



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ –
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE
MESTRADO ACADÊMICO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

ANTONIA ELAINE FRUTUOSO

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL ELABORADO COM GALACTOMANANA DE
Caesalpinia pulcherrima E ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* APLICADO
EM QUEIJO COALHO**

LIMOEIRO DO NORTE, CEARÁ

2014

ANTONIA ELAINE FRUTUOSO

**REVESTIMENTO COMESTÍVEL ELABORADO COM GALACTOMANANA DE
Caesalpinia pulcherrima E ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* APLICADO
EM QUEIJO COALHO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Ceará,
Campus Limoeiro do Norte como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dra. Daniele Maria Alves Teixeira Sá

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Renata Chastinet Braga

Limoeiro do Norte - CE

2014

Catálogo na fonte : Tatiana Apolinário Camurça (CRB 3 – nº 1045)

F944r Frutuoso, Antonia Elaine.

Revestimento comestível elaborado com galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* aplicado em queijo coalho / Antonia Elaine Frutuoso. - Limoeiro do Norte - IFCE, 2014.
130f.

Dissertação (Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal do Ceará, 2014.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Daniele Maria Alves Teixeira Sá.

1. ÓLEOS VOLÁTEIS. 2. POLISSACARÍDEO. 3. CONSERVAÇÃO. 4. PRODUTO LÁCTEO. I. Título.

CDD 664

ANTONIA ELAINE FRUTUOSO

REVESTIMENTO COMESTÍVEL ELABORADO COM GALACTOMANANA DE
Caesalpinia pulcherrima E ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* APLICADO EM
QUEIJO COALHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal do Ceará,
Campus Limoeiro do Norte como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Daniele M^a Alves Teixeira

Prof.^a Dra. Daniele Maria Alves Teixeira (Orientadora)
Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte

Antonio Belfort Dantas Cavalcante

Prof.^o Dr. Antonio Belfort Dantas Cavalcante
Instituto Federal do Ceará – *Campus* Limoeiro do Norte

Jeanny da Silva Maciel

Prof.^a Dra. Jeanny da Silva Maciel
Universidade Federal do Ceará – *Campus* Fortaleza

Com amor e carinho,

Dedico ao meu AMADO esposo Rodrigo Soares Lima.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar-me com determinação e dar-me a graça de lutar para conquistar os meus sonhos, que aos poucos, e no tempo certo, tornam-se conquistas reais, como o almejado mestrado em Tecnologia de Alimentos. A mim cabe agradecer: Muito obrigada Senhor!

A minha família, irmãos, tias, primos, sobrinhos e afilhadas, em especial minha mãe Maria das Dores Frutuoso e avó Maria Augusta Pereira, pelo amor incondicional, respeito, carinho e pelos valores éticos e religiosos a mim ensinados.

A professora Dra. Daniele Maria Alves Teixeira Sá, minha orientadora, pela dedicação, incentivo, compromisso e competência profissional ao transmitir os seus conhecimentos, e mais uma vez repito o exposto em minha monografia: És um grande exemplo a seguir. E é nesta perspectiva, tendo a graça de trabalhar mais uma vez ao seu lado, que continuo minha caminhada. Obrigada pela parceria profissional e pela amizade.

A minha co-orientadora Dra. Renata Chastinet Braga, pelos conhecimentos proporcionados, apoio, incentivo e pela parceria profissional na elaboração desta pesquisa.

Ao prof. Dr. Antonio Belfort Dantas Cavalcante e a prof. Dra. Jeanny da Silva Maciel, pelo aceite ao convite a participação desta banca, contribuindo para a melhoria deste trabalho.

A Dra. Telma Leda Gomes de Lemos, Dra. Karina Maria Olbrich e o Dr. Antonio Silvio do Egito Vasconcelos pela colaboração na pesquisa, permitindo a execução de análises na UFC, *Campus Fortaleza* e na Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE.

A prof. Dra. Patrícia Lopes Andrade, pelos direcionamentos, apoio e dedicação na execução do projeto, contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento da pesquisa, mesmo à distância. Expresso minha alegria e carinho por tão bela amizade e agradeço pelos conselhos e por sempre acreditar em meu potencial de forma sincera.

A todos os meus professores da pós-graduação do IFCE, Limoeiro do Norte, pela dedicação em cada disciplina, contribuindo assim, para a minha formação profissional e pessoal.

A todas as meninas do mestrado, pela a alegria proporcionada, troca de experiência e pelo laço carinhoso de amizade firmado. Em especial, minha amiga Tanna Farias, em que foi possível convivemos e dessa forma, cultivarmos uma amizade sincera a qual recordarei para sempre com muito carinho e amor.

A minha amiga Nágila Teotônio, pela imensurável contribuição no desenvolvimento desta pesquisa, auxiliando-me nas análises. Obrigada por estar ao meu lado, pelo incentivo, carinho e por tão bela amizade, que nem mesmo o tempo tem sido capaz de mudar tal sentimento.

As minhas, para sempre, amigas de faculdade: Fabrine Farias, Dayse Soares e Keciana Farias pela amizade e carinho durante todo o nosso percurso da carreira profissional.

A minha amiga Diana Freitas, Cintia Andrade e Ticiane Andrade, bem como a Irmãs Luciana, Rosely e Expedita, filhas de Sant'Ana, pela amizade, orações e ensinamentos, refletindo o mais belo amor de Deus. Cada uma de forma especial está em meu coração.

A galerinha da iniciação científica: Samara Santos, Thallyne Alves, Lyviane Chacon, Águida Albuquerque, Samara Rodrigues e Samuel Barcelos pela ajuda na realização desse trabalho.

A todos os funcionários do IFCE Campus Limoeiro do Norte e Campus Sobral, pela contribuição de cada setor e pela ajuda imensurável na realização das minhas atividades, principalmente, os laboratoristas Mayra Freitas, Auriana Regis e Mariana Santiago.

A Nutrinor, na pessoa da Dra. Silvana Cristina Klein da Luz, a qual tenho muita admiração, agradeço pelos ensinamentos e experiência na área de alimentos, pois sei que de alguma forma trouxe consigo uma contribuição para a realização deste trabalho.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico, FUNCAP, pela bolsa de pesquisa científica.

A todos que colaboraram de alguma forma para execução deste trabalho e para minha formação pessoal e acadêmica, meus sinceros agradecimentos.

*“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar”*

Celina Borges

RESUMO

O queijo coalho apresenta elevado consumo no Nordeste do Brasil, constituindo-se de uma relevante fonte de renda para economia. Este alimento apresenta excelente composição nutricional, o que o torna propício para o desenvolvimento de microorganismos. Atualmente são propostos estudos sobre filmes e revestimentos como forma de conservação de alimentos. Objetivou-se elaborar revestimento comestível a base de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* e óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e aplicar em queijo coalho. O óleo essencial foi submetido às análises de rendimento, densidade, composição química e atividade antibacteriana. A galactomanana foi avaliada quanto ao rendimento de extração e composição química por meio de RMN ^1H . Os queijos foram avaliados quanto à composição dos revestimentos, sendo estes T1: queijo sem revestimento; T2: 0,0% G; 0,2% OE; T3: 0,0% G; 0,5% OE; T4: 1,0% G; 0,0% OE; T5: 1,0% G; 0,2% OE; T6: 1,0% G; 0,5% OE; T7: 2,0% G; 0,0% OE; T8: 2,0% G; 0,2% OE; e T9: 2,0% G; 0,5% OE), onde G corresponde a galactomanana e OE, óleo essencial, sendo que em todos os tratamentos foram adicionados 0,1% de polissorbato 80. Todos os queijos foram submetidos às análises microbiológicas, físico-química e perda de peso durante 20 dias de armazenamento. O tratamento com melhores resultados foi escolhido e analisado quanto à composição físico-química, microbiológica, sensorial, textura instrumental e capacidade de derretimento durante 30 dias de armazenamento. O rendimento da extração do óleo essencial foi de 0,69%, sendo identificados os constituintes majoritários mircenol, α -citral, β -citral e o geraniol. Em relação à atividade antibacteriana deste óleo, as concentrações de 42,5 mg/mL e 25,5 mg/mL inibiram o crescimento *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. O rendimento da extração de galactomanana foi de 25,4%. Os queijos apresentaram perdas de peso variando 13,15 a 25,62% durante os 20 dias de armazenamento. Em relação aos quesitos microbiológicos, os tratamentos que apresentaram reduções microbianas foram: T2, T3, T5 e T9. Em geral, os resultados físico-químicos não apresentaram diferença estatística com até 20 dias. Comparando-se T1 e T5, os queijos apresentaram diferença estatística com 30 dias para a umidade. A acidez do T5 apresentou-se estável após 15 dias. E em relação ao percentual de proteínas, o T5 apresentou maiores teores. O teor de gordura, cálcio, pH, atividade de água e gordura no extrato seco não diferiram ao longo dos 30 dias. Observaram-se maiores percentuais de derretimento aos 15 dias, coincidindo com os baixos valores de pH (5,75 e 5,63) e percentuais de umidade 48,19 e 49,88% para o T1 e T5, respectivamente. Os valores de dureza, coesividade, gomosidade e resiliência apresentaram diferença, porém, a

adesividade, elasticidade e mastigabilidade não variaram entre os tratamentos e os tempos avaliados. Os queijos com revestimento (T5) apresentaram notas entre 7 e 8 para impressão global, que na escala hedônica corresponde a gostei moderadamente a gostei muito, respectivamente. Conclui-se que a utilização de revestimento comestível elaborado com 1,0% de galactomanana, 0,2% de óleo essencial e 0,1% de polissorbato 80 (T5) proporcionou reduções microbiana, bem como estabilidade físico-química, sugerindo seu uso na indústria de laticínio.

Palavras-chave: Óleos voláteis; Polissacarídeo; Conservação; Produto Lácteo.

ABSTRACT

The “coalho” cheese presents high consumption in the Northeast of Brazil, becoming an important source of income for the economy. This feed provides excellent nutritional composition, which makes it suitable for the growth of microorganisms. Currently studies on films and coatings as a means of food preservation are proposed. Aimed to develop edible coating the base of *Caesalpinia pulcherrima* galactomannan and essential oil of *Cymbopogon citratus* and apply in cheeses. To the essential oil was determined: yield, density, chemical composition and antibacterial activity. The galactomannan was evaluated for extraction yield and chemical composition by means of ^1H NMR. The cheeses were evaluated as to the composition of the coatings, which are T1: cheese without coating; T2: 0.0% G; OE 0.2%; T3: 0.0% G; OE 0.5%; T4: 1.0% G; OE 0.0%; T5: 1.0% G; OE 0.2%; T6: 1.0% G; OE 0.5%; T7: 2.0% G; OE 0.0%; T8: 2.0% G; OE 0.2%; and T9: 2.0% G; 0.5% OE), where G is the galactomannan and OE, essential oil, and in all treatments were added 0.1% polysorbate 80. All cheeses were subjected to physico-chemical microbiological, and weight loss storage for 20 days. Treatment with best results was selected and analyzed for physico-chemical, microbiological, sensorial composition, instrumental texture and melting capacity during 30 days of storage. The yield of essential oil extraction was 0.69%, the major constituents myrcene, α -citral, β -citral and geraniol being identified. Regarding this oil antibacterial activity, concentrations of 42.5 mg/mL and 25.5 mg/mL inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. The yield of extraction of galactomannan was 25.4%. Cheeses showed weight losses ranging from 13.15 to 25.62% during the 20 days of storage. Regarding microbiological questions, treatments that showed microbial reductions were: T2, T3, T5 and T9. In general, the physicochemical results showed no statistical difference in 20 days. Comparing T1 and T5, the cheeses showed statistical difference with 30 days for moisture. The acidity of the T5 was stable after 15 days. The T5 presented higher concentrations of protein. The fat, calcium, pH, activity of water and fat in dry matter were similar throughout the 30 days in both treatments. Was observed higher percentages of melting at 15 days, coinciding with the low pH values (5.75 and 5.63) and percentage of moisture 48.19 and 49.88% for T1 and T5, respectively. The values of hardness, cohesiveness, gumminess and resilience showed difference, however, adhesiveness, elasticity and chewiness did not vary between treatments and times evaluated. The cheeses coated (T5) had grades between 7 and 8 for overall impression, which corresponds to the hedonic scale enjoyed moderately and liked, respectively. We conclude that the use of edible coating

prepared with 1.0% galactomannan, 0.2% essential oil and 0.1% polysorbate 80 (T5) provided microbial reductions as well as physical and chemical stability, suggesting its use the dairy industry.

Keywords: Volatile Oils; Polysaccharide; Conservation; Milk Product.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Plantas <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf após seis meses de transplantação	16
Figura 2 - Estrutura química dos principais componentes identificados em óleos essenciais	24
Figura 3 - Origem dos Terpenóides e Fenilpropanóide	25
Figura 4 - Etapas, em ordem crescente, da transplantação das mudas de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf e obtenção de suas folhas (A: Planta-mãe da qual foram obtidas as mudas; B: Perfilhos de raízes nuas; C: Medição da área experimental; D: Transplantação das mudas; E: Plantas com seis meses de idade; F: Obtenção das folhas).....	31
Figura 5 - Processo de extração de óleo essencial de <i>C. citratus</i> em aparelho tipo Clevenger....	32
Figura 6 - Bureta de recepção do óleo essencial após condensação e decantação	32
Figura 7 - Fluxograma de extração de óleo essencial de <i>C. citratus</i>	33
Figura 8 - Espectrofotômetro para análise de infravermelho	33
Figura 9 - Sistema GC/MS - Shimadzu, modelo QP 5050.....	34
Figura 10 - Sistema de injeção das amostras modelo Shimadzu, modelo QP 5050.....	34
Figura 11 - Sistema de CG-FID modelo Shimadzu AOC-2010.....	35
Figura 12 - Linha de gases utilizados no sistema de cromatografia gasosa (A: Ar sintético; B: Hidrogênio; C: Hélio)	35
Figura 13 - Espectro na região do infravermelho do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf ...	38
Figura 14 - Cromatograma geral do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	39
Figura 15 - Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 3 (β -mirceno) do cromatograma da figura 13 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST (2014).....	40
Figura 16 - Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 18 (α -citral) do cromatograma da figura 13 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST (2014).....	40
Figura 17 - Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 16 (β -citral) do cromatograma da figura 13 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST (2014).....	41
Figura 18 - Resultado da concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>C. citratus</i> frente a <i>E. coli</i>	45
Figura 19 - Resultado da concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>C. citratus</i> frente a <i>S. aureus</i>	45
Figura 20 - Planta <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	57

Figura 21 - Segmento representativo de uma cadeia de galactomanana.....	74
Figura 22 - Partes individualizadas da <i>Caesalpinia pulcherrima</i> (A: Planta; B: Flores; C: Frutos; D: Sementes).....	78
Figura 23 - Fluxograma de extração de galactomananas de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	83
Figura 24 - Fluxograma de etapas da fabricação e revestimento do queijo coalho	85
Figura 25 - Processo de produção e aplicação do revestimento a base de galactomanana e óleo essencial (A: Solubilização da galactomanana em água destilada; B: Distribuição dos queijos prontos para a aplicação do revestimento; C: Aplicação do revestimento por meio de pincelagem; D: Queijos revestidos e embalados).....	86
Figura 26 - Análise de textura em equipamento texturômetro TA-XT2 com demonstração das etapas da primeira (A, B, C) e segunda compressão (D, E, F) do queijo coalho sem revestimento após 30 dias de armazenamento.....	89
Figura 27 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da solução de (20 mg.mL $^{-1}$) da galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i> em D $_2$ O.....	92
Figura 28 – Esquema de escolha da melhor formulação com base nas análises aplicadas às amostras de queijo coalho	106
Figura 29 - Demonstração dos resultados das análises microbiológicas com 30 dias de armazenamento refrigerado 4 $\pm$ 1°C (A: tubos negativos da análise de <i>Salmonella</i> em meio LIA; B: tubos negativos da análise de <i>Salmonella</i> em meio TSI; C: tubos negativos da análise de coliformes; D: Resultados negativo para análise de <i>Staphylococcus aureus</i>).....	114
Figura 30 - Resultados da intenção de compra dos queijos T1, sem revestimento; e T5, com revestimento durante o armazenamento refrigerado a 4 $\pm$ 1°C (A: Percentuais de intenção de compra durante 7 dias; B: Percentuais de intenção de compra durante 15 dias; C: Percentuais de intenção de compra durante 30 dias).....	117
Figura 31 - Valores da preferência positiva dos provadores em relação aos atributos avaliados durante o armazenamento de 30 dias a 4 $\pm$ 1°C	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ação do óleo essencial de <i>C. citratus</i> contra os microrganismos	21
Tabela 2 - Características de óleos essenciais aplicados em alimentos	29
Tabela 3 - Características químicas do solo utilizado no experimento.....	30
Tabela 4 - Identificação dos componentes do óleo essencial de <i>C. citratus</i>	41
Tabela 5 - Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (0,5µL)	43
Tabela 6 - Padrões mínimos de composição físico-química do leite.....	61
Tabela 7 - Requisitos microbiológicos previstos pela Legislação Brasileira.....	63
Tabela 8 - Definições das características de textura.....	68
Tabela 9 - Características dos polissacarídeos de reserva da parede celular.....	73
Tabela 10 - Níveis de variáveis codificadas do planejamento fatorial	91
Tabela 11 - Matriz experimental das variáveis codificadas do planejamento fatorial.....	91
Tabela 12 - Composição físico-química do leite fluido	94
Tabela 13 - Perda de peso de queijo coalho durante o armazenamento a 4±1/C	97
Tabela 14 - Resultados das análises microbiológicas dos queijos coalho com diferentes revestimentos durante o armazenamento a 4±1/C	99
Tabela 15 - Evolução dos parâmetros de umidade de queijo coalho durante o seu armazenamento a 4±1°C até 20 dias	102
Tabela 16 - Evolução da atividade de água de queijo coalho durante o seu armazenamento a 4±1°C até 20 dias	104
Tabela 17 - Evolução do pH de queijo coalho durante o seu armazenamento a 4±1°C até 20 dias	105
Tabela 18 - Composição físico-química do queijo coalho (T1-controle) e (T5-revestido) durante o seu armazenamento a 4±1/C durante 30 dias.....	107
Tabela 19 - Derretimento ao longo de 30 dias sob armazenamento refrigerado a (4±1/°C).....	110
Tabela 20 - Perfil médio de textura de queijo coalho durante o armazenameno a 4±1/C até 30 dias	111
Tabela 21 - Valores médios das notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitação global durante 30 dias de armazenamento a 4±1°C	115

