho nu. Por fim, foi avaliado o efeito nas respostas durante o armazenamento das massas de pizza, preparadas com o conservador natural (extrato fenólico), químico (propionato de cálcio) e um controle (solução alcoólica sem conservador), comparando a atividade inibitória no desenvolvimento fúngico que cada conservador ocasionava nas massas.

Análise estatística

As determinações foram realizadas em triplicata e a significância das diferenças dos resultados foi estimada estatisticamente por ANOVA seguido por teste de médias conforme Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção dos compostos fenólicos liberados pelo micro-organismo a partir da degradação dos componentes do farelo foi realizada por meio da fermentação em estado sólido. A Tabela 1 apresenta os resultados levantados sobre o conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) extraídos da biomassa fermentada com etanol 40%.

A maior quantidade de compostos fenólicos ocorre devido à ruptura da lignina presente na parede celular do substrato, farelo de arroz. A diminuição dos seus níveis ocorre pela continuidade da degradação da estrutura fenólica liberando outros compostos derivados durante a multiplicação fúngica (SCHMIDT et al., 2014). Portanto, em 24 h de fermentação o

CFT apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) quando atingiu seu maior rendimento na biomassa fúngica ($2,5 \text{ mg/g}_{\text{biomassa}}$). Após este intervalo, compostos produzidos pela multiplicação fúngica podem ter liberado outros compostos derivados de fenóis (OLIVEIRA, 2009). Além disso, não apresentou diferença significativa entre os tempos de 24h e 48h de fermentação.

Considerando a abundância dos compostos fenólicos extraídos foi avaliada a aplicação do conservador na pizza, adicionado como ingrediente (0,05%) ou borrifando após o fornecimento nas mesmas proporções. Em ambos, as pizzas foram armazenadas em embalagens de polietileno (0,12mm) em atmosfera normal. Em primeiro lugar, foi realizada a enumeração de bolores e leveduras nas amostras (Tabela 2), sendo este um indicativo do crescimento fúngico.

A contaminação fúngica só foi detectável a partir do quinto dia de armazenamento e foi definida como incontável quando apresentava valores maiores que $9 \times 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$. Após o quinto dia os conservadores

estudados apresentaram menores níveis de contaminação em comparação ao controle, sendo que nas amostras tratadas pós fornecimento foram detectados os menores níveis de contaminação fúngica, destacando-se o CFT como melhor conservador, visto que os teores de UFC permaneceram próximos a $6 \times 10^5 \text{ UFC.g}^{-1}$ até o 15º dia de armazenamento enquanto que para o controle e conservador químico foram ambos de $8 \times 10^6 \text{ UFC.g}^{-1}$.

Este fato também demonstra que o conservador CFT, em relação ao conservador químico, é mais adequado para conservação por períodos mais longos, desde que empregado após o tratamento térmico. No entanto, comparando-se os resultados com os valores máximos permitidos pela legislação - Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 (ANVISA, 2011), foi observado que, já no quinto dia, todas as massas estavam fora do padrão de qualidade aceitável, pois excederam o valor $5 \times 10^3 \text{ UFC.g}^{-1}$, sugerindo que as amostras possuem uma contaminação inicial elevada e que os conservadores apenas diminuem a velocidade de proliferação dos

Tabela 1 - Rendimento dos compostos fenólicos totais solúveis em etanol 40%.

Tempo de fermentação	CFT _{etanol} (mg/g _{biomassa})
0 h	$1,68 \pm 0,02^d$
24 h	$2,45 \pm 0,04^a$
48 h	$2,44 \pm 0,01^a$
72 h	$2,33 \pm 0,05^b$
96 h	$2,04 \pm 0,03^c$

Média \pm desvio padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Enumeração de bolores e leveduras (10^4 UFC.g^{-1}) nas massas de pizza com diferentes tratamentos.

Intervalo (dia)	Controle (pré)	Controle (pós)	Propiônico (pré)	Propiônico (pós)	CFT (pré)	CFT (pós)
1	0	0	0	0	0	0
5	3,23	0	1,61	1,21	5,24	4,84
10	786	117	68,1	67,7	266	53,2
15	847	847	847	847	677	58,1

Tabela 3 - Avaliação da contaminação fúngica em pizzas embaladas sob diferentes atmosferas e conservadores.

	Intervalo		Controle				Propiônico				CFT		
	Intervalo (dia)	N ₂	Vácuo	Normal	N ₂	Vácuo	Normal	N ₂	Vácuo	Normal	N ₂	Vácuo	Normal
Glicosamina (µg/g)	1°	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}	5,0 ^{f,A}
	5°	6,0 ^{a,A}	2,0 ^{b,FG}	3,0 ^{b,EF}	ND	3,0 ^{b,E}	4,0 ^{b,C}	1,0 ^{c,G}	6,0 ^{a,B}	4,0 ^{b,C}	1,0 ^{c,G}	6,0 ^{a,B}	2,0 ^{b,G}
	10°	7,0 ^{a,C,E}	7,0 ^{a,C,E}	9,0 ^{b,A}	5,0 ^{a,B,D}	7,0 ^{a,E}	4,0 ^{c,D}	7,0 ^{a,E}	4,0 ^{c,D}	7,0 ^{a,E}	4,0 ^{c,D}	4,0 ^{c,D}	6,0 ^{a,B,C}
	15°	3,0 ^{b,D,E}	3,0 ^{b,D}	6,0 ^{a,B,C}	3,0 ^{b,D,E}	6,0 ^{a,A,B}	6,0 ^{a,A}	2,0 ^{b,D,E}	2,0 ^{b,E}	2,0 ^{b,D,E}	2,0 ^{b,E}	2,0 ^{b,E}	5,0 ^{a,C}
Enumeração de bolores e Leveduras (10⁴ UFC/g)	1°	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	5°	ND	ND	0,13	0,11	0,46	0,06	1,0	0,15	0,06	1,0	0,15	0,04
	10°	2,5	0,71	2,5	2,4	1,7	2,5	1,6	0,7	2,5	1,6	0,7	2,5
	15°	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5

N₂ = Embalagem com aplicação de nitrogênio, ND= não detectável

Letras iguais e maiúsculas na mesma linha e letras iguais e minúsculas na mesma coluna indicam que não há diferença significativa entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($\alpha < 0,05$).

micro-organismos porém não têm a capacidade de destruí-los, atuando como fungistáticos.

No armazenamento, a temperatura ambiente na época do estudo estava em torno de 15°C, que ao mesmo tempo limita a multiplicação microbiana, porém não impede a absorção de umidade do meio. Assim a superfície da massa ficou umedecida e viscosa propiciando o aumento da contaminação fúngica. Apesar da temperatura, ao longo dos 15 dias as amostras apresentaram em média 28% de umidade.

As melhores condições do processo foram obtidas aplicando o conservador natural pós forneamento, sendo assim foi necessário avaliar o emprego de diferentes embalagens para as massas de pizza nas mesmas condições de aplicação dos conservadores em estudo. Nessas condições, o uso do teor de glicosamina foi escolhido como um indicativo do crescimento fúngico, visto que este composto constitui a unidade monomérica da parede celular fúngica (OLIVEIRA et al., 2009; SOUZA et al., 2011). A Tabela 3 apresenta a contaminação fúngica das massas de pizza armazenadas em embalagens de polietileno nas condições sob vácuo, atmosfera normal e atmosfera de nitrogênio.

As amostras com aplicação de CFT em atmosfera normal, durante o armazenamento, obtiveram menores valores, em relação aos demais tratamentos reforçando sua adequação para o armazenamento prolongado.

O teor de glicosamina nas amostras foi mantido ao longo do armazenamento, exceto no 15° dia pois os micro-organismos, aparentemente, passaram a fase de esporulação, não expandindo a produção de componentes de parede celular. Esta situação sugere que as condições higienicossanitárias durante o processamento do produto, embalagem e armazenamento, contribuíram para

a impossibilidade de que as amostras apresentassem maior tempo de armazenamento.

Em relação à enumeração de bolores e leveduras, nenhuma das massas de pizza analisadas durante os primeiros dias de armazenamento apresentaram valores acima do limite proposto pela Portaria nº 451 da Secretaria de Vigilância Sanitária. Após esse período, as amostras armazenadas em diferentes atmosferas apresentaram contagens superiores ao limite permitido (10^4 UFC.g⁻¹). O armazenamento das massas à temperatura ambiente favoreceu o desenvolvimento dos micro-organismos, esta situação sugere que as condições higienicossanitárias durante o processamento do produto, embalagem e armazenamento, contribuíram para a impossibilidade de que as amostras chegassem ao final do prazo de validade (PINHO; MACHADO; FURLONG, 2001). Estudos anteriores realizados em amostras comerciais de massas de pizzas apontam que mais de 50% das amostras estão contaminadas por bolores e leveduras (FERNANDES; CONCEIÇÃO; SOUZA, 1997; SOUZA; PEREIRA; COLEN, 1997).