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	15
CAPÍTULO I: Estudo da composição química e ação antibacteriana do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf em função da sua potencial utilização em alimentos	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1. Conceitos sobre óleos essenciais	19
3.2. Espécie vegetal em estudo: <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	20
3.3. Métodos de extrações dos óleos essenciais	22
3.4. Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	23
3.5. Mecanismo de ação dos óleos essenciais	25
3.6. Óleos essenciais provenientes de diferentes origens vegetais aplicados em alimentos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1. Cultivo e colheita da planta <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	30
4.2. Obtenção do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf.....	32
4.3. Caracterização, análise da composição química e quantificação dos constituintes do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	33
4.3.1. Análise de Infravermelho	33
4.3.2. Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-EM).....	34
4.3.3. Cromatografia gasosa com detector por ionização de chamas (CG-FID)...	34
4.4. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial.....	35
4.4.1. Método Qualitativo por Difusão	36
4.4.2. Método Quantitativo por Diluição	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. Densidade e rendimento do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf	37
5.2. Resultados da caracterização do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf por análise de infravermelho	38

5.3. Composição química do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	39
5.4. Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>C. citratus</i> (DC) Stapf.....	43
6. CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO II: Estudo da aplicação do revestimento a base de galactomanana e óleo essencial ao queijo coalho: estudo da estabilidade	57
1. INTRODUÇÃO	58
2. OBJETIVOS.....	60
2.1. Objetivo Geral.....	60
2.2. Objetivos Específicos	60
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	61
3.1. Generalidades do queijo coalho	61
3.1.1. Leite de vaca: principal componente de fabricação do queijo.....	61
3.1.2. Histórico e importância do queijo coalho para a região Nordeste	63
3.1.3. Conceito, classificação e tecnologia de fabricação do queijo coalho	66
3.1.4. Principais microrganismos patogênicos presentes em queijo.....	69
3.2. Polissacarídeos: Uma ênfase nas galactomananas	71
3.2.1. Aspectos gerais sobre polissacarídeos.....	71
3.2.2. Conceitos e composição química das galactomananas	73
3.2.3. <i>Caesalpinia pulcherrima</i> (L.) Sw	77
3.2.4. Utilização de galactomananas como revestimentos	78
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.1. Materiais	81
4.2. Obtenção da galactomanana de <i>Caesalpinia pulcherrima</i>	81
4.3. Caracterização da galactomanana: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear	82
4.4. Processo de fabricação do queijo coalho	84
4.5. Preparo da película de revestimento e incorporação do óleo essencial	86
4.6. Caracterização microbiológica e físico-química da matéria-prima	87
4.7. Estabilidade dos queijos revestidos: Seleção da melhor formulação.....	87
4.8. Avaliação da estabilidade do produto final: queijo tipo coalho com revestimento constituído de 1% GAL e 0,2% OE e queijo controle	87

4.8.1. Composição físico-química dos queijos selecionados	88
4.8.2. Perfil de textura dos queijos selecionados.....	88
4.8.3. Análise da capacidade de derretimento dos queijos selecionados	89
4.8.4. Avaliação microbiológica dos queijos selecionados.....	90
4.8.5. Avaliação sensorial e Intenção de compra dos queijos selecionados	90
4.9. Delineamento experimental	91
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
5.1. Rendimento da galactomanana de <i>C. pulcherima</i>	92
5.2 Espectroscopia de RMN ¹ H.....	92
5.3. Caracterização da matéria-prima para a fabricação do queijo	93
5.4. Avaliação da estabilidade de queijo coalho com diferentes revestimentos comestível: Seleção da melhor formulação a base de galactomanana e óleo essencial .	96
5.4.1. Caracterização física e perda de peso.....	96
5.4.2. Resultados das análises microbiológicas dos queijos	98
5.4.3. Resultados das análises físico-químicas dos queijos	102
5.5. Caracterização do queijo coalho com revestimento comestível constituído de 1% de galactomananas e 0,2% de óleo essencial	105
5.5.1. Composição físico-química	106
5.5.2. Capacidade de derretimento	110
5.5.3. Perfil de textura instrumental.....	111
5.5.4. Resultados microbiológicos.....	113
5.5.5. Análise sensorial e intenção de compra e avaliação da preferência positiva	114
6. CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
DISCUSSÃO GERAL	128
CONCLUSÃO GERAL	129
ANEXOS.....	130

1 INTRODUÇÃO GERAL

Ao confrontar o passado com a realidade hoje, pode-se perceber o grande avanço tecnológico, principalmente no segmento alimentar. As embalagens surgiram como peça fundamental para a conservação dos alimentos. Entretanto, sua utilização trouxe consigo uma desvantagem, a poluição ambiental. Neste sentido, a ciência dos alimentos, através de estudos e pesquisas, tenta inovar tipos de embalagens que, além de proteger e manter a qualidade intrínseca do alimento por mais tempo, gere também, menores malefícios ao meio ambiente.

Os biopolímeros extraídos de plantas do Ceará têm sido alvo de pesquisas sendo utilizadas como revestimentos comestíveis ou biodegradáveis capazes de diminuir as taxas de alterações devido ao crescimento microbiano, alterações físicas, bem como os impactos ambientais provocados por embalagens não biodegradáveis. Por isso, o desenvolvimento de filmes comestíveis à base de biopolímeros tem sido motivado devido ao volume de lixo gerado pelo descarte das embalagens convencionais (AZEREDO, 2012). As tendências internacionais buscam a introdução de fontes alternativas de polissacarídeos de sementes para a produção de filmes e revestimentos comestíveis. Em particular, as fontes de galactomananas estão sendo investigadas (CERQUEIRA et al., 2009). A leguminosa *Caesalpinia pulcherrima*, conhecida como flamboianzinho, é uma árvore com ampla produção de sementes, de fácil plantio e crescimento, representando um biomaterial de baixo custo, alta disponibilidade e apresenta no endosperma da semente alto teor de galactomananas (FRANCA et al, 2010).

O *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, pertence à família *Poaceae*, amplamente distribuído na natureza, possuindo comprovada ação antimicrobiana, e por isso, diversos pesquisadores, têm buscado a sua comprovação quando aplicado nos processamentos alimentícios (SANTOS et al., 2009). Portanto é justificável o estudo de um revestimento para queijo coalho elaborado com estes materiais, visto que este produto apresenta uma excelente composição nutricional. Entretanto, também constituem-se de meios propícios para o desenvolvimento de microorganismos. Este alimento, tipicamente da culinária do sertão nordestino brasileiro, é baseado na simples coagulação do leite, na prensagem da massa e na salga, representando importância elementar na economia desta região.

A pesquisa foi dividida em dois capítulos, onde o primeiro trata do estudo do óleo essencial de *C. citratus* como forma de avaliar a sua potencial aplicação em alimentos. E o segundo capítulo trata da aplicação do revestimento constituído de galactomanana e óleo essencial, em queijo coalho com objetivo de analisar a interferência do revestimento na estabilidade microbiológica, físico-química e sensorial deste produto.

CAPÍTULO I

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÃO ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf EM FUNÇÃO DA SUA POTENCIAL UTILIZAÇÃO EM ALIMENTOS

Figura 1: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf após seis meses de transplantação.



Fonte: Limoeiro do Norte, 2013.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais de plantas possuem substâncias bioativas e diversos pesquisadores entre eles, os da área de alimentos têm buscado a sua comprovação quanto a sua ação inibidora do crescimento microbiano, assim como sua inserção no processamento de alimentos sem alterar suas características. Araújo (2008) e Martins et al. (2011), ressaltam que os óleos essenciais são substâncias muito estudadas em vários ramos da ciência, sendo a indústria de alimentos uma das maiores beneficiadas.

Os alimentos possuem uma composição intrínseca excelente para o desenvolvimento de microrganismos, que quando associado a práticas inadequadas no processamento e armazenamento, proporcionam condições favoráveis para uma ampla variedade de espécies patogênicas, indesejáveis ao alimento e, principalmente, a saúde do consumidor. Diante dessa realidade e buscando novas técnicas naturais de preservação dos alimentos, a adição de óleos essenciais nos alimentos torna-se um potencial sistema de bioconservação, visto que podem prolongar a vida útil dos alimentos, mantendo-os com qualidade em relação a suas características microbiológicas (TRAJANO et al., 2009).

Estudos têm comprovado a ação antimicrobiana de diversos óleos essenciais provenientes de diferentes origens vegetais. Entretanto, a utilização e eficiência desses produtos são limitadas pela falta de padronização da atividade dessas substâncias. A pesquisa das técnicas para caracterizar estes materiais é incipiente, pois, relatos de resultados apresentam-se distintos, mesmo quando aplicado iguais condições de experimento (ALVES et al., 2008; NASCIMENTO et al, 2006; OSTROSKY et al, 2008).

Muitos fatores podem influenciar na composição química dos óleos, e consequentemente nos resultados quanto a sua atividade frente aos microrganismos. Tais como a genética da planta, o manejo de cultivo, a região, variações climáticas, a época e o horário de colheita, assim como a técnica empregada para a extração do óleo essencial e o seu armazenamento (COSTA et al., 2005; OLIVEIRA, 2011; SANTOS et al., 2009).

Os óleos essenciais podem ser empregados junto à massa alimentar durante o processamento ou incorporados aos revestimentos e filmes comestíveis para posterior aplicação, buscando inovar a ciência de alimentos e beneficiando os produtores e consumidores dos diferentes segmentos alimentares os quais podem ser inseridos nessa nova tecnologia, constituindo-se de base para a produção de conservantes naturais (NGUEFACK et al., 2012; DURANGO, SOARES e ARTEAGA, 2011; TRAJANO et al., 2010).

Além dos recentes estudos da manipulação de óleos essenciais com ação antimicrobiana, tem-se avaliado diferentes misturas de óleos essenciais a fim de comprovar os seus níveis de sinergismo ou antagonismo, visto que não se pode afirmar que o componente majoritário é o que realiza a atividade biológica, podendo haver a interação entre os diferentes componentes do óleo. Além disso, o estudo dessas misturas de óleos possui a finalidade de maximizar a atividade e minimizar as concentrações para não haver interferência diante das características sensoriais dos alimentos (NGUEFACK et al., 2012).

Em paralelo, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido motivo de inúmeros estudos visando compreender as suas propriedades, mesmo em plantas com potencial comprovado, como o *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, cuja literatura sugere os componentes α e β -citral como o principal responsável pela atividade frente aos microrganismos (COSTA et al., 2005; ZAGO et al., 2009). O óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf apresenta atividade contra uma gama diversificada de organismos incluindo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras e fungos (NAIK et al., 2010). Neste contexto, o óleo essencial de *C. citratus* (D.C.) Stapf tem sido amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, cosméticos, perfumaria, para fins medicinais e nos processos alimentícias (MARTINAZZO et al., 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf com intuito de analisar seu potencial uso em alimentos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o rendimento da extração do óleo essencial;
- ✓ Determinar a composição química do óleo essencial;
- ✓ Caracterizar o óleo essencial;
- ✓ Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Conceitos sobre óleos essenciais

Os óleos essenciais são, geralmente, uma mistura complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos. Ocorrem em todo o tecido vivo da planta, geralmente concentrados na casca, nas flores, no rizoma e nas sementes (ARAÚJO, 2011; BRITO, 2007).

De acordo com a ISO 9235:1997, óleos essenciais são produtos obtidos a partir da matéria prima natural de origem vegetal, por meio de destilação por arraste a vapor d'água, ou por processos mecânicos, no caso do pericarpo de frutos cítricos. Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos ao processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes (BRASIL, 1999; SANTURIO, 2011).

Sua composição química pode variar de acordo com a diversidade genética, o habitat e os tratos culturais. O ambiente no qual o vegetal se desenvolve e o tipo de cultivo influem na composição química dos óleos essenciais. A temperatura, umidade relativa do ar, duração total da exposição ao sol e o regime de ventos exercem influência direta, principalmente nas espécies que possuem estruturas histológicas de estocagem de óleos na superfície. Por outro lado, nos vegetais em que a localização de tais estruturas é mais profunda, a qualidade é mais constante. O grau de hidratação do terreno e a presença de nutrientes também podem influenciar na sua composição (BRITO, 2007).

Os principais constituintes dos óleos essenciais que conferem suas características sensoriais são os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides (BIZZO et al., 2009).

Em geral, os óleos essenciais, na presença de oxigênio, luz, calor, umidade e metais são muito instáveis, sofrendo reações de degradação, o que dificulta a sua conservação, fazendo com que o seu processo de armazenamento seja fundamental para a manutenção de sua qualidade (GUIMARÃES, 2008).

A qualidade dos óleos essenciais está diretamente relacionada com a manutenção da sua funcionalidade, visto que apresentam diferentes propriedades bioativas, como atividade antioxidante (WANNES et al., 2010), ação analgésica e anti-inflamatória (MENDES et al., 2010), fungicida (CARMO, LIMA e SOUZA, 2008; NGUEFACK et al., 2012) e antibacteriana (OKOH et al., 2010; SILVA et al., 2009).

3.2 Espécie vegetal em estudo: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

No decorrer do tempo têm-se observado um grande interesse por parte de vários pesquisadores por espécies vegetais e estas têm sido estudadas com grande afinco para posterior aplicação em diversos fins. Seus óleos essenciais que apresentam inúmeras propriedades funcionais são um dos principais responsáveis pelo interesse nestas espécies.

A flora brasileira é muito diversificada e o gênero *Cymbopogon* possui mais de 100 espécies nos países tropicais, inclusive no Brasil, dentre as quais, aproximadamente 56 são aromáticas (OLIVEIRA et al., 2011). Dentro deste gênero, encontra-se a espécie *Cymbopogon citratus* (DC), a qual foi descrita inicialmente como *Andropogon citratus* por De Candolle e re-classificada por Otto Stapf (GOMES e NEGRELLE, 2003).

O *C. citratus* (DC) Stapf é uma espécie originária da Índia, e foi introduzida no Brasil possivelmente no período colonial, sendo utilizado como planta ornamental (CASTRO e RAMOS, 2003). Pertence à família *Poaceae*, considerada uma espécie herbácea, perene e espontânea, com longas folhas aromáticas, estreitas, agudas e ásperas com nervura central proeminente, com lâmina de cor verde-grisácea com veios bem visíveis na face inferior e de cor verde-brilhante e lisa na face superior, lígula e bainha forte, não-articulada com o limbo. Formando touceiras compactas e robustas de até 1,2 m de altura, com rizoma semi-subterrâneo (COSTA et al., 2005; SANTOS et al., 2009). As flores são em espiguetas sésseis, canaliculadas no lado ventral, situando-se sobre ráquis que formam racimos curtos, que por sua vez, formam panículas contraídas, bracteosas e terminais. O plantio é realizado entre os meses de agosto a outubro, e a colheita da parte aérea, tais como folhas e colmos novos, inicia-se seis meses após o plantio (CASTRO e RAMOS, 2003).

Esta gramínea se destaca entre as espécies aromáticas do gênero devido às folhas ricas em óleo essencial de interesse às indústrias devido principalmente ao citral, seu componente majoritário (LEMOS et al., 2013). É popularmente conhecida como erva-cidreira, capim-cidreira, capim limão, capim-santo ou capim-cidrão, sendo amplamente distribuído em todo o mundo, especialmente nos países tropicais e subtropicais (SANTOS et al., 2009; TOVAR et al., 2010; FRANCISCO et al., 2011; CHANTHAI et al., 2012).

Segundo Zago et al. (2009), a utilização de plantas medicinais é uma prática antiga e predominante em países em desenvolvimento, onde existe uma dependência na denominada medicina popular como solução alternativa para problemas de saúde.

Neste sentido, o capim limão, assim como a maioria das plantas medicinais, são comumente usada na medicina popular. O capim limão é utilizado para tratamento de

distúrbios nervosos e gastrintestinais e como um antiespasmódico, analgésico, anti-inflamatório, anti-pirético, diurético, sedativo, remédios contra hipertensão, antitérmico e para reduzir a dor e a inflamação associada com reumatismo, gripes e resfriados, infecções bacterianas e fúngicas da garganta, e trato urinário. Também é aproveitada com finalidades agronômicas, mas a sua maior importância econômica reside na produção do seu óleo essencial (COSTA et al., 2005; NEGRELLE e GOMES, 2007; SANTOS et al., 2009; BASSOLÉ et al., 2011; KHAN e AHMAD, 2012; CHANTHAI et al., 2012).

Suas propriedades são principalmente devido ao citral, seu componente majoritário. Citral é o nome dado a uma mistura de neral (cis-citral) e geranial (trans-citral), que podem corresponder de 65 a 86% do óleo essencial, apresentando-se em maior quantidade nas folhas jovens, sendo o principal responsável pelo odor de limão (TOVAR et al., 2010; MARTINAZZO et al., 2010; KHAN e AHMAD, 2012; CHANTHAI et al., 2012).

A literatura ressalta a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf frente a microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*) Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*), leveduras e fungos (NAIK et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Neste contexto, o óleo essencial de *C. citratus* (D.C.) Stapf tem sido amplamente utilizado nas indústrias farmacêuticas, cosméticos, perfumaria, para fins medicinais e nos processos alimentícios (MARTINAZZO et al., 2010).

Na tabela 1 está expresso a ação do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf frente a diferentes microrganismos Gram-positivos, Gram-negativos e fungos, os quais podem estar presentes como contaminantes em alimentos.

Tabela 1: Ação do óleo essencial de *C. citratus* contra os microrganismos.

Microrganismo	Concentração eficiente do óleo essencial	Referência
<i>Candida albicans</i>	0,63 mg/ML	SANTOS et al, 2009
<i>C. tropicalis</i>	1,25 mg/ML	SANTOS et al, 2009
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,08 mg/mL	SANTOS et al, 2009
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,25 mg/ML	SANTOS et al, 2009
<i>Escherichia coli</i>	0,63 mg/mL	SANTOS et al, 2009
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,56% v/v (15.6 µl/ml)	OLIVEIRA, et al., 2010
<i>Brevicoryne brassicae</i>	0,1% v/v	LIMA, et al., 2008
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1000 ppm	NGUEFACK et al., 2009
<i>Penicillium expansum</i>	2000 ppm	NGUEFACK et al., 2009
<i>P. verrucosum</i>	2000 ppm	NGUEFACK et al., 2009

3.3 Métodos de extrações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais podem ser obtidos por diferentes técnicas e suas propriedades dependem do tipo de extração. Os métodos mais utilizados são extração por hidrodestilação, prensagem a frio, extração por solventes orgânicos, por alta pressão ou por CO₂ supercrítico. Entretanto, a escolha do método varia conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade de utilização do mesmo (JAKIEMIU, 2008; OKOH et al., 2010; SIMÕES, et al. 2007 citado por TELES, 2010). O método empregado na extração de um óleo essencial pode alterar suas características químicas, pois o calor e a pressão utilizados no ato da extração podem, por exemplo, interferir na qualidade final do óleo, pois no momento da extração as moléculas de um princípio ativo podem ser quebradas e oxidadas em produtos de menor eficácia, ou, às vezes, tóxico (BRUM, 2010).

O método de enfloração é utilizado para extração de óleos essenciais de matérias-primas delicadas como pétalas de flores. As pétalas são depositadas, a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura, durante um determinado tempo. Em seguida as pétalas esgotadas são substituídas por novas até a saturação total, quando a gordura é tratada com álcool. O álcool então é destilado a baixa temperatura, obtendo-se assim o óleo essencial (OLIVEIRA e JOSÉ, 2007; JAKIEMIU, 2008).

A extração de óleos essenciais por prensagem a frio (pressão hidráulica) ou esclerificação é um método de extração mecânica. Ele é usado para obter óleo essencial de frutos cítricos. Neste processo, as frutas são prensadas e delas é extraído tanto o óleo essencial quanto o suco. Após a prensagem é feita a centrifugação da mistura, a fim de separar o óleo essencial puro. Este método não é somente utilizado para extração de óleos essenciais de cítricos, mas de maneira semelhante é utilizado para extração do óleo extravirgem de amêndoas, castanhas, nozes, germe de trigo, oliva, semente de uva e também de algumas sementes das quais se extrai normalmente o óleo essencial por destilação, como o cominho negro (OLIVEIRA e JOSÉ, 2007).

A extração com solventes orgânicos é usada no mundo todo para obter maior rendimento ou produtos que não podem ser obtidos por nenhum outro processo (JAKIEMIU, 2008). Apresenta a vantagem de permitir que sejam extraídos os componentes lipofílicos, porém esse processo trás como principais desvantagens o fato dos solventes clássicos serem geralmente pouco seletivos e os extratos obtidos apresentarem muitas vezes uma cor escura e uma consistência viscosa. Além disso, a eliminação do solvente aumenta os custos

energéticos e os riscos de perda dos compostos voláteis, sendo, na maioria das vezes, impossível a remoção completa do solvente (JÚNIOR, 2011).

A extração por fluidos supercríticos é uma técnica que utiliza o poder do solvente em temperatura e pressão próximas ao ponto crítico. O solvente mais utilizado nesta técnica é o dióxido de carbono (CO₂), devido ao seu baixo custo, à temperatura crítica considerada baixa (31,1°C) e a pressão crítica facilmente alcançável (72,85 atm), além de ser um solvente inodoro, quimicamente inerte e sem risco ambiental. Essa técnica vem sendo considerada uma das mais promissoras para a área da alimentação. A única desvantagem é que o processo demanda custos altos, dificultando a implantação da técnica (JAKIEMI, 2008).

A extração por hidrodestilação é realizada por meio do método Clevenger, onde a matriz é imersa em água destilada e o processo é realizado à temperatura de ebulição da mistura. O aquecimento até 100°C provoca formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis. A mistura de vapor e soluto passa por um condensador e, após a condensação, os compostos solúveis separam-se da água por decantação (BRUM, 2010). Este método foi utilizado por diversos autores para extração do óleo essencial de *C. citratus*, tais como Santos et al. (2009), ao avaliar o rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial proveniente de *C. citratus*; por Oliveira et al. (2010), ao analisar o efeito do óleo essencial de *C. citratus* frente a *Listeria monocytogenes*; e por Nguefack et al. (2009) quando avaliando frações de óleos de diferentes espécies vegetais, dentre eles, de *C. citratus* frente a fungos produtores de micotoxinas. E também por Guimarães et al. (2008) ao avaliar a influência da luz e temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de *C. citratus*.

3.4 Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

A composição dos óleos essenciais das espécies vegetais é diversificada, sendo a principal responsável por conferir suas propriedades funcionais. Entretanto, há múltiplos fatores que podem ser responsáveis pela variabilidade química, como as características edafoclimáticas, que são extrínsecas à biologia vegetal, e outros dependentes da fisiologia das plantas ou do seu genoma, como a ontogenia, tipo de órgão e os quimiotipos, além do manejo cultural, à forma de extração e o armazenamento (ZAGO et al., 2009; SANTURIO, 2011).

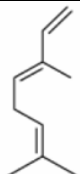
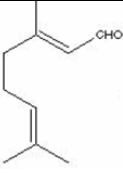
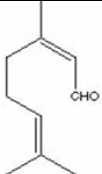
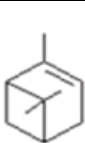
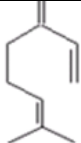
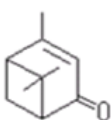
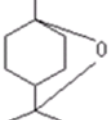
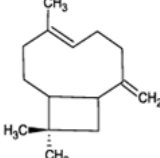
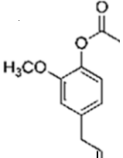
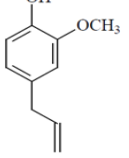
O citral e o mirceno são os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, sendo o citral constituído pela mistura isomérica de aldeídos monoterpênicos acíclicos: geranial ((2E)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral A ou isômero E) e neral ((2Z)-3,7-dimetilocta-2,6-dienal, citral B ou isômero Z), sendo considerado o

responsável pelas atividades atribuídas a esse óleo essencial. O mirceno, outro composto que pode ser encontrado em teores significantes no óleo essencial do capim limão e também em outras variedades de plantas, é um monoterpene acíclico, de nome sistemático 7-metil-3-metileno-1,6-octadieno (GUIMARÃES, 2008).

A composição química do óleo essencial de *C. citratus* é bastante diversificada. Oliveira et al. (2011) identificaram os componentes mirceno, (Z) β -ocimeno, (E) β -ocimeno, linalol, neral, geraniol, geranial e 2-undecanona no óleo essencial de *C. citratus* quando avaliados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa. Costa et al. (2005) encontraram variações nos teores do citral ao avaliar diferentes métodos de secagem e fragmentação das folhas, variando de 69,60 a 84,42%.

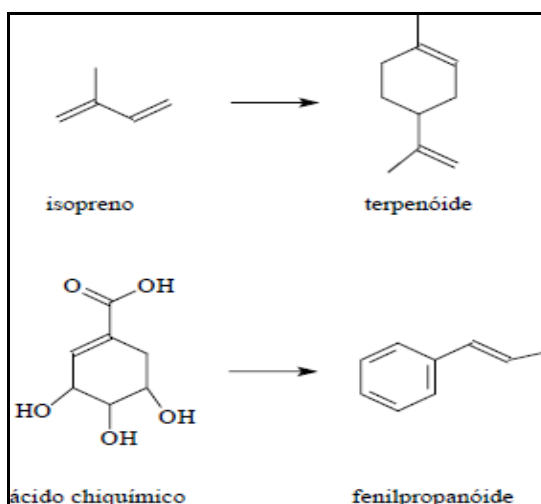
A caracterização química dos componentes dos óleos essenciais é realizada, normalmente, por cromatografia gasosa por espectrometria de massa. A identificação de compostos orgânicos de extratos de plantas é de grande importância. Sendo que estes extratos são uma mistura complexa de compostos orgânicos, requerem técnicas apropriadas de fracionamento que permitam uma melhor análise de seus constituintes individuais. A cromatografia gasosa é usada quase que exclusivamente para a análise qualitativa de voláteis. Os tempos de retenção são utilizados como critério primário para a identificação dos picos. O espectrômetro de massa usado como detector cromatográfico oferece dados adicionais para a identificação dos compostos separados (ARAÚJO, 2008). A figura 2 apresenta as estruturas químicas dos componentes majoritários identificados de diferentes óleos essenciais.

Figura 2: Estrutura química dos principais componentes identificados em óleos essenciais.

				
Mirceno (BRITO, 2007)	Geranial (BRITO, 2007)	Neral (BRITO, 2007)	α -Pipeno RIBEIRO <i>et al.</i> , (2012)	α - Mirceno RIBEIRO <i>et al.</i> , (2012)
				
Verbenona RIBEIRO <i>et al.</i> , (2012)	1,8 Cineol RIBEIRO <i>et al.</i> , (2012)	β – Cariofileno (AFFONSO <i>et al.</i> , 2012)	Acetato de Eugenila (AFFONSO <i>et al.</i> , 2012)	Eugenol (MORAIS <i>et al.</i> , 2009)

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados de terpenóides e ou de fenilpropanóides, sendo que os primeiros preponderam. Os terpenóides são derivados de unidades do isopreno e os fenilpropanóides se formam a partir do ácido chiquímico, que forma as unidades básicas dos ácidos cinâmicos e p-cumárico. A Figura 3 apresenta a origem dos terpenóides e fenilpropanóides segundo LUPE (2007).

Figura 3: Origem dos Terpenóides e Fenilpropanóides



Fonte: LUPE, 2007.

3.5 Mecanismo de ação dos óleos essenciais

São escassos os estudos a respeito do mecanismo pelo qual os óleos essenciais exercem seu efeito frente à célula microbiana. O mecanismo de ação pelo qual a maioria dos óleos essenciais exerce seu efeito antibacteriano envolve a parede celular, onde os óleos essenciais desnaturam e coagulam proteínas. Mais especificamente, eles atuam alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons hidrogênio e potássio. A alteração dos gradientes de íons conduz ao comprometimento dos processos vitais da célula como transporte de elétrons, translocação de proteínas, processo de fosforilação e outras reações dependentes de enzimas, resultando em perda do controle quimiosmótico da célula afetada e, consequentemente, na morte do microrganismo (DORMAN e DEANS, 2000 citado por BONA et al., 2012).

Os mecanismos de ação antimicrobiana foram parcialmente elucidados para algumas espécies, por exemplo, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* causa lise e perda da integridade da membrana, devido à saída de íons e inibição da respiração (CARSON et al.,

2006). Azerêdo et al. (2012), avaliando o efeito citotóxico dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. sobre *Aeromonas hydrophila*, observaram uma diminuição no consumo de glicose pelo microorganismo e liberação de material celular imediatamente após a adição de óleos essenciais, tanto isoladamente como os dois óleos combinados. A microscopia eletrônica das células expostas aos óleos essenciais revelaram graves alterações na membrana plasmática, aparência citoplasmática e forma da célula após seis horas de exposição.

Em relação ao *C. citratus*, o neral e geranial, cuja mistura constituem o citral, principal elemento responsável pelo caráter antimicrobiano possui o mecanismo de ação baseado em aumentar a permeabilidade da membrana celular, a partir de uma provável interação hidrofóbica com a membrana (OLIVEIRA et al., 2011).

De acordo com Silva et al. (2009), diferenças entre resultados podem ocorrer também quanto à sensibilidade de linhagens diferentes de um determinado microrganismo frente a um mesmo produto antimicrobiano vegetal, mesmo quando a metodologia utilizada é idêntica. Em seu estudo avaliando a atividade antibacteriana de óleos essenciais provenientes de seis espécies vegetais frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, encontraram uma maior resistência da bactéria Gram negativa, a qual necessitou de uma maior quantidade dos óleos essenciais testados. Para os óleos de alecrim, cravo da Índia, gengibre, capim limão e hortelã pimenta os valores de concentração inibitória mínima foram de >3,0; 0,25; 0,24; 0,40 e 0,63 % (v/v de óleo essencial diluído em meio de cultura) para *E. coli*, enquanto os valores encontrados frente a bactéria Gram positiva foram de 0,40; 0,073; 0,04; 0,1, e 0,19, % (v/v de óleo essencial diluído em meio de cultura) respectivamente.

Naik et al. (2010), avaliando a atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* (DC) Stapf frente a bactérias patogênicas, constataram também que os microrganismos Gram positivos são mais sensíveis do que os Gram negativos. Bassolé et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de *C. citratus* e *C. giganteus* sozinhos e combinados contra um conjunto de nove microrganismos observaram que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou maior atividade contra *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. dysenteriae*. O óleo de *C. giganteus* exibiu uma atividade consideravelmente mais forte do que a de *C. citratus* quando testado contra *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Ambas espécies de *Cymbopogon*, mostram semelhante atividade contra *E. aerogenes*.

3.6 Óleos essenciais provenientes de diferentes origens vegetais aplicados em alimentos

A ação inibitória dos extratos vegetais tem sido alvo de interesse por pesquisadores da área de alimentos, e os consumidores apresentam uma tendência em relação ao consumo de alimentos naturais, considerando a sua inclusão em sistemas de conservação em detrimento aos aditivos sintéticos, visto que podem promover maior vida útil dos alimentos. A utilização de extratos vegetais em alimentos fundamenta-se no crescente estudo do seu potencial antimicrobiano, principalmente em relação àqueles, normalmente, presentes em alimentos. A finalidade de tais aplicações corresponde ao desafio de manter inócuos os alimentos *in natura* e processados, preservando-os íntegros quanto aos seus aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais.

Trajan et al. (2009), investigaram as propriedades antimicrobianas de óleos essenciais de várias espécies vegetais frente a 10 cepas bacterianas contaminantes de alimentos e evidenciaram que os extratos de *Eugenia caryophyllata* e de *Cinnamomum zeylanicum* mostraram-se eficientes na inibição de todas as cepas testadas, sendo considerados produtos promissores e uma boa alternativa para a substituição de aditivos químicos.

Al-Bayati (2008), avaliando também o efeito sinérgico da atividade antibacteriana entre *Thymus vulgaris* e *Pimpinella anisum*, contra nove bactérias Gram positivas e Gram negativas, revelou que a atividade máxima dos extratos foram observados contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Proteus vulgaris*, sendo que as combinações mostraram uma ação aditiva para a maioria dos patógenos testados, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*. Azerêdo et al. (2012), avaliando as atividades antibacterianas dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L., isolados e combinados, sobre *Aeromonas hydrophila*, obtiveram uma diminuição significativa da viabilidade bacteriana após 24 horas de exposição. Os autores ressaltaram que os óleos em estudo poderiam ser racionalmente aplicados para inibir o crescimento do *A. hydrophila* em produtos alimentares, particularmente em produtos minimamente processados, como os legumes.

Sousa et al. (2012), avaliando a sinergia dos componentes carvacrol e 1,8-cineol a fim de inibir as bactérias associadas aos vegetais minimamente processados, obtiveram resultados satisfatórios, visto que os compostos combinados foram eficazes em inibir o crescimento e sobrevivência de patógenos e deteriorantes de vegetais. Em relação a avaliação sensorial, a aplicação dos compostos sozinhos ou em misturas como desinfetantes em vegetais apresentaram-se aceitáveis pelos consumidores.

Kumar et al. (2008), em seu estudo sobre óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., como antifúngico pós-colheita de produtos alimentares, obtiveram grande eficácia antifúngica, inibindo o crescimento micelial de *Aspergillus flavus* em $0,7 \mu\text{l ml}^{-1}$, exibindo um amplo espectro antifúngico contra oito diferentes alimentos contaminados com *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium herbarum*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria alternata* e *Botryodiplodia theobromae*.

Poucos estudos tratam da aplicação do óleo essencial de *C. citratus* em alimentos. Nguefack et al. (2012), avaliaram o sinergismo e antagonismos das frações de óleos essenciais óleos essenciais, dentre eles, o *Cymbopogon citratus* sobre duas cepas de *Penicillium expansum*, fungo pós-colheita com potencial efeito toxicológico e responsável pela deterioração de frutos e vegetais, principalmente em maçãs. Entre as 23 misturas dos óleos essenciais testados, quatro exibiram efeito sinérgico; uma exibiu efeito aditivo e 18, antagônico. Esses efeitos foram correlacionados com a composição química das frações dos óleos essenciais e suas misturas. Os efeitos sinérgicos observados podem ser explorados a fim de maximizar a atividade antimicrobiana de óleos essenciais.

Bastos et al. (2013), elaboraram filmes ativos de base celulósica com incorporação de óleo essencial de *C. citratus* a partir do método de *casting*, sendo este idealizado para aplicações em queijo coalho. Machado et al. (2014) avaliaram o efeito antimicrobiano do óleo essencial de *C. citratus* contra *Listeria monocytogenes* inoculado em repolhos armazenados sob refrigeração. Tais autores inferiram que o óleo analisado tem potencial para controle de patógenos em vegetais. Machado et al. (2013) avaliaram o óleo de *C. citratus* frente a *Salmonella typhimurium* também em amostras de repolho.

É importante salientar o exposto por Barbosa (2010) que ressalta a necessidade de estudos que demonstrem o impacto dos produtos naturais utilizados como conservantes tanto em relação a qualidade, como também direcionada a aceitação sensorial pelos consumidores.

A aplicação dos óleos essenciais em alimentos estão diretamente relacionados a sua efetiva ação contra os microrganismos. Porém, vale ressaltar que as técnicas de determinação da atividade antimicrobiana podem influenciar nos resultados relacionados com a ação que os óleos essenciais podem apresentar frente aos microrganismos. Por exemplo, Alves et al. (2008), realizando um estudo comparativo entre as técnicas de poços, discos e *template*, obtiveram valores distintos estatisticamente ao avaliar os diâmetros de inibição do crescimento microbiano do extrato de *Miconia rubiginosa* frente aos microrganismos *E. fecalis*, *K. rhizophila*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, em que a técnica de poços obteve melhores resultados, visto que apresentou halos de inibição na maioria das bactérias testadas.

No Brasil, os testes de avaliação antimicrobiana são padronizados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária com autorização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), sendo utilizados para analisar agentes antimicrobianos convencionais, como os antibióticos. Nos testes de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a metodologia padrão do CLSI não pode ser seguida à risca, em razão das propriedades químicas que estes apresentam, portanto, utiliza-se uma pequena modificação com o disco de papel filtro impregnado com a substância teste (HENTZ e SANTIN, 2007).

A tabela 2 mostra as características de óleos essenciais de diferentes origens vegetais aplicados em alimentos, dentre eles o de *C. citratus*.

Tabela 2: Características de óleos essenciais aplicados em alimentos.

Espécie	Nome Popular	Aplicação em Alimentos	Propriedade	Princípio Ativo	Referência
<i>Cymbopogon citratus</i>	Erva-cidreira, capim limão	Frutos e vegetais	Antifúngica	Mirceno, Geranial, Neral	Nguefack et al. (2012)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Alfavaca	Frutos e vegetais	Antifúngica	Eugenol, e γ -muuroleno, β -cariofileno	Nguefack et al. (2012)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho	Frutos e vegetais Peixe	Antifúngica Antibacteriana	timol, <i>p</i> -cimeno, carvacrol, terpineno, linalol e borneol	Nguefack et al. (2012) Jakiemiu et al (2010) Holley e Patel (2005)
<i>Origanum vulgare</i> L.	Orégano	Legumes minimamente processados	Antibacteriana	Carvacrol	Azerêdo et al. (2012)
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Alecrim	Legumes minimamente processados	Antibacteriana	1,8 cineol,	Azerêdo et al. (2012)
<i>Eugenia caryophyllata</i>	Cravo	Queijo coalho Cozido de porco	Antibacteriana	Eugenol, humullene α , d-cadineno	Trajano et al. (2009) Holley e Patel (2005)
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	Queijo gordo	Antibacteriana	Eugenol, 2-Metil-5-(Metiletenil)-	Dias (2009) Holley e Patel (2005)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e colheita da planta *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

As plantas de *Cymbopogon citratus* foram cultivadas na Unidade Experimental de Pesquisa e Extensão do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Limoeiro do Norte localizado no Distrito de Irrigação Jaguaribe-Apodi, em Limoeiro do Norte, CE, entre as coordenadas 5°20' de latitude Sul e 38°5' de longitude Oeste.

De acordo com a classificação climática de Köppen, o clima é do tipo BSw'h'. A região apresenta os seguintes valores médios anuais: precipitação de 772 mm, irregular; temperatura de 28,5 °C; umidade relativa de 62% e insolação de 3.030 horas (DNOCS, 2006 citado por SANTOS et al., 2008). O solo da área experimental apresenta textura franco-argilo-arenosa, relevo uniforme, plano e declividade muito suave (BASTOS, 2004) e pertence à ordem dos cambissolos, subordem cambissolo háplico, derivado de rochas calcárias, formação Jandaíra (EMBRAPA, 1999 citado por SANTOS et al., 2008). A tabela 3 mostra a composição química do solo, o qual foi coletado nos 20 cm superficiais.

Tabela 3 - Características químicas do solo utilizado no experimento.

Características químicas	Profundidade de coleta (cm)
	0 – 0,20
C (g/kg)	11,33
M.O. (g/kg)	19,54
P (mg dm ⁻³)	4
K (mmolc/dm ³)	11,82
Ca (mmolc/dm ³)	107,02
Mg (mmolc/dm ³)	21,8
Na (mmolc/dm ³)	0,85
H + Al (mmolc/dm ³)	15,7
SB (mmolc/dm ³)	141,6
CTC (mmolc/dm ³)	157,3
V (%)	90
PST (%)	1
CE (dS/m)	0,31
pH	6,8

Fonte: Laboratório de solos do IFCE, Limoeiro do Norte (2013).

A distribuição das mudas de *C. citratus* (DC) Stapf foi realizada em outubro de 2012 em uma área de 5 m². A adubação do solo para cada m² foi constituída de 200 g de superfosfato simples (18% P₂O₅) e 20 L de composto orgânico. O plantio foi constituído por 15 mudas para cada m², totalizando 75 mudas por 5 m², as quais foram originadas de uma

única planta-mãe sendo obtidas por divisão de touceira, utilizando-se perfilhos de raízes nuas (clones geneticamente iguais), padronizadas com 30 cm acima da base, mantendo-se 3 cm do limbo, enterrando-se o terço basal diretamente no solo. As mesmas foram propagadas em fileiras com espaçamentos de 20 cm entre as mudas. A figura 4 apresenta as etapas de individualização das mudas, transplantação e obtenção das folhas de *C. citratus* (DC) Stapf. A irrigação foi realizada no início do cultivo por intermédio de regadores mecânicos e mantida diariamente através de aspersão mecânica.

A colheita do material vegetal foi realizada no período da manhã, seis meses após a distribuição das mudas, sendo colhidas no mês de maio de 2013. Em seguida, o material vegetal fresco foi embalado em sacos plásticos e armazenados a temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas, a fim de inibir o metabolismo das folhas até a extração do óleo essencial.

A exsicata com amostra do material vegetal foi depositada com numeração 16473 no Herbário Professor Francisco José de Abreu Matos da Universidade Estadual Vale do Acaraú, localizado em Sobral, Ceará.

Figura 4: Etapas, em ordem crescente, da transplantação das mudas de *C. citratus* (DC) Stapf e obtenção de suas folhas (A: Planta-mãe da qual foram obtidas as mudas; B: Perfilhos de raízes nuas; C: Medição da área experimental; D: Transplantação das mudas; E: Plantas com seis meses de idade; F: Obtenção das folhas).



Fonte: Limoeiro do Norte, 2012

4.2 Obtenção do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

As folhas de *C. citratus* (DC) Stapf, coletadas no período da manhã, foram transportadas para o laboratório de Biotecnologia e Produtos Naturais da Universidade Federal do Ceará, localizado em Fortaleza, Ceará. A extração foi realizada pelo processo de hidrodestilação em destilador para óleos essenciais tipo *Clevenger*, conforme pode ser observado nas figuras 5 e 6. Foram utilizados balões de 5 L contendo 150 g do material vegetal fresco fracionados tamanhos de 2 cm e 3 L de água destilada seguindo procedimento conforme Radünz et al. (2002) com modificações. O fluxograma de extração do óleo essencial encontra-se exposto na figura 7.

O processo de extração foi mantido a temperatura em torno de 70°C durante 90 minutos. O óleo essencial foi separado do hidrolato através da adição de sulfato de sódio anidro e armazenados a uma temperatura de -1 °C, ao abrigo da luz. A extração do óleo essencial foi realizada em triplicata e o cálculo do rendimento foi realizado a partir da massa do óleo essencial obtido pela sua massa de folhas frescas e o resultado multiplicado por 100. A densidade absoluta foi realizada através da pesagem de 1 mL de óleo essencial conforme a equação 1. As análises foram realizadas em triplicata.

Eq. $d = m/v \text{ (g/mL)}$ (1)

Figura 5: Processo de extração de óleo essencial de *C. citratus* em aparelho tipo Clevenger.



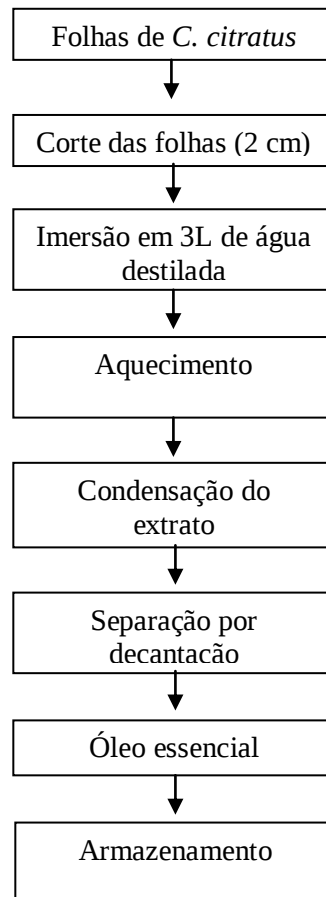
Fonte: Fortaleza, 2013.

Figura 6: Bureta de recepção do óleo essencial após condensação e decantação.



Fonte: Fortaleza, 2013.

Figura 7: Fluxograma de extração de óleo essencial de *C. citratus*.



4.3 Caracterização, análise da composição química e quantificação dos constituintes do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf

4.3.1 Análise de Infravermelho

A análise de infravermelho foi obtida através dos espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier foram obtidos em pastilhas de KBr no espectrofotômetro modelo 8300 da Shimadzu (Figura 8) entre 400 e 4000 cm^{-1} .

Figura 8: Espectrofotômetro para análise de infravermelho.



Fonte: Fortaleza, 2013.

4.3.2 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

A avaliação qualitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC/MS - Shimadzu, modelo QP 5050) como pode ser observado na figura 9 e 10. As condições experimentais foram: coluna capilar de sílica fundida –DB1 (30 m x 0,25 mm, com 0,25 μ m de espessura de filme). Foi utilizado o Hélio (He) como gás de arraste com uma taxa de fluxo de 1,7 mL/min com injeção tipo split: 1:27. A temperatura inicial do injetor foi 25°C e a temperatura do detector (ou interface) foi de 230°C; o volume da amostra injetada foi de 0,5 μ L em acetato de etila; e a pressão na coluna foi de 100.0 kPa. A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação com o padrão de fragmentação de espectro de massa descrito na literatura conforme ADAMS (2007) e NIST CHEMISTRY WEBBOOK (2014).

Figura 9: Sistema GC/MS - Shimadzu, modelo QP 5050.



Fonte: Fortaleza, 2013.

Figura 10: Sistema de injeção das amostras modelo Shimadzu, modelo QP 5050.



Fonte: Fortaleza, 2013.

4.3.3 Cromatografia gasosa acoplado a detector por ionização de chamas (CG-FID)

A quantificação dos constituintes do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chamas (GC/FID), em cromatógrafo modelo GC-2010, da marca Shimadzu AOC-2010, Auto Injector conforme figura 11. Os espectros de massa foram obtidos com a voltagem de ionização de 70 eV. A coluna capilar de sílica fundida –DB5 (30 m x 0,25 mm, com 0,25 μ m de espessura de filme). Foi utilizado os gases Hélio (He), Hidrogênio (H) e Ar sintético (Figura 12) com taxa de fluxo de 1,7 mL/min, injeção tipo split: 1:27. A temperatura inicial do injetor foi 25°C e a temperatura do detector

(ou interface) foi de 230°C; o volume da amostra injetada foi de 0,5 µL em acetato de etila; e a pressão na coluna foi de 100.0 kPa.

Os constituintes foram identificados através dos índices de Kovats, calculados em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos (Equação 2) e comparação de seus espectros de massa com aqueles do banco de dados NIST, bem como comparação visual com espectros de massas registrados na literatura (ADAMS, 2007).

Eq.

$$I = 100 \times \frac{[n + (N - n) \times tr_{(desconhecido)} - tr_{(n)}]}{tr_{(N)} - tr_{(n)}} \quad (2)$$

Em que:

I = Índice de Kovats;

n = número de átomos de carbonos do menor n-alceno;

N = número de átomos de carbono do maior n-alceno;

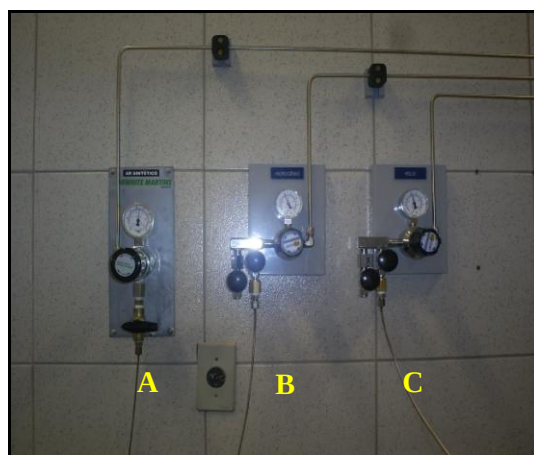
tr = tempo de retenção;

Figura 11: Sistema de CG-FID modelo Shimadzu AOC-2010



Fonte: Fortaleza, 2013.

Figura 12: Linha de gases utilizados no sistema de cromatografia gasosa (A: Ar sintético; B: Hidrogênio; C: Hélio).



Fonte: Fortaleza, 2013.

4.4 Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial

As bactérias utilizadas para a avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram

cedidas pelo Laboratório de Bioquímica da Universidade Estadual do Ceará. As bactérias foram encaminhadas e mantidas no laboratório de microbiologia do IFCE *Campus Sobral*. Para o preparo do inóculo microbiano, as bactérias foram ativadas em meio Brain Heart Infusion, incubados a 35°C por 18 horas. A diluição das bactérias foi realizada em solução salina 0,90% até a obtenção de leitura 0,08 em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560 nm relacionado à escala de Mac Farland que corresponde a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

4.4.1 Método qualitativo por difusão

A determinação da atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de difusão em disco de papel de filtro através do método preconizado por Kirby-Bauer, estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). O volume do extrato utilizado foi de 0,5µL, sendo impregnado nos discos de 6 mm de diâmetro, os quais foram colocados em placas de Petri contendo as bactérias semeadas individualmente em Agar Muller Hilton. As placas foram incubadas a 35°C por 18 horas. Os resultados foram expressos a partir da leitura de medição do diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano. A análise foi realizada em duplicata.

4.4.2 Método quantitativo por diluição

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi utilizado o método indireto de crescimento bacteriano através da densidade ótica em meio de cultura líquido. Utilizou-se o método descrito por Perazzo et al (2012), no qual foi adicionado 0,8 mL do óleo essencial; 0,05 mL de Tween 80; e 4,2 mL de água destilada estéril. Portanto a solução final apresentou concentração de 16% (v/v), equivalente a 136 mg/mL, considerando a densidade do óleo igual a 0,85 g/mL. Em seguida, o óleo essencial foi diluído de forma seriada, mediante emprego da técnica da macrodiluição (NCCLS, 2003).

O crescimento bacteriano foi avaliado através da densidade ótica para determinação da concentração inibitória mínima do óleo essencial, submetendo-se a leitura em espectrofotômetro utilizando absorvância de 560 nm. As concentrações de óleo essencial testadas foram: 0,4; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; e 6,0% (v/v). A análise foi realizada em duplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Densidade e rendimento do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf

A densidade do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf apresentou valor médio de 0,85 g/mL. Santos et al. (2009) obtiveram densidade de 0,95 g/mL para o óleo de *C. citratus* quando cultivado em canteiro único e 1,15 g/mL quando consorciado com *Achillea millefolium*. Lucena et al. (2013) determinou a densidade relativa para óleo essencial de capim limão e encontrou o valor de 0,86 g/mL.

O rendimento do óleo essencial é considerado uma das mais importantes características a serem avaliadas nos plantios destinados à produção comercial. Ele expressa a quantidade de óleo produzido a partir de uma determinada quantia de folhas (VITTIE E BRITO, 1999 citado por BRITO, 2007). O rendimento médio encontrado no presente estudo para a extração do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf foi de $0,69 \pm 0,23\%$ em relação a sua massa fresca. Valor este superior ao encontrado por Brito (2007), ao analisar os óleos essenciais obtidos de várias plantas, dentre elas o de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, cujo rendimento foi de 0,47%, sendo este também calculado a partir da massa fresca.

Outros pesquisadores também encontraram valores inferiores como Silva et al (2005), com rendimento de 0,55% de óleo essencial de capim limão, e Carvalho et al. (2010) que encontraram valores variando de 0,28 a 0,50% da massa fresca.

Ribeiro et al. (2008), obtiveram um rendimento semelhante ao obtido nesta pesquisa, teor de 0,78%. Os autores referidos ressaltam que o teor de óleo essencial e a composição química podem variar por influências sazonais. Koshima, Ming e Marques (2006) avaliaram o rendimento do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf em relação a utilização de cobertura morta nas estações do ano e obtiveram um rendimento médio de 0,55%, sendo constatado que a cobertura morta não interferiu no rendimento do óleo essencial.

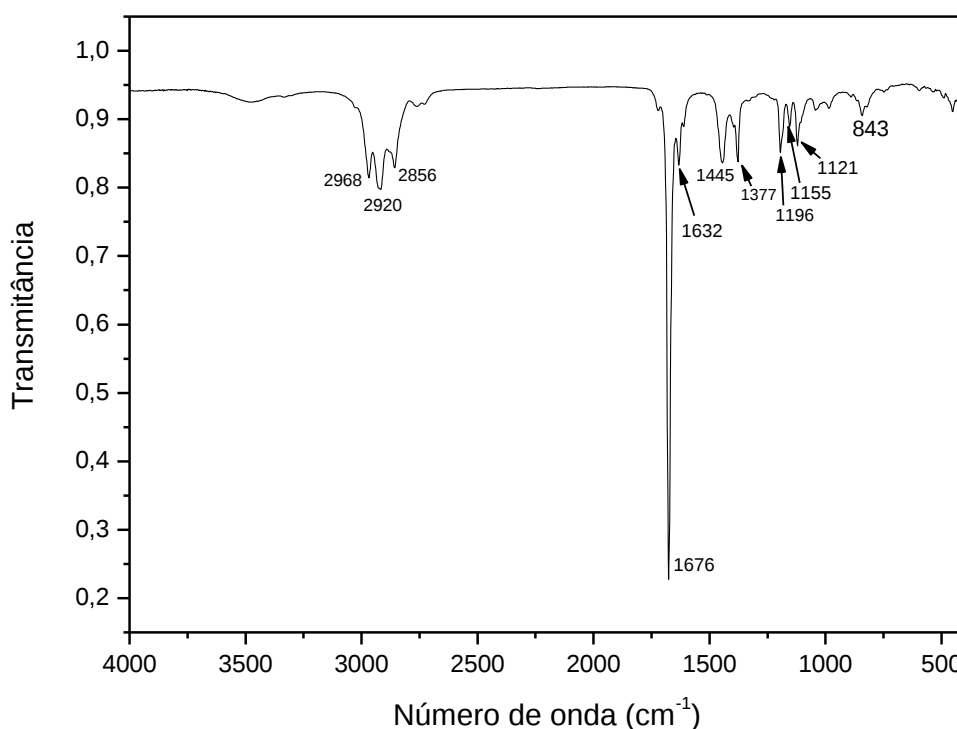
Além disso, Santos e Innecco (2003), relataram a influência de fatores abióticos, como a intensidade luminosa e a temperatura, que atuam diretamente nos processos primários, como fotossíntese e respiração, que podem influenciar indiretamente na produção de metabólitos secundários, tais como os constituintes do óleo essencial. A intensidade da luz pode, também, alterar a produção de óleo essencial através da ativação de enzimas fotossensíveis envolvidas na rota do ácido mevalônico, precursor dos terpenos que são constituintes químicos das essências (SOUZA et al., 2011).

5.2 Resultados da caracterização do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf por análise de infravermelho

Os espectros das bandas de absorção na região do infravermelho obtidos a partir de pastilha de KBr, encontram-se na figura 13, visando obter informações sobre a composição química do óleo essencial de *C. citratus*.

O espectro na região do infravermelho, em transmitância, revelou bandas de absorção em 2968 a 2920 (C-H, sendo caracterizadas como vibrações de estiramento); 1676 (C=O, estiramento); 1632 (C=C, estiramento); 1377 (CH₃, deformação angular); 1445 (CH₂, deformação angular), 1121 a 1196 (C-O, estiramento) e 843 (C-Cl, estiramento), em cm⁻¹ (SKOOG, HOLLER e NIEMAN, 2002).

Figura 13: Espectro na região do infravermelho do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf



Pequenas diferenças na estrutura e na constituição de uma molécula resultam em mudanças significativas na distribuição das bandas de absorção na região do espectro. Os espectros no infravermelho possuem uma característica única, principalmente na região de impressão digital. Os espectros das ligações C=O (1676) e C=C (1632), embora absorvam na mesma região do espectro de infravermelho, não se confundem, pois a ligação C=C absorve

fracamente, enquanto a C=O absorve intensamente, podendo ser facilmente observada no gráfico de absorção do infravermelho exposto na figura 13.

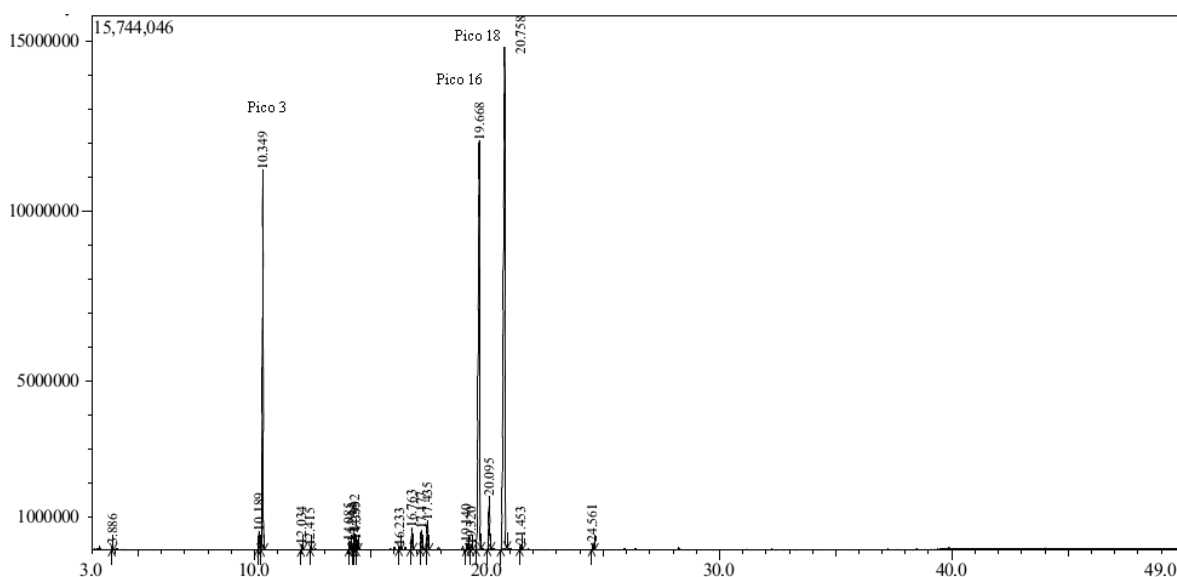
A ligação C=O, segundo Guimarães et al. (2008), caracterizam os compostos majoritários do óleo essencial de *C. citratus*, ao considerar o α e β citral, cujos grupos funcionais são representados pela ligação dupla entre o carbono e oxigênio (C=O).

Compostos orgânicos quando na presença de energia (que pode ser por aquecimento ou pela irradiação de luz) podem gerar radicais em decorrência da quebra homolítica de ligações químicas. Segundo Orlando (2011), as diferenças nas características do óleo essencial, com base no grau de interferência na composição química e física, pode ser atribuída a fatores, tais como a época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento, condições de temperatura, luminosidade e umidade do ar.

5.3 Composição química do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf

O cromatograma (CG-MS) do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf pode ser observado na figura 14. Foram obtidos vinte picos de tempo de retenção, porém foram identificados apenas nove componentes, sendo que os constituintes majoritários, sendo estes, o mirceno, α -citral e β -citral podem ser observados nas respectivas figuras 15, 16 e 17, respectivamente, evidenciando melhores resoluções quanto aos picos cromatográficos.

Figura 14: Cromatograma geral do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf.



Nas figuras 15, 16 e 17 encontram-se relacionados os espectros de massa correspondentes aos componentes majoritários do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf e as respectivas propostas de identificação através do NIST (2014) e Adams (2007). Bem como as suas respectivas estruturas químicas.

Figura 15: Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 3 (β -mirceno) do cromatograma da figura 14 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST.

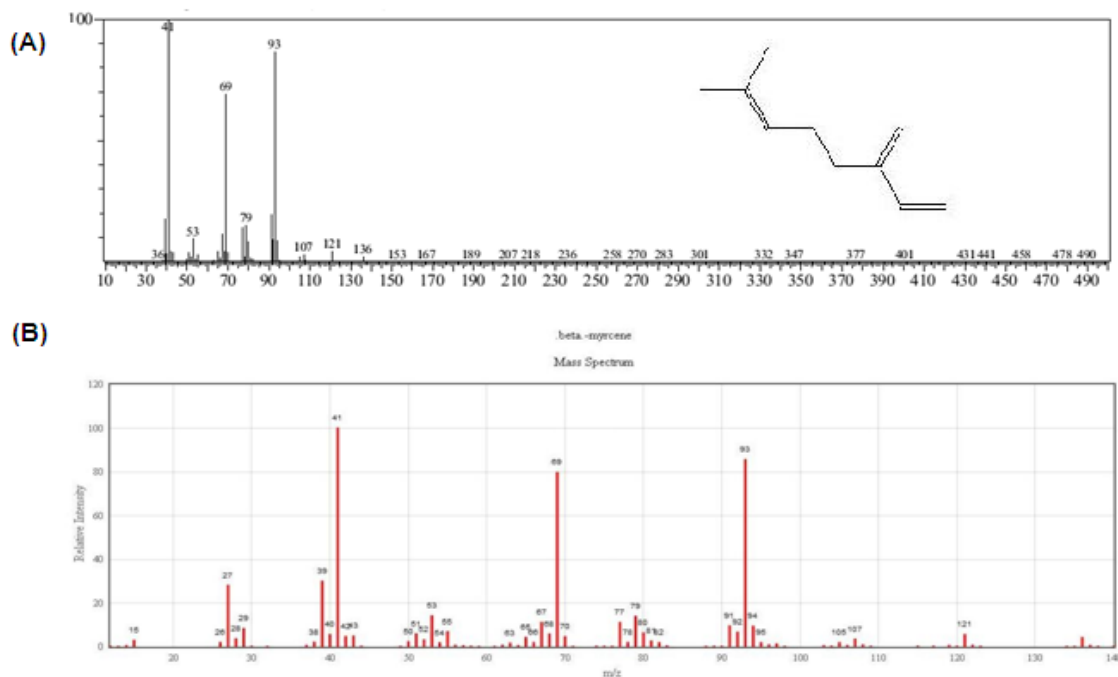


Figura 16: Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 18 (α -citral) do cromatograma da figura 14 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST.

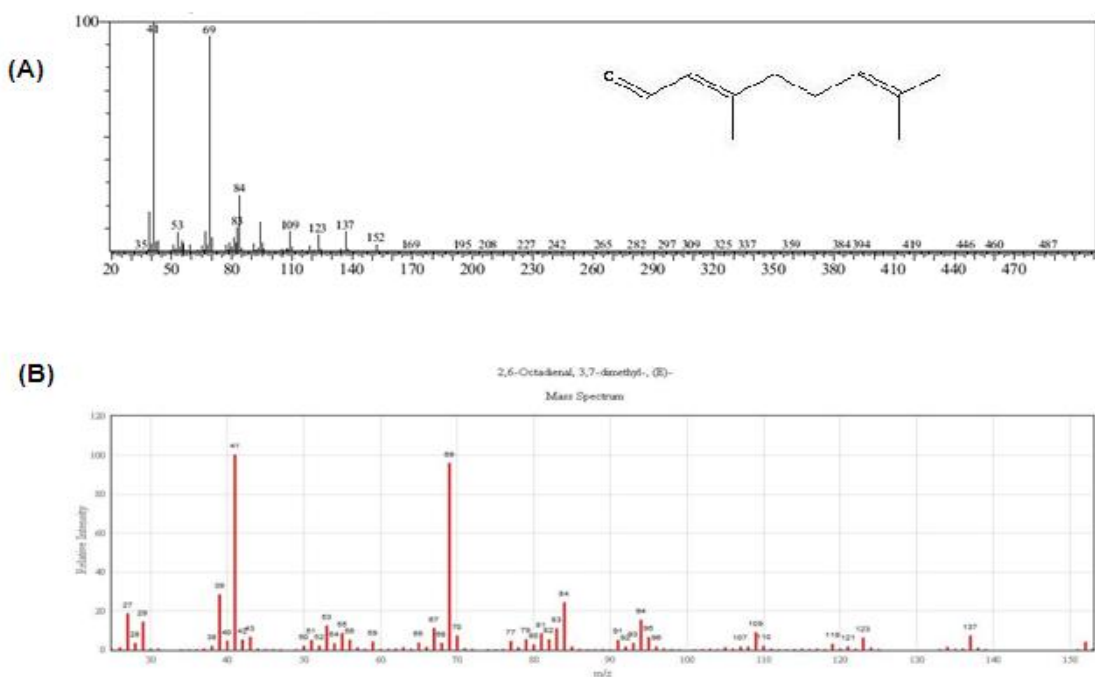
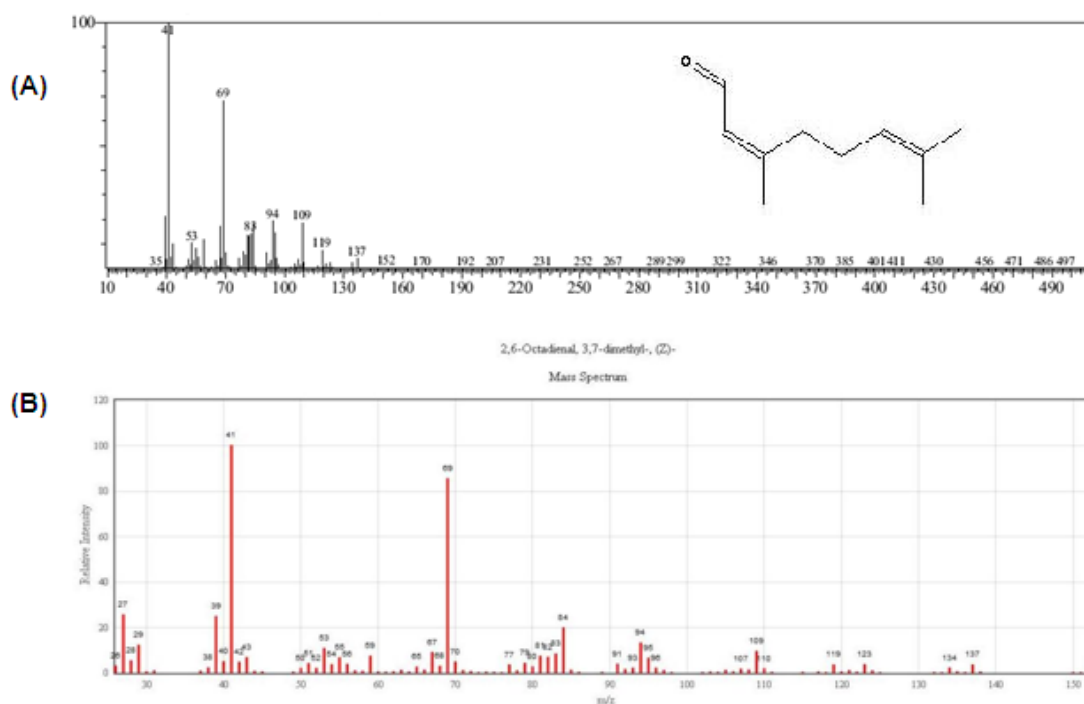


Figura 17: Espectros de massa do composto (A) referente ao pico 16 (β -citral) do cromatograma da figura 14 e (B) proposta de identificação através da espectroteca NIST (2014).



A Tabela 4 mostra os teores dos componentes contidos no óleo essencial, identificados através do espectro de massas da amostra. É notável o alto teor relacionado aos maiores picos do cromatograma geral, cujos tempos de retenção foram 10,349; 19,668; e 20,758, os quais foram posteriormente identificado como sendo mirceno, β -citral e α -citral, evidenciando esses compostos como os componentes majoritários presente no óleo essencial de *C. citratus* cultivado em Limoeiro do Norte.

Tabela 4: Identificação dos componentes do óleo essencial de *C. citratus*.

Componente ^a	TR ^b	IK ^c	IK ^d	Área (%)
β -mirceno	10349	988,45	988	16,66
β -trans-ocimeno	12035	1036,00	1040	0,25
β -ocimeno	12415	1046,72	1050	0,13
β -linalol	14330	1100,76	1098	0,79
β -citronelol	19140	1236,48	1229	0,40
β -citral	19670	1251,43	1244	30,63
Geraniol	20095	1263,43	1257	3,09
α -citral	20760	1282,19	1275	41,49
Nerol acetate	24560	1379,71	-	0,37

^a Componentes listados de acordo com a ordem de eluição em coluna DB-5; ^b Tempo de retenção obtido para cada componente identificado; ^c Índice de Kovats corrigido; ^d Índice de Kovats da literatura.

Os componentes majoritários, incluído o geraniol, com percentual de 3,09%, representaram 91,87% do óleo essencial, em que 72,12% representaram o teor de citral, sendo este valor semelhante ao encontrado por Brito (2007), que foi de 68,91%, Oliveira et al. (2011) e Pereira et al. (2008) que obtiveram 73,83 e 72,00%, respectivamente.

Além dos componentes majoritários, foram identificados β -ocimeno, β -linalol, β -citronelol, Geraniol e Nerol acetate, sendo os percentuais destes constituintes maiores do que os encontrados por Bassolé et al. (2011) que ao analisarem a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, obtiveram cinco componentes que foram identificados, e que representaram 96,3% do óleo essencial, sendo estes, o geraniol (1,9%) e linalol (0,7%). O percentual do componente mirceno (11,0%) também foi menor do que o do presente estudo, cujo valor foi de 16,66%.

Vale ressaltar que nesta pesquisa foi encontrado o componente nerol acetato, cujos estudos na literatura não mencionam a identificação de tal componente. Chanthai et al. (2012) identificaram dezesseis compostos aromáticos voláteis do óleo essencial de capim limão, sendo estes, o α -pineno, citronelal, óxido de limoneno, citronelol, geraniol, citral-cis, trans-citral, eugenol, humuleno, α -copaene, β -cariofileno, germacrene D, α -cubebene, cadinene de γ , δ -cadinene, e δ -cadinol. Fandohan et al (2008) encontrou os componentes β -citral (34%), α -citral (32%), Mirceno (20%) e Terpinen-4-ol (3%).

Araújo (2010) ressalta que os óleos essenciais, mesmo oriundos da mesma espécie, apresentam grande divergência quanto a sua composição química ao serem comparados com dados da literatura. Por isso, faz-se necessário que os experimentos informem a origem, forma de obtenção e composição dos óleos.

Algumas diferenças entre a literatura podem ser observadas, pois segundo Castro (2001) citado por Brito (2007), a composição de um óleo essencial é bastante dinâmica, sendo que as interconversões dos seus constituintes abrangem reações de oxidação, redução, desidratação, hidratação, isomerização e ciclização.

Guimarães et al. (2008), em sua pesquisa concluíram que os constituintes majoritários do óleo essencial de *C. citratus*, citral e mirceno sofreram degradação em relação ao tempo (120 dias), tanto na presença quanto na ausência de luz. Em relação à temperatura, observou-se influência desta apenas sobre a degradação do mirceno. Porém, tendo em vista que o citral além de ser o constituinte majoritário desse óleo essencial é também o composto de maior interesse pela indústria, conclui-se que este óleo, para fins de comercialização deve ser estocado ao abrigo da luz, não necessitando de temperaturas muito baixas para seu

armazenamento. Tal fato remete as condições apropriadas como ocorreu o armazenamento do óleo essencial de *C. citratus* do presente estudo.

Segundo Bakkali et al. (2008), a composição de monoterpenos são altamente voláteis e são considerados os mais representativos da composição do óleo essencial, sendo classificados em hidrocarbonetos, como mirceno, sabineno, α -pineno, ou oxigenados com várias funções como linalol e α -terpinol (álcoois), geranial, geraniol e neral (aldeídos) e 1,8-cineol (éteres). Alguns destes componentes também foram identificados no óleo em estudo.

Resultados semelhantes ao desta pesquisa foram encontrados por Domingues (2011), que ao estudar sobre a ação bactericida e esporicida de óleos essenciais, incluindo a espécie *Cymbopogon citratus*, identificou sete componentes em sua amostra, sendo estes, o mirceno, neral, geranial, geraniol, linalol, (Z) β -ocimeno e (E) β -ocimeno.

Martinazzo et al. (2013) também identificaram oito componentes no óleo essencial de *C. citratus* (DC.) Stapf após o processo de secagem, sendo estes cultivados em Viçosa, MG. Tais componentes foram 6-metil-5-hepten-2-ona, Mirceno, Linalol, Z-Citral (Neral), Geraniol, E-Citral (Geranial), Undecan-2-ona, Acetato de geranila, cujos valores do índice de retenção foram 997, 986, 1096, 1244, 1257, 1275, 1294, e 1388, respectivamente.

Brito (2007) identificou nove constituintes químicos do óleo essencial das folhas frescas de *C. citratus* submetido ao sistema orgânico. Foram eles, 6-metil-5-hepten-2-ona (1,99%), mirceno (24,80%), α -ocimeno (0,32%), β -ocimeno (0,19%), linalol (0,49%), citronelal (0,10%), β -citral (28,36%), α -citral (40,55%) e iso-butirato de linalol (0,51%). Os índices de Kovats para o mirceno, β -ocimeno, linalol, α -citral e β -citral foram de 987, 1045, 1099, 1268, 1237, respectivamente. Tais índices estão próximos aos encontrados para os referidos componentes identificados neste estudo (Tabela 4).

5.4 Atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf

Os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf frente aos microrganismos testados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus* (para 0,5 μ L do óleo essencial densidade = 0,85 mg/mL).

Microrganismo	Diâmetro médio do halo inibição (mm)
<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	7,75 ($\pm$ 0,5)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	8,25 ($\pm$ 0,5)

Os halos encontrados no presente estudo foram de 7,75 e 8,25 mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Bertini et al. (2005), em seu estudo sobre atividade de diferentes óleos essenciais utilizando volume de 10µL, para o óleo de *C. citratus*, obtiveram valores para os halos de inibição de 16,5 e 12 mm frente a *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Comparando tais valores com os resultados expressos nesta pesquisa (tabela 5), observa-se que os halos foram aproximadamente a metade. Entretanto, a quantidade de óleo empregada no teste foi 20 vezes menor. Segundo os referidos autores, os valores de 19,5 e 15,5 mm foram encontrados quando houve aumento de óleo essencial, possibilitando uma maior inibição frente aos microrganismos avaliados.

Bassolé et al. (2011), utilizando o volume de 5µL do óleo essencial de *C. citratus*, encontraram zonas de inibição de 24,3 e 15,3 mm para os microrganismos *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Pereira et al. (2008), avaliando o efeito inibitório de óleos essenciais, dentre eles o de *C. citratus*, na concentração de 0,5%, apresentou 7 mm para *E. coli* e 6 mm para *S. aureus*. E Trajano et al. (2009), analisando a propriedade antibacteriana de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos, encontraram variação de 11 a 30 mm dos halos de diferentes óleos frente a *Escherichia coli* e variação de 11 a 25 mm frente a *Staphylococcus aureus*. Sendo que os maiores halos foram observados quando se utilizou os óleos de *Cinnamomun zeylanicum* e *Eugenia caryophyllata*.

No presente estudo a bactéria Gram-negativa apresentou maior resistência em comparação com a Gram-positiva. Além disso, observa-se também que o aumento da concentração do óleo essencial permitiu uma maior inibição das bactérias como pode ser observado ao avaliar a concentração inibitória mínima do óleo essencial frente a *E. coli* e *S. aureus*, expostos nas Figura 18 e 19, respectivamente, as quais foram interpretados através da leitura da densidade ótica por meio da turvação do meio de cultura, indicando o crescimento dos microrganismos, enquanto o meio límpido, apresentando absorbância 0, indicando a inibição do crescimento microbiano.

Naik et al. (2010) obtiveram em seu estudo, comportamento semelhante ao da presente pesquisa, em que a atividade antibacteriana do óleo de *C. citratus* frente a bactérias patogênicas, encontraram zonas de inibição em mm de 14,33; 19,33; 22,33; 24,66; 27,33; e 29,66 quando submetido a concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30%, respectivamente, frente a *S. aureus*. E quando testado a bactéria *E. coli*, obtiveram zonas de 8,33; 11,33; 14,00; 16,33; 19,33; e 22,33 mm para as mesmas concentrações.

Figura 18: Resultado da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. citratus* frente a *E. coli*.

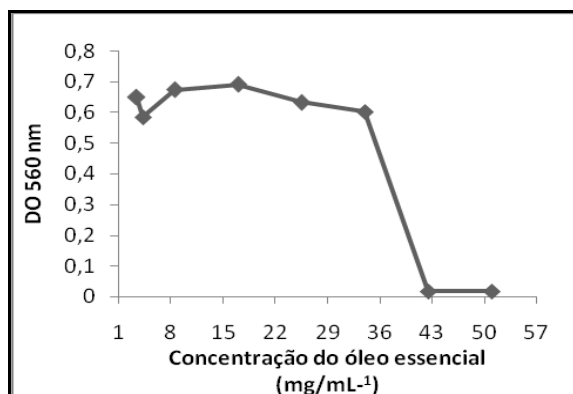
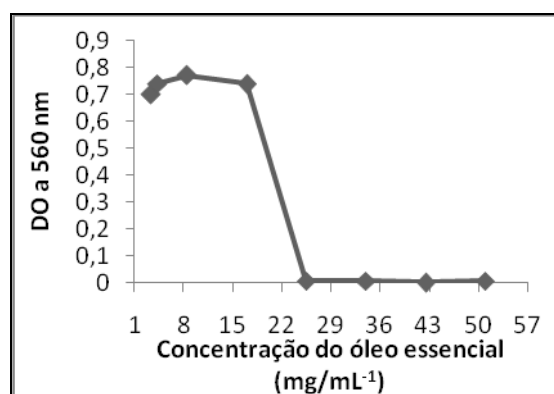


Figura 19: Resultado da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. citratus* frente a *S. aureus*.



Os resultados da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* foram de 42,5 mg/mL para *E. coli* e de 25,5 mg/mL para *S. aureus*. De acordo com Silva et al. (2009), em seu estudo avaliando a atividade antibacteriana de óleos essenciais provenientes de seis espécies vegetais frente a linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, encontraram uma maior resistência da bactéria Gram negativa, a qual necessitou de uma maior quantidade dos óleos essenciais testados.

Santos et al., (2009), obtiveram em seu estudo concentrações de 0,08 e 0,63 mg/mL, para *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. No entanto, utilizaram a técnica de microdiluição, em que o inóculo bacteriano foi diluído na proporção de 1:10. Perazzo et al., (2012) ressaltam ainda que os óleos essenciais são substâncias voláteis, que apresentam insolubilidade em água e complexidade química, o que dificulta a padronização de técnicas.

Segundo Chanthai et al. (2012), suas propriedades são principalmente devido ao citral (mistura de neral e geranial). Nascimento et al. (2006) verificaram o efeito do horário de corte sobre o rendimento do óleo essencial do capim-limão e o teor de citral, componente majoritário do seu óleo essencial. O maior percentual de citral ocorreu por ocasião do corte realizado às 13 horas (91,7%), porém, este foi o horário de menor produção de óleo. Portanto, a atividade antimicrobiana está relacionada ao teor de citral encontrado no óleo essencial, o qual pode variar com diferentes fatores bióticos e abióticos. O teor de citral encontrado no presente estudo foi de 72,12%, sendo que o horário da realização do corte foi pela manhã.

6 CONCLUSÃO

- ✓ O óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, cultivado no município de Limoeiro do Norte, apresentaram rendimentos superiores aos relatados na literatura, ocasionado, provavelmente pelas características edafoclimáticas da região;
- ✓ Foram identificados os agrupamentos funcionais C-H; C=O, C=C; CH₃; CH₂; C-O; e C-Cl. Quanto a composição, os componentes majoritários encontrados foram o mirceno, α -citral, β -citral e geraniol, representando teor de 91,87%;
- ✓ As concentrações de 42,5 e de 25,5 mg/mL foram eficientes para inibir as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente;
- ✓ Portanto, ressalta-se a importância de determinar a caracterização do óleo essencial, bem como o seu potencial efeito antimicrobiano, principalmente quando se propõe adicioná-lo em matrizes alimentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry** 4 th edition. Publ. Corp.: Carol Steam, 2007.
- AFFONSO, R. S.; RENNÓ, M. N.; SLANA, G. B. C. A.; FRANÇA, T. C. C. Aspectos Químicos e Biológicos do Óleo Essencial de Cravo da Índia. **Revista Virtual Química**. 4 (2), 146-161, 2012.
- AL-BAYATI, F.A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p. 403-406, 2008.
- ALVES, E.G.; VINHOLIS, A.H.C.; CASEMIRO, L.A.; FUTARDO, N.A.J.C.; SILVA, M.L.A.; CUNHA, W.R.; MARTINS, C.H.G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- ARAÚJO, R.C. **Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal *in vitro***. (Tese) 178 p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2010.
- ARAUJO, A.C. **Fracionamento do óleo essencial de patchouli [*Pogostemon cablin* (blanco) benth.] obtido por extração supercrítica**. 108 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 5 ed. Viçosa, MG: Ed UFV, 2011.
- ARCURI, E.F; BRITO, M.A.V.P.; BRITO, J.R.F.; PINTO, S.M.; ÂNGELO, F.F.; SOUZA, G.N. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.3, p.440-446, 2006.
- ATTI-SANTOS, A.C; ROSSATO, M; PAULETTI, A; MOYNA, P. Physico-chemical Evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.48, n. 6, p. 1035-1039, 2005.
- AZERÊDO, G.A; STAMFORD, T.L.M; FIGUEIREDO, R.C.B.Q; SOUZA, E.L. The Cytotoxic Effect of Essential Oils from *Origanum vulgare* L. and/or *Rosmarinus b4b4officinalis* L. on *Aeromonas hydrophila*. **Food Borne Pathogens and Disease**, v. 9, n.4, p.298-304, 2012.
- BAKKALI, F; AVERBECK, S; AVERBECK, D; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 02, p. 446-475, 2008.
- BASSOLÉ, I. H. N; LAMIEN-MEDA, A; BAYALA, B; OBAME, L.C; ILBOUDO, A. J; FRANZ, C; NOVAK, J; NEBIÉ, R. C; DICKO, M. H. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* and *Cymbopogon giganteus* essential oils alone and in combination. **Phytomedicine** v.18, n.12, p. 1070– 1074, 2011.

BASTOS, F. G. C. **Efeitos de níveis de irrigação, de doses de nitrogênio e de espaçamentos na cultura da melancia.** 2004. 62 f. Dissertação (Mestrado em Irrigação e Drenagem) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

BASTOS, M. S. R; ULISSES, I. B; FONTELENE, M. A; **Queijo de coalho do Jaguaribe: sabor perpetuado de uma tradição secular.** Documentos / Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 2179-8184; 160). Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2013.

BASTOS, M.S.R; LAURENTINO, L.S; SILVA, S.M.F; MENDES, L.G; CANUTO, K.M; GONÇALVES, N.P; PEREIRA, R.C.A. **Filme Biodegradável de Base Celulósica Incorporado de Óleos Essenciais.** ISSN 1679-6535, Dezembro, Fortaleza, CE, 2013.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTE, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**17: 80-83, 2005.

BIZZO, H.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova.** v.32, n.3, p. 588-594, 2009.

BOIX, Y. F; VICTÓRIO,C. P; LAGE, C. L. S; KUSTER, R. M. VOLATILE COMPOUNDS FROM *Rosmarinus officinalis* L. AND *Baccharis dracunculifolia* DC. GROWING IN SOUTHEAST COAST OF BRAZIL. **Química Nova.** v. 33, n. 2, p. 255-257, 2010.

BRASIL, REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE ADITIVOS AROMATIZANTES / AROMAS. **Resolução nº 104, de 14 de maio de 1999.** Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/104_99.htm.

BRUM, L.F.W. **Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos.** 135 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

CARMO, E.S; LIMA, E.O; SOUZA, E. L. The potential of *Origanum vulgare* l. (lamiaceae) essential oil in inhibitingthe growth of some food-related aspergillus species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n.2, p. 362-367, 2008.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A.; RILEY, T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a Review of antimicrobial and on the medicinal properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 50-62, 2006.

CARVALHO, T. M. de; TOSTA, T. de F; SARMENTO, R. R; BEGNINI, M. L; OKURA, M. H. Verificação da atividade antibacteriana in vitro dos óleos essenciais *Cinnamomum zeylanicum* e *Rosmarinus officinalis* em bactérias causadoras de infecção do trato urinário. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.3, p. 213-215, 2010.

CASTRO, L. O; RAMOS, R. L. D. **Principais gramíneas produtoras de óleos essenciais: *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. , capim-cidró, *Cymbopogon martinii* (Rox.) J.F. Watson, palma-rosa, *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle, citronela, *Elyonurus candidus* (Trin.) Hack. , capim-limão, *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash, vetiver.** Porto Alegre: FEPAGRO, 2002. 31 p. (Boletim FEPAGRO, 11).

CHANTHAI, S; PRACHAKOLL, S; RUANGVIRIYACHAI, C; LUTHRIA, D. Influence of Extraction Methodologies on the Analysis of Five Major Volatile Aromatic Compounds of Citronella Grass (*Cymbopogon nardus*) and Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Grown in Thailand. **Journal of AOAC International**, v. 95, n. 3, p.763-72, 2012.

COSTA, L. C. do B; CORRÊA, R. M; CARDOSO, J. C. W; PINTO, J. E. B. P; BERTOLUCCI, S. K. V; FERRI, P. H. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, v.23, n.4, p.956-959, 2005.

DIAS, V.L.N. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** 115 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

DNOCS. DEPARTAMENTO NACIONAL DE OBRAS CONTRA AS SECAS. Perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi. 2006. Disponível em: <http://201.30.148.11/~apoena/php/projetos/projetos.php>. citado por SANTOS, F.S.S; AZEVEDO, B.M; OLIVEIRA, C.W; SOUSA, A.E.C. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na cultura do mamão. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v.28,n.4, p.673-680, out./dez. 2008.

DOMINGUES, A.S. **Biofilme de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável: ação bactericida e esporicida de óleos essenciais.** Lavras, Minas Gerais. 150 f. (Dissertação) apresentada a Universidade Federal de Lavras. Pós-graduação para obtenção do título de microbiologia agrícola. 2011

DORMAN, H.J.D; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: anti-bacterial activity of plant volatile oil. **Journal of Applied Microbiology**. 83, p.308-316, 2000 citado por BONA, T.D.M.M; PICKLER, L; MIGLINO, L.B; KURITZA, L.N; VASCONCELOS, S.P; SANTIN, E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.5, p. 411-418, 2012.

DZAMIC, A; SOKOVIC, M; RISTIC, M. S; GRIJIC-JOVANOVIC, S; VUKOJEVIC, J; MARIN, P. D. Chemical composition and antifungal activity of *illicium verum* and *Eugenia caryophyllata* essential oils. **Chemistry of Natural Compounds**, v.45, n.2, p.259-260, 2009.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** Brasília, 1999. 412 p, citado por SANTOS, F.S.S; AZEVEDO, B.M; OLIVEIRA, C.W; SOUSA, A.E.C. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na cultura do mamão. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v.28,n.4, p.673-680, out./dez. 2008.

FANDOHAN, P; GNONLONFIN, B; LALEYE, A; GBENOU, J.D; DARBOUX, R; MOUDACHIROU, M. Toxicity and gastric tolerance of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Ocimum basilicum* in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 46, p. 2493–2497, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 edição. Parte I. Atheneu Editora, São Paulo, 1988.
Decreto N° 96.607 de 30 de agosto de 1988.

FRANCISCO, V; FIGUEIRINHA, A; NEVES, B. M; GARCÍA-RODRÍGUEZ, C; LOPES M. C; CRUZ, M. T; BATISTA, M. T. *Cymbopogon citratus* as source of new and safe anti-inflammatory drugs: Bio-guided assay using lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p. 818–827, 2011.

FURLAN, M. R.; MARTINS, R. C. C.; RODRIGUES, E.; SCALCO, N.; NEGRI, G.; LAGO, J. H. G. Variação dos teores de constituintes voláteis de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf, *Poaceae*, coletados em diferentes regiões do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 20: 686-691, 2010.

GOMES, E.C; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos botânicos e ecológicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 4, n. 2, p. 137-144, 2003.

GUIMARÃES, L.G.L; CARDOSO, M.G; ZACARONI, L.M; LIMA, R.K. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, v.31, n.6, p.1476-1480, 2008.

HAIDA, K. S; PARZIANELLO, L; WERNER, S; GARCIA, D. R; INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v.11, n.3, p.185-192, 2007.

HASSAN, S.A; BARTHWAL, R; NAIR, M.S; HAQUE, S.S. Aqueous Bark Extract of *Cinnamomum Zeylanicum*: A Potential Therapeutic Agent for Streptozotocin- Induced Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM) Rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.11, n.3, p. 429-435, 2012.

HENTZ, S.M; SANTIN, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v.7, n.2, p.93-100, 2007.

HOLLEY, R. A; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oil and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v.27, n.4, p. 273-292, 2005.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. **ISO 9235:1997**. Genebra, 1997.

JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*thymus vulgaris* L.)**. 90 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

JAKIEMIU, E. A. R; SCHEER, A. de P; OLIVEIRA, J. S. de; CÔCCO, L. C; YAMAMOTO, C. I; DESCHAMPS, C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, jul./set. 2010.

JOSHI, K; AWTE, S; BHATNAGAR, P; WALUNJ, S; GUPTA, R; JOSHI, S; SABHARWAL, S; BANI, S; PADALKAR, A. S. *Cinnamomum zeylanicum* extract inhibits proinflammatory cytokine TNF: in vitro and in vivo studies. **Research In Pharmaceutical Biotechnology**, v.2, n.2, p. 14-21, 2010.

JÚNIOR, E.R.A. **Métodos de extração do extrato e obtenção do óleo de linhaça**. Dossiê Técnico. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais - CETEC. Maio de 2011.

KHAN, M.S.A; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**. v.140, n.2, p. 416– 423, 2012.

KOSHIMA, F.A.T; MING, L.C; MARQUES, M.O.M. Produção de biomassa, rendimento do óleo essencial e de citral em capim limão, *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, com cobertura morta nas estações do ano. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v.8, n.4, p. 112-116, 2006.

KUMAR, A; SHUKLA, R; SINGH, P; PRASAD, C.S; DUBEY, N.K. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservative against post harvest fungal infestation of food commodities. **Technologies**, v.9, n.4, p. 575–580, 2008.

LEMOES, G.C.S; SANTOS, A.D; FREITAS, S.P.; GRAVINA, G.A. Controle de plantas invasoras em cultivo orgânico e convencional de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf.). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. ISSN 1516-0572. V. 15 n.3 Botucatu 2013.

LIMA, R. K; CARDOSO, M. das G; MORAES, J. C; VIEIRA, S. S; MELO, B. A; FILGUEIRAS, C. C. Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illicium verum* L. E de Capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae). **BioAssay**, v. 3, n. 8. P. 1- 6, 2008.

LUCENA, Y.B; LEITE, A.C.A.S; OLIVEIRA, K.A; JUNIOR, F.G; RODRIGUES, O.G. NETO, V. Q. Avaliação da atividade do óleo essencial do capim santo (*Cymbopogon citratus* DC, Stapf) em bactérias cariogênicas. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**. Campina Grande/PB, v. 9, n. 2, p. 114-129 junho/agosto, 2013.

LUPE, F.A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 103 f. Dissertação (Mestrado), Campinas, 2007.

MARTINS, A.P; NOGUEIRA, M.T; COSTA, M.C; SALGUEIRO, L. Requisitos de qualidade em óleos essenciais: a importância das monografias da Farmacopeia Europeia e das normas ISO. **Revista de Fitoterapia**, v.11, n.2, p. 133-145, 2011.

MARTINAZZO, A.P; MELO, E.C; DEMUNER, A.J; BERBERT, P.A. Evaluation of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf leaves after drying process. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. V.12, n.5, p.523 – 536, 2013.

MARTINAZZO, A.P.; MELO, E.C.; CORREA, P.C. SANTOS, R.H.S.. Modelagem matemática e parâmetros qualitativos da secagem de folhas de capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf]. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**. 2010, vol.12, n.4, pp. 488-498. ISSN 1516-0572.

MENDES, S.S; BOMFIM, R.R; JESUS, H.C; ALVES, P.B; BLANK, A.F; ESTEVAM, C.S; ANTONIOLLI, A; THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.129, n.3, p.391-397, 2010.

MENDONÇA, A.T. **Efeito dos óleos essenciais de condimentos sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* em ricota cremosa**. 2004. 85 f. Tese (Doutorado de Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras. Lavras - MG, 2004.

MOHAMMED, A; TANKO, Y; OKASHA, M. A; MAGAJI, R.A; YARO, H. Effects of aqueous leaves extract of *Ocimum gratissimum* on blood glucose levels of streptozocininduced diabetic wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.18, p. 2087-2090, 2007.

MORAIS, S. M; CAVALCANTI, E. S. B; COSTA, S. M.O; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 19(1B): 315-320, Jan./Mar. 2009.

NAIK, M.I; FOMDA, B.A; JAYKUMAR, E. BHAT, J.A. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. v.3 , n.7 , p. 535-538, 2010.

NASCIMENTO, I.B; INNECCO, R; MATOS, S.H; BORGES, N.S.S; MARCO, C. A. Influência do horário de corte na produção de óleo essencial de capim-santo (*Andropogum* sp). **Revista Caatinga**. v.19, n.2, p.123-127, abril/junho 2006.

NASSU, Renata Tieko; ARAÚJO, Rinaldo dos Santos; GUEDES, Cláudia Gondim Moreira; ROCHA, Resilda Gomes de Azevedo. Diagnóstico das Condições de Processamento e Caracterização Físico-Química de Queijos Regionais e Manteiga no Rio Grande do Norte. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento On Line; Embrapa, Fortaleza, 2003.

NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. **NCCLS**, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NEGRELLE, R.R.B; GOMES, E.C. *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf : chemical composition and biological activities. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.9, n.1, p.80-92, 2007.

NGUEFACK, A,J; TAMGUEA, O; LEKAGNE DONGMOA, J.B; DAKOLEA, C.D; LETHB, V; VISMERC, H.F; AMVAM ZOLLOA, P.H; NKENGFACKD, A.E. Synergistic action between fractions of essential oils from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against *Penicillium expansum*. **Food Control**, v. 23, n.2 , p. 377-383, 2012.

NGUEFACK, J; DONGMO, J.B. L; DAKOLE, C.D; LETH, V; VISMER, H. F; TORP, J; GUEMDJOM, E.F.N; MBEFFO, M; TAMGUE, O; FOTIO, D; ZOLLO, P.H. A; NKENGFAK, A. E. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. **International Journal of Food Microbiology**. 131, p. 151-156, 2009.

NIST CHEMISTRY WEBBOOK. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (Acesso: 14/06/2014).

OLIVEIRA, S.M.M; JOSE, V.L. Processos de extração de óleos essenciais. **Dossiê Técnico da Sociedade Brasileira de Respostas Técnicas**. Instituto de Tecnologia do Paraná, Setembro, 2007.

OLIVEIRA, A.R.M.F. **Produção de óleo essencial de *mentha x piperita* var. *Citrata* sob diferentes condições de manejo**. 83 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2011.

OLIVIRA, M.M.M. de; BRUGNERA, D. F; ALVES, E; CARDOSO, M. das G; PICCOLI, R. H. Efeito antibacteriano do óleo essencial de capim-limão contra *listeria monocytogenes* aderida em aço inoxidável: um estudo por microscopia eletrônica de varredura. In: **27º Congresso Nacional de Laticínios**. Minas Gerais, 2010.

OLIVEIRA, M.M.M; BRUGNERA, D.F; CARDOSO, M.G; GUIMARÃES, L.G.L; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s., Botucatu, v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN, A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v.120, n.1, p. 308-312, 2010.

ORLANDA, J.F.F. **Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)**. João Pessoa, 2011. 105 folhas. Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN.

OSTROSKY, E.A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2008, vol.18, n.2, pp. 301-307. ISSN 0102-695X.

ÖZTÜRK, A; ÖZBEK, H. The anti-inflammatory activity of *Eugenia caryophyllata* essential oil: an animal model of anti-inflammatory activity. **European Journal of General Medicine**. v.2, n.4, p. 159-163, 2005.

PERAZZO, M.F; NETA, M.C.C; CAVALCANTI, Y.W; XAVIER, A.A.F.C; CAVALCANTI, A.L. Efeito Antimicrobiano do Óleo Essencial do *Cymbopogon citratus* Sobre Bactérias Formadoras do Biofilme Dentário. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. v.16, n. 4, p.553-558, 2012.

PEREIRA, J. L. **Composição química dos óleos essenciais de *Eucalyptus* L Herit (Mirtaceae)**. 59 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Viçosa, Minas Gerais, 2010.

RADÜNZ, L. L; MELO, E. de C; BERBERT, P. A; BARBOSA, L. C.de A; ROCHA, R. P; GRANDI, A. M. de. EFEITO DA TEMPERATURA DO AR DE SECAGEM SOBRE A QUALIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM PIMENTA (*Lippia sidoides* cham). **Revista Brasileira de Armazenamento**. Viçosa, MG. v. 27, n.2, p.09-13. 2002.

RIBEIRO, D. S; MELO, D. B; GUIMARÃES, A. G; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 687-696, 2012.

RIBEIRO, S. DE F; ANGNES, S. I. A; OLIVEIRA, C. T. DE; BORDIGNON, J. C. Extração do óleo essencial de cidreira (*cymbopogon citratus*) e avaliação da atividade antifúngica. **In. XVI Encontro de Química da Região Sul**. Blumenal – SC. 13 a 15 de novembro de 2008.

SANTOS, F.S.S; AZEVEDO, B.M; OLIVEIRA, C.W; SOUSA, A.E.C. Efeito de diferentes lâminas de irrigação na cultura do mamão. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v.28,n.4, p.673-680, out./dez. 2008.

SANTOS, M.R.A.; INNECCO, R. Influência de períodos de secagem de folhas de óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). **Revista Ciência Agronômica**. 34: 5-11. . 2003.

SANTOS, A; PADUAN, R.H; GAZIN, Z.C; JACOMASSI, E; D' OLIVEIRA, P.S; CORTEZ, D.A.G; CORTEZ, L.E.R. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n.2, p.436-441, 2009.

SANTURIO, D. F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de suínos, aves e bovinos**. 54 f. Dissertação (Mestrado). Santa Maria, RS, 2011.

SILVA, K. B; ALVES, E. U; BRUNO, R. de L. A; SANTOS, S. da S; BARROSO, L. M. Tolerância à dessecação de sementes de *Cinnamomum zeylanicum* Ness. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 587-594, 2012.

SILVA, L. L; HELDWEIN, C. G; REETZ, L. G. B; HÖRNER, R; MALLMANN, C. A; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.5, p.700-705, 2010.

SILVA, M. S. A; SILVA, M. A. R; HIGINO, J. S; PEREIRA, M. S. V; CARVALHO, A. de A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus offi cinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n.2, p. 236-240, 2008.

SILVA, M. T. N; USHIMARU, P. I; BARBOSA, L. N; CUNHA, M. L. R. S; JUNIOR, A.F. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas frente a linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.257-262, 2009.

SILVA, P.A.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; BARRETO, M. C. V. Efeitos da adubação orgânica e mineral na produção de biomassa e óleo essencial do capim-limão [*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf]. **Ciência Agronômica** 34: 92-96, 2003.

SILVA, F. DE S; FERREIRA, T. M. BELTRAME, M; KHOURI, S. avaliação antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas hospitalares de leveduras do gênero *Candida*. In. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade do Vale do Paraíba**. 2005.

SILVESTRI, J. D. F; PAROUL, N; CZYEWski, E; LERIN, L; ROTAVA, I; CANSIAN, R. L; MOSSI, A; TONIAZZO, G; OLIVEIRA, D; TREICHEL, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 589-594, 2010.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC. p.467-496, 2007.

SINGH, J; BAGHOTIA, A; GOEL, S.P. *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family Myrtaceae): A Review. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. v.3, n.4, p.1469-1475, 2012.

SKOOG, D.A; HOLLER, F.J; NIEMAN, T.A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookma, 2002.

SOUSA, J. P; AZERÊDO, G.A; TORRES, R.A; VASCONCELOS, M.A.S; CONCEIÇÃO, M.L; SOUZA, E.L. Synergies of carvacrol and 1,8-cineole to inhibit bacteria associated with minimally processed vegetables. **International Journal of Food Microbiology**, v.154, n.3, p.145-151, 2012.

SOUSA, T.M.P; CONCEIÇÃO, D.M. Atividade antibacteriana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.). **Ensaio e Ciência**, v.5, n.5, p.7-13, 2007.

SOUZA, L.G.S; ALMEIDA, M.C.S; MONTE, F.J.Q; SANTIAGO, G.M.P; BRAZ-FILHO, R; LEMOS, T.L.G; GOMES, C.L; NASCIMENTO, R.F. Constituintes químicos de *capraria biflora* (Scrophulariaceae) e atividade larvicida de seu óleo essencial. **Química Nova**, Vol. 35, No. 11, 2258-2262, 2012.

SOUZA, M. F; MANGANOTTI, S. A; SOUZA, P. N. S; MEIRA, M. R; MATOS, C. C; MARTINS, E. R. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas** 24: 9-14, 2011.

TAILANG, M; GUPTA, B.K; SHARMA, A. Antidiabetic Activity of Alcoholic Extract of *Cinnamomum zeylanicum* Leaves in Alloxon Induced Diabetic Rats. **People's Journal of Scientific Research**, v.1, 2008.

TELES, S. **Avaliação do teor e da composição química de *Lippia alba* (mill) n.e.br. e *Mentha piperita* L. cultivadas em Cruz das Almas, Santo Antônio de Jesus e Amargosa, submetidas às diferentes épocas de colheita e processos de secagem.** Dissertação submetida à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias. 93 paginas. 2010.

TOVAR, L. P; MACIEL, M. R. W; PINTO, G. M. F. FILHO, R. M; GOMES, D. R. Factorial design applied to concentrate bioactive component of *Cymbopogon citratus* essential oil using short path distillation. **Chemical Engineering Research and Design**. v.88, n.2, p. 239–244, 2010.

TRAJANO, V.N; LIMA, E.O; SOUZA, E.L; TRAVASSOS, A.E.R. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.542-545, 2009.

TRAJANO, V.N; LIMA, E.O; SOUZA, E.L; TRAVASSOS, A.E.R. Inhibitory effect of the essential oil from *Eugenia caryophyllata* Thumb leaves on coalho cheese contaminating microorganisms. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, n.4, p. 1001-1006, 2010.

WANNES, W.A; MHAMDI, B; SRITI, J; JEMIA, M.B; OUCHIKH, O; HAMDAOUI, G; KCHOUK, M.E; MARZOUK, BRAHIM. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle(*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.5, p. 1362-1370, 2010.

ZAGO, J.A. A; USHIMARU, P.I; BARBOSA, L.N; JUNIOR, A.F; Sinergismo entre óleos essenciais e drogas antimicrobianas sobre linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de casos clínicos humanos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n.4, p. 828-833, 2009.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DO REVESTIMENTO COMESTÍVEL EM QUEIJO COALHO

Figura 20: Planta *Caesalpinia pulcherrima*



Fonte: São Benedito, 2013.

1 INTRODUÇÃO

O queijo coalho é um dos produtos lácteos mais consumidos na região Nordeste do Brasil. Devido ao hábito alimentar da população e levando em consideração o alto valor que o queijo coalho representa para a cultura local, tal atividade constitui-se uma relevante fonte de renda para economia, refletindo assim, a sua importância socioeconômica.

O queijo, assim como parte dos derivados do leite, apresenta uma excelente composição nutricional. Entretanto, devido a essas características, constituem-se de meios propícios para o desenvolvimento de microorganismos. Alguns autores relatam que, contagens elevadas de microorganismos do grupo coliformes, *Staphylococcus aureus* e *Salmonellas* são freqüentemente observadas nos queijos coalho. Além disso, estudos microbiológicos relatam ocorrência de microorganismos patogênicos e contagem de deteriorantes em números que excedem, muitas vezes, os limites estabelecidos pela legislação (DUARTE et al, 2005; CAVALCANTE et al, 2007, LUZ, 2008).

Isto pode ser decorrente da qualidade da matéria-prima e por serem produzidos, em propriedades rurais ou pequenas indústrias de forma artesanal, onde as condições higiênico-sanitárias são insatisfatórias, sem tecnologia apropriada para a melhoria de sua qualidade. Por isso, a contaminação microbiana desse produto representa potencial risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (SANTANA et al, 2008, FILHO et al., 2009).

Neste cenário, os revestimentos comestíveis surgem como excelente forma de conservação destes produtos, pois possuem atividade antimicrobiana, inibem a migração de umidade, oxigênio e retém os compostos aromáticos do produto, contribuindo assim com a preservação da integridade do alimento (DURANGO, SOARES e ARTEAGA, 2011).

Os revestimentos comestíveis são películas constituídas por substâncias naturais e/ou sintéticas que se polimerizam e isolam o alimento, sem riscos à saúde, pois não são metabolizados pelo organismo e sua passagem pelo trato gastrointestinal se faz de maneira inócua (MAIA et al, 2000). Uma das macromoléculas biológicas mais estudadas para formação de revestimentos comestíveis são os polissacarídeos, polímeros capazes de formar matrizes contínuas de proteção ao alimento (TEIXEIRA et al, 2010). Sua produção apresenta-se viável devido seu baixo custo, por serem amplamente encontrados na natureza, serem consumidos em conjunto com o alimento e biodegradáveis, contribuindo para minimizar a poluição ambiental, embora não substitua a embalagem primária (RIGO, 2006; LIMA, 2009).

As galactomananas são polissacarídeos não-iônicos com extensa ocorrência no endosperma da semente de plantas da família *Leguminosae*. Apresentam em sua estrutura

uma cadeia principal linear com unidades de α -D-manose, com substituição de unidades de α -D-galactose na posição do C-6 da manose (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009, FILHO, 2009). Uma fonte de galactomananas é a leguminosa *Caesalpinia pulcherrima*, conhecida como “flamboianzinho”, facilmente encontrado na região nordeste. Podem atingir de 3 a 4 metros de altura na fase adulta. É um arbusto de fácil plantio, crescimento e com ampla produção de sementes, cujo fruto contém em média de 2 a 15 sementes (MESQUITA et al, 2008; FRANCA et al, 2010). Estudos recentes abordam sobre as propriedades e utilização de galactomananas de *C. pulcherrima* para a formação de revestimentos comestíveis aplicados em alimentos (CERQUEIRA et al., 2011).

Tendo em vista a potencialização dos revestimentos a base de galactomanana, os óleos essenciais de plantas, por possuírem substâncias ativas e efeito antimicrobiano, diversos pesquisadores, entre eles, os da área de alimentos têm buscado a sua comprovação e utilização no processamento de alimentos. Segundo Araújo (2008) e Martins et al (2011), os óleos essenciais são substâncias muito estudadas em vários ramos da ciência, sendo a indústria de alimentos muito beneficiada, destacando-se na utilização desses produtos naturais.

Tal fato deve-se aos seus constituintes, que em diferentes concentrações inibem o crescimento de microrganismos, como *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (PEREIRA et al, 2004; LIMA et al, 2006; MATASYOH et al, 2007). Diante deste contexto e buscando novas técnicas naturais de preservação dos alimentos, a adição de óleos essenciais nos alimentos torna-se um potencial sistema de bioconservação, visto que podem prolongar a vida útil dos produtos alimentícios.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo da inclusão do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf em solução de galactomanana a fim de elaborar um revestimento comestível aplicado em queijo coalho, que apresente a função de minimizar e controlar o crescimento microbiano, bem como manter as características físico-química e sensorial em conformidade com os padrões de qualidade, buscando ampliar a sua vida de prateleira.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Isolar galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima*;
- ✓ Avaliar o rendimento da extração da galactomanana;
- ✓ Realizar a caracterização da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*;
- ✓ Formular películas distintas com solução de galactomananas e incorporar o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf;
- ✓ Elaborar o queijo tipo coalho e aplicar os revestimentos;
- ✓ Realizar análises físico-químicas e microbiológicas dos queijos revestidos durante a estocagem com 1; 10; e 20 dias;
- ✓ Definir o tratamento que apresentar melhor resultado no estudo da estabilidade durante 20 dias e avaliá-lo quanto a sua composição química, microbiológica e sensorial, bem como determinar o seu perfil de textura e capacidade de derretimento durante 7, 15 e 30 dias de armazenamento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Generalidades do queijo coalho

3.1.1 Leite de vaca: principal ingrediente de fabricação do queijo

A Instrução Normativa 62, publicada em 29 de dezembro de 2011, aprova o regulamento técnico de produção, identidade, qualidade, coleta e transporte do leite. Segundo a mesma, entende-se por leite, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2011).

O leite deve ter o aspecto líquido e homogêneo, apresentando sabor levemente adocicado e agradável, devido à quantidade de lactose, além dos teores de proteínas e gordura que também contribuem para o seu sabor característico. Possui odor suave, levemente ácido e com coloração branco-amarelada opaca devido principalmente à dispersão da luz pelas micelas de caseína. A cor amarelada do leite é devido a substâncias lipossolúveis, como os carotenóides e as riboflavinas (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA, 2007a).

O leite é um alimento completo e indispensável na alimentação devido os seus nutrientes, sendo de suma importância para a saúde (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA, 2007a). É composto de água, 87,3%, e sólidos totais, 12,7%, assim distribuídos: proteínas totais, 3,3 a 3,5%; gordura, 3,5 a 3,8%; lactose, 4,9%; além de minerais, 0,7%, e vitaminas (SGARBIERI, 2005). A tabela 6 apresenta os padrões mínimos da composição físico-química do leite segundo a Legislação Brasileira.

Tabela 6 - Padrões mínimos de composição físico-química do leite.

Requisitos	Limites
Matéria gorda (g/100g)	Teor original, com o mínimo de 3,0
Proteínas (g/100g)	Mínimo de 2,9
Extrato seco desengordurado (g/100g)	Mínimo de 8,4
Acidez titulável (g ácido láctico/100g)	0,14 a 0,18
Densidade (g/mL)	1,028 a 1,034
Índice crioscópico (°H)	-0,530 a -0,550

Fonte: (BRASIL, 2011).

Os teores de gordura do leite podem sofrer variações dependendo da raça, idade, saúde animal, estágio da lactação, status nutricional e intervalos entre ordenhas. Os

triglicerídeos perfazem 98% do total da fração lipídica, enquanto os 2% restantes são diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos, fosfolipídeos, esteróis e traços de vitaminas lipossolúveis (GRADELLA, 2008). As proteínas do leite podem ser classificadas em caseínas, proteínas de soro e proteínas das membranas dos glóbulos de gordura. Em termos quantitativos, a caseína, com percentual de 80%, está em maior presença, sendo definida como uma substância coloidal complexa, associada ao cálcio e fósforo, podendo ser coagulada por ação de ácidos, coalho e/ou álcool. Trata-se, portanto, de um grupo de fosfoproteínas específicas que apresentam baixa solubilidade em pH 4,6 (TRONCO, 2010).

Além disso, o leite é uma fonte excelente de sais minerais necessários para o desenvolvimento dos indivíduos. O cálcio e o fósforo apresentam alta disponibilidade, pois se encontram associados à caseína, sendo a melhor fonte de cálcio para o crescimento do esqueleto dos indivíduos jovens e para a manutenção da integridade dos ossos dos adultos. Constitui de uma importante fonte de vitaminas, algumas associadas com a gordura (A, D, E e K), enquanto outras se associam com a parte aquosa como as do complexo B produzidas no rúmen, em que mais de dez tipos são encontradas no leite. Entretanto, com exceção da vitamina B2 (riboflavina), as outras são encontradas em quantidades pequenas. A vitamina C também se encontra presente no leite (GRADELLA, 2008).

Em virtude do elevado consumo e produção de leite, surgiu a necessidade de aprimoramento de técnicas e de higienização na obtenção, transporte e conservação do leite a fim de garantir um produto seguro, saudável e com maior tempo de conservação. Existem inúmeros processos que podem ser aplicados ao leite para melhorar a qualidade e vida útil do produto (VENTURINI, SARCINELLI & SILVA, 2007b).

A qualidade de um produto lácteo pode ser observada por duas perspectivas. Uma subjetiva, associado às preferências do consumidor, ou seja, seus gostos pessoais no que diz respeito à qualidade sensorial, que é composta de um conjunto de características que levam à aceitação ou rejeição do produto, tais como apresentação do produto, forma, textura e sabor. E outra objetiva, que é representada por um conjunto de características intrínsecas ao produto que são as características físicas, nutricionais e higiênicas do produto. Sendo fundamental a garantia, conformidade e manutenção da qualidade (GRADELLA, 2008).

A tabela 7 apresenta os requisitos microbiológicos que deverão ser avaliados pela Rede Brasileira de Laboratórios de Controle da Qualidade do Leite a partir de 2014 conforme a Instrução Normativa 62. Os requisitos contagem de aeróbios mesófilos e contagem de células somáticas são indicadores importantes de qualidade do leite. Vallin et al., (2009) e

Matsubara et al., (2011) avaliaram a redução de contagens microbianas após a implantação das boas práticas de higiene na ordenha e obtiveram melhoria na qualidade do leite.

Tabela 7 - Requisitos microbiológicos previstos pela Legislação Brasileira.

Índice medido (propriedade rural ou tanque comunitário)	Regiões S, SE, CO: 01/01/12 a 30/06/14. Regiões N, NE: 01/01/13 a 30/06/15	Regiões S, SE, CO: 01/07/14 a 30/06/16. Regiões N, NE: 01/07/15 a 30/06/17	Regiões S, SE, CO: a partir de 01/07/16. Regiões N, NE: a partir de 01/07/17
Contagem padrão em placas (UFC/mL)	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de células somáticas (CS/mL)	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Fonte: (BRASIL, 2011).

3.1.2 Histórico e importância do queijo coalho para a região Nordeste

Os queijos são derivados do leite, ricos em proteínas de alto valor biológico, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos. É considerado um dos alimentos preparados mais antigos da humanidade, sendo considerada a forma mais antiga e comum de preservar por mais tempo os nutrientes do leite (QUEIROZ, 2008).

Constata-se que o marco inicial da fabricação de queijos tenha sido na idade média. Todavia, há relatos de consumo de leite solidificado datando de 7.000 anos a.C. e achados arqueológicos revelam a existência de queijos feitos a partir de leite de vaca e de cabra 6.000 anos a.C.. Além disso, murais em tumbas egípcias mostram cenas de fabricação de queijo, sendo encontrados vestígios de queijo na tumba egípcia de Tutankamón (1500 a.C.) (PERRY, 2004; BEUX, 2011). Conforme Dantas (2012), estes relatos remete a idade aproximada de domesticação dos primeiros mamíferos, representado na vaca, que passou a fornecer carne e leite para ser utilizado na alimentação humana.

Ao reportar a história dos queijos, há registros de que foram os gregos os primeiros europeus a conhecer o queijo e que em seus banquetes os queijos eram muito consumidos, sendo aplicado ervas aromáticas com a finalidade de variar o sabor do mesmo, e até hoje são grandes consumidores, principalmente elaborados com leite de cabras e de ovelhas. Mas foi a partir do reinado dos Césares que a fabricação de queijos e o desenvolvimento de laticínios se estenderam por toda a Europa. Roma era um rico mercado para o queijo. O produto era muito raro naquela época, mas estava sempre presente nas fartas

mesas dos nobres romanos. A Itália fabricava queijos, mas a Suíça era a principal fonte de abastecimento, por sua abundante pastagem e por possuir a mais pura água das montanhas (ALBUQUERQUE et al., 1994 citado por MENDOÇA, 2009; SEBRAE, 2008).

Estima-se que exista cerca de 1000 tipos de queijos, sendo necessária uma classificação, de acordo com a textura da massa, pela origem da matéria prima ou pelo processo de fabricação, o que confere diferentes formas, texturas, sabores, odores e cores. Porém as classificações não são completas e um tipo de queijo pode estar em dois ou mais grupos (LÁCTEA BRASIL, 2006; MENDONÇA, 2009).

A fabricação de queijos no Brasil é relativamente recente, firmando-se, do ponto de vista industrial, a partir da década de 1920, com o estabelecimento de imigrantes europeus em Minas Gerais (ANDRADE, 2006; BARROS et al, 2009). Atualmente, o Brasil é o sétimo maior produtor de queijo do mundo, contando com cerca de mil fábricas, que respondem por 23% da produção nacional de dois milhões de toneladas por ano (DIAS, 2010).

No entanto, o mercado de queijos apresenta uma forte característica que é a existência de um grande número de pequenos e micro laticínios que atuam regionalmente e fora do âmbito do Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, SIF. O predomínio desses pequenos produtores dificulta a obtenção de informações oficiais sobre a produção total de queijos no Brasil, uma vez que não há um registro oficial de produção do queijo. A produção sob inspeção do SIF, conforme projeções feitas por especialistas do setor e pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) representam aproximadamente 60% do total de queijos produzidos no Brasil (SEBRAE, 2008).

Em contrapartida, o cumprimento incomensurável das normativas vigentes, Lei 1.283/1950, torna-se incompatível aos pequenos produtores, tendo em vista as discrepâncias de modelos impostos ao referido grupo. No bojo da elaboração dessa lei, a política do Estado mirou-se no setor agro-exportador, norteadas principalmente pelas exigências do mercado norte-americano e desconsiderou ou não reconheceu a pequena produção (MENEZES, 2011).

A produção de queijo tipo coalho no Brasil ocorre principalmente na região Nordeste, datando a cerca de 150 anos, a partir de leite cru e/ou pasteurizado. Tendo os estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco como os principais produtores deste tipo de queijo (FREITAS, 2006; CAVALCANTE et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2010).

O queijo coalho é um dos produtos mais típicos do Nordeste, que faz parte das refeições diárias, seja como complemento alimentar ou como iguaria, apresentando um relevante valor socioeconômico e cultural, cujas bases encontram-se enraizadas na história do pecuarista do semiárido, através da transmissão cultural que ocorre de pais para filhos, e este

último, mantendo a tradição, faz sua produção de forma artesanal, tendo como base os conhecimentos práticos construídos através de gerações (DANTAS, 2012).

A importância econômica e cultural do queijo para os brasileiros é tamanha que vários grupos lutam em busca de reconhecimento público. O mais recente deles foi conquistado pelos produtores de Minas Gerais. O conselho consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional reconheceu a produção do queijo Minas artesanal como patrimônio imaterial nacional (MENDONÇA, 2009). Para Menezes (2011), este reconhecimento cultural, social e econômico da produção queijeira artesanal, pelo estado de Minas Gerais suscita a elaboração de normativas em outros estados brasileiros.

Desta forma, o estado de Pernambuco também se articula com o objetivo de conquistarem o reconhecimento do queijo coalho como um produto legitimamente brasileiro. E para preservar as características do queijo coalho artesanal e garantir sua qualidade, em Pernambuco foi sancionada a Lei nº 13.376, de 20 de dezembro de 2007, que dispõe sobre o processo de fabricação do queijo coalho artesanal, permitindo sua produção com leite cru, proveniente de rebanho sadio e devidamente inspecionado (MENDONÇA, 2009).

Nesta perspectiva, Menezes (2011) ressalta que as normativas direcionadas neste setor está relacionada à necessidade de valorização da cultura queijeira com objetivo de agregar valor à produção e oferecer alimentos seguros, tendo em vista que o queijo tipo coalho consiste em um patrimônio da população nordestina.

Vale salientar também o projeto desenvolvido pela Embrapa Agroindústria Tropical relacionado a busca pela certificação geográfica do queijo coalho produzido em Jaguaribe, com a finalidade de modernizar o setor, como forma de ampliar o mercado consumidor. Neste cenário, as instalações das queijarias passam por transformações para se adequarem aos procedimentos de qualidade e de higiene tendo base as boas práticas de fabricação e conforme a legislação, preservando os modos de fazer o queijo, os quais são herança de gerações anteriores, bem como representam um traço cultural determinante do local, como um possível espaço de referência, de lugar de memória, de objeto da cultura e de monumento (BASTOS, ULISSES e FONTENELE, 2013).

Dessa forma, a valorização e legitimação de queijos tradicionais e de outros derivados artesanais do leite é elemento fundamental para a reprodução social e econômica dos produtores nas distintas regiões, contribuindo, assim, para a permanência das famílias em seu território identitário (MENEZES, 2010).

Esse processo de identificação e denominação não garante apenas o controle do Brasil sobre um produto local, destina-se, principalmente, a padronizar a produção do queijo

coalho, emitindo certificados de qualidade e avaliando as influências naturais, como clima, solo, vegetação que alimenta o gado leiteiro, que agem sobre o produto final, o queijo. Conseqüentemente, esse controle terá implicação econômica e na saúde pública, por possibilitar o aumento da qualidade e produtividade do queijo coalho e por promover a saúde humana, diminuindo os riscos de infecção alimentar (MENDONÇA, 2010).

3.1.3 Conceito, classificação e tecnologia de fabricação do queijo coalho

Entende-se por queijo coalho, segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade, constante da Instrução Normativa nº30, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas (BRASIL, 2001a).

No Brasil, a padronização dos métodos de elaboração de queijos está fixada no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, anexada a Portaria 146 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em que expõe a classificação quanto a umidade e conteúdo de matéria gorda no extrato seco (BRASIL, 1996). Sendo o queijo tipo coalho classificado como de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%, definido como queijo semi-gordo a gordo (BRASIL, 2001a).

Ainda segundo a Legislação, o leite deve ser submetido à pasteurização ou processo térmico equivalente que assegure a fosfatase alcalina negativa, combinado ou não com outros processos físicos que garantam a inocuidade do produto. Ficando excluídos, os queijos submetidos à maturação por tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 2001a).

Porém, o fato da maioria dos produtores não estarem sob fiscalização legal, e serem conhecedores que o processo de pasteurização altera as características do queijo, e que ao efetua-lo seria necessário mais custos com o adicional de produtos ao leite, ocasionando por conseguinte a elevação do preço do produto, faz com que estes evitem a pasteurização, sem tomarem consciência do risco que expõe o seu consumidor, pois acreditam estarem oferecendo um produto de maior qualidade em virtude de manterem características organolépticas peculiares (DANTAS, 2012).

Neste sentido, Andrade (2006) ressalta que, a pasteurização, além de eliminar os microrganismos patogênicos, pode provocar alterações nos constituintes do leite, torna-se necessário a adição de cloreto de cálcio e de fermento láctico na produção do queijo. A

presença de sais minerais, principalmente o cálcio, determina a qualidade do corpo e a firmeza do queijo, além do rendimento. Em contrapartida, a carência de cálcio leva a formação de uma massa friável e quebradiça.

O cloreto de cálcio, cultivo de bactérias lácteas selecionadas, sólidos de origem láctea, condimentos, especiarias e o cloreto de sódio são ingredientes opcionais. Enquanto os ingredientes obrigatórios para elaboração do queijo de coalho são leite integral ou padronizado a 3% (m/m) em relação ao seu conteúdo de matéria gorda, e o coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas (BRASIL, 2001a).

A coagulação do leite ocorre por meio de uma enzima coagulante chamada quimosina, a qual tem a funcionalidade de modificar a estrutura físico-química das micelas de caseína que floculam formando uma rede que retém grande parte dos constituintes sólidos do leite. No entanto, ressalta-se que o excesso de coalho pode resultar em sabor amargo ao queijo, visto que o coalho, além da ação coagulante, apresenta ação proteolítica, com função de quebrar as moléculas de proteínas, liberando peptídeos (ANDRADE, 2006).

As etapas do processo de elaboração consistem na coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45°C) ou cozida (entre 45 e 55°C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 a 12°C, normalmente até 10 (dez) dias. Em relação ao acondicionamento, a embalagem deverá ser bromatologicamente apta, com ou sem vácuo. As condições de conservação e comercialização do queijo coalho deverão ser mantidas a uma temperatura não superior a 12° C (BRASIL, 2001a).

Dentre os atributos sensoriais que o queijo coalho deve apresentar está a consistência semidura, elástica, cor branca amarela uniforme, crosta fina, sem trincas, não sendo usual a formação de casca bem definida, odor ligeiramente ácido, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, textura sem ou com algumas olhaduras pequenas.

Na tabela 8 são apresentados as definições físicas e sensoriais das características de textura conforme CIVILLE e SZCZESNIAK (1973) citado por ANDRADE (2006).

Por tratar-se de um produto artesanal, o queijo coalho possui certo padrão de fabricação, entretanto cada produtor, de acordo com suas habilidades, estrutura física e econômica, faz uma adaptação do processo, adotando pequenas alterações na forma de elaboração do seu produto (DANTAS, 2012).

Tabela 8: Definições das características de textura.

Propriedades primárias	Físicas	Sensoriais
Dureza	Força necessária para produzir certa deformação	Força requerida para compressão de uma substância entre os dentes molares (para sólidos) ou entre a língua e o palato (para semi-sólidos).
Coesividade	Extensão a que um material pode ser deformado antes da ruptura.	Grau ao qual uma é comprimida entre os dentes, antes de romper.
Viscosidade	Velocidade de fluxo por unidade de força	Força requerida para puxar um líquido da colher para a língua.
Elasticidade	Velocidade na qual um material deformado volta à condição não deformada, depois que a força de deformação é removida.	Grau para o qual um produto volta à sua forma original, depois da compressão com os dentes.
Adesividade	Energia necessária para superar as forças atrativas entre a superfície do alimento e a de outros materiais com os quais o alimento está em contato.	Força requerida para remover o material que adere à boca (palato) durante o processo normal de comer.
Propriedades secundárias	Físicas	Sensoriais
Fraturabilidade	Força pela qual o material fratura; um produto com alto grau de coesividade.	Força pela qual uma amostra esmigalhada, racha ou quebra em pedaços.
Mastigabilidade	Energia requerida para mastigar um alimento sólido até a deglutição; é o produto – dureza x coesividade x elasticidade.	Tempo (segundos) requerido para mastigar uma amostra, a uma velocidade constante da aplicação de força, para reduzi-la à consistência adequada para a deglutição.
Gomosidade	Energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido até estar pronto para a deglutição; é o produto de baixo grau de dureza x alto grau de coesividade.	Densidade que persiste durante a mastigação: energia requerida para desintegrar um alimento semi-sólido ao ponto ideal para a deglutição.

Fonte: CIVILLE e SZCZESNIAK (1973) citado por ANDRADE (2006).

A fabricação e comercialização desses produtos são atividades muito importantes para a economia regional, o que movimenta, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais nas queijarias, o que sinaliza essa atividade como importante no âmbito social e

econômico (ÂNGELO et al., 2009), e são desenvolvidas por uma parcela considerável de pequenos produtores estabelecidos principalmente na zona rural, significando sua principal fonte de renda, já que esses produtos são largamente consumidos. Que conforme Menezes (2011), devido às características como o sabor peculiar e principalmente a forma de consumo deste alimento, o mesmo, a cada dia, adquire novos consumidores.

Trata-se de produto popular e que faz parte da cultura da região Nordeste; entretanto, não existe padronização do seu processo de elaboração, sendo comum o emprego do leite cru, o que coloca em risco a saúde do consumidor. A maioria dos queijos coalho é fabricada em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais (COSTA, 2009), apresentando riscos de toxinfecções alimentares. Por isso, faz-se necessária a utilização de tecnologias que prolonguem a sua vida útil já que é um produto facilmente perecível (ARAÚJO et al., 2009).

3.1.4 Principais microrganismos patogênicos presentes em queijos

A produção de queijo coalho apresenta um grande desafio relacionado à segurança alimentar, pois 85% desta produção ocorrem a partir do leite cru, que não atende no seu processo de ordenha, as normas higiênicas sanitárias das Boas Práticas de Manipulação (BPM), apesar do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (IN nº 30/2001, MAPA), estabelecer que o leite a ser utilizado no processo de fabricação do queijo coalho deve ser submetido à pasteurização (SOUZA et al., 2014).

A microbiota dos queijos pode ser dividida em dois grupos: bactérias lácticas iniciadoras e microrganismos secundários. As primeiras são responsáveis pela transformação de lactose em ácido láctico durante a preparação do queijo; suas enzimas também contribuem na maturação, estando envolvidas na proteólise e na conversão de aminoácidos em substâncias voláteis responsáveis pelas propriedades organolépticas do produto. Os microrganismos secundários compreendem as bactérias lácticas não-iniciadoras, que crescem no interior da maioria das variedades de queijos, e outras bactérias, leveduras e/ou fungos que crescem, tanto no interior, quanto na parte externa dos queijos e são característicos de uma variedade específica ou de um grupo de tipos intimamente relacionados. Entre estes microrganismos estão os proteolíticos, os lipolíticos, e os produtores de gás (PERRY, 2004).

Dentre os microrganismos mais relevantes de contaminação podem ser mencionados os pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, que apresentam importância não somente por indicar contaminação fecal, mas também por estarem geralmente implicados em

processos infecciosos, demonstrando, ainda, um grau considerável de deficiência higiênico-sanitária na elaboração do produto (OKURA, 2010).

As bactérias do grupo coliforme são consideradas como os principais agentes causadores de contaminação associados à deterioração de queijos, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos. Consistem em bacilos Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, que não formam esporos e são capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 24-48 horas a 35°C (coliformes totais), e 44,5-45,5°C (coliformes termotolerantes), segundo Silva et al. (2007) e Franco e Landgraf (2008).

No estudo sobre a qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado em Aracaju, Sergipe, realizado por Santana et al. (2008), verificou-se que 93,3% das amostras analisadas não estavam aptas a comercialização, cujos valores estavam acima do limite de tolerância de coliformes presente na legislação brasileira. Os autores concluíram que a elevada população de coliformes totais e termotolerantes detectada indicam má qualidade higiênico-sanitária dos produtos estudados e a necessidade de capacitação quanto às boas práticas de manipulação e produção de alimentos, além de uma efetiva fiscalização.

Os *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae que possui quatro gêneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Planococcus* e *Stomatococcus*. Morfologicamente, os *Staphylococcus* caracterizam-se como cocos Gram positivos, anaeróbicos facultativos, imóveis, não esporulados, catalase e termonuclease positivas, coagulase positiva ou negativa (FRANCO E LANDGRAF, 2008). Um estudo semelhante foi realizado por Feitosa et al. (2003), ao avaliar queijos coalho do Rio Grande do Norte, em que 70% das amostras avaliadas apresentaram *Staphylococcus aureus* e 12% a presença de *Salmonella*, sendo nestas condições classificados como sendo impróprios para o consumo humano.

A contaminação de alimentos por *Salmonella* é muito complexa. Pode ser de origem animal (portadores) e os veículos mais comuns são as carnes de aves, ovos, leite e derivados contaminados ou por meio de equipamentos e superfícies, manipuladores, roedores, insetos ou até mesmo a contaminação cruzada com alimentos de origem vegetal (DRUBI, 2005). O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Sua temperatura ótima de crescimento ocorre a 37°C, são termossensíveis a 60°C por 15-20 minutos e não crescem em temperatura abaixo dos 5°C (FRANCO E LANDGRAF, 2008).

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países situam as salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentemente encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, e os produtos de laticínios são ainda um dos mais importantes veículos de

transmissão de *Salmonella sp* (GRANDI & ROSSI, 2010). Entretanto, a incidência de *Salmonella* em queijo é mais frequente naquele produzido artesanalmente, visto que as normas e os padrões de higiene não são seguidos corretamente (DRUBI, 2005).

A magnitude da situação relacionada a contaminação de queijo requer a intervenção direta de profissionais, tanto do setor produtivo como da área de saúde, que através das suas intervenções podem minimizar o impacto negativo deste agravo nas áreas da saúde