Os valores de pH nas amostras estudadas ficaram dentro da faixa de 5,2 a 5,6 para produtos de panificação, nos diferentes tipos de armazenamento. Por fim, ao longo do armazenamento foi possível observar alterações sensoriais nas massas, quanto à textura, maciez, odor e aparência.

CONCLUSÃO

A melhor condição de armazenamento das pizzas foi quando utilizada a embalagem normal de polietileno (0,12mm). Comparando a eficiência dos conservadores, o emprego do extrato fenólico borrifado pós fornecimento foi o mais eficaz em relação ao propionato de cálcio (químico) durante um período de 15 dias.

REFERÊNCIAS

- AIDOO, KE; HENDRY, R; WOOD, BJ. Estimation of Fungal Growth in a Solid State Fermentation System. **Appl Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.6-9, 1981.
- ANVISA – Agência nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n° 451**, de 19 de setembro de 1997. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: Ago 2011.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 14thed. Washington, p.1141, 2000.
- BRUL, S; KLIS, FM. Mechanistic and Mathematical Inactivation studies of food spoilage fungi. **Fungal Genet Biol.**, 27:199-208, 1999.
- FERNANDES, JDC; CONCEIÇÃO, ML; SOUZA, SC. **Avaliação do Perfil da Qualidade Higiênico-Sanitária de Pizzas Comercializadas em João Pessoa**. In: II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, p.157, 1997.
- FREITAS, WC; SOUZA, EL; SOUSA, CP; TRAVASSOS, AER. Ocorrência de Staphylococcus em massa refrigerada tipo Pizza pronta. **Rev Hig Alimentar**, 122:67-70, 2004.
- NELSON, PE; TOUSSON, TA; MARASAS, WFO. **Fusarium species-an illustrated manual for identification**. Pennsylvania, Pennsylvania State University Press, 1983.
- OLIVEIRA, MS; DORS, GC; SOUZA-SOARES, LA; BADIALE-FURLONG, E. Antioxidant activity of phenolic compounds from plant extracts. **Alim Nutr**, Araraquara, v.18, n.2, p.267-275, 2007.
- OLIVEIRA, MS; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin J**, v.1, n.2, p.1-10, 2008.
- OLIVEIRA, MS; KUPSKI, L; FEDDERN, V; CIPOLATTI, EP; BADIALE-FURLONG, E; SOUZA-SOARES, LA. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **Food Science and Technology**, p. 7-11, 2009.
- PINHO, BH; MACHADO, MI; FURLONG, EB. Propriedades Físico-químicas das massas de Pizza semi-prontas e sua relação com o desenvolvimento de bolores e leveduras. **Rev Inst Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, Brasil, v.60, n.1, p.35-41, 2001.
- SCHMIDT, CG; GONÇALVES, LM; PRIETTO, L; HACKBART, HS; FURLONG, EB. Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rhizopus oryzae*. **Food Chemistry**, 146:371-377, 2014.
- SOUZA, JM; PEREIRA, AJG; COLEN, G. **Qualidade Microbiológica de Massas de Pizza Semi-Prontas Comercializadas em Belo Horizonte**. In: II Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, Campinas, p.153, 1997.
- SOUZA, MM; OLIVEIRA, MS; ROCHA, M; FURLONG, EB. Avaliação da atividade antifúngica de extratos fenólicos de cebola, farelo de arroz e microalga *Chlorella phyrenoidosa*. **Ciênc Tecnol Aliment**, 30(3):680-5, 2010.
- SOUZA, MM; PRIETTO, L; RIBEIRO, AC; SOUZA, TD; BADIALE-FURLONG, E. Assessment of the antifungal activity of Spirulina platensis phenolic extract against Aspergillus flavus. **Ciênc Agrotecnol**, 2011.
- TASSOU, CC; DROSINOS, EH; NYCHAS, GJE. Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on Salmonella enteritidis and Listeria monocytogenes in model food systems at 4 and 10 °C. **Journal of Applied Bacteriology**, v.78, p.593-600, 1995.
- WANG, SH; OLIVEIRA, MF; COSTA, PS; ASCHERI, JLR; ROSA, AG. Farinhas de trigo e soja pré-cozidas por extrusão para massas de pizza. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.40, n.4, p.389-395, 2005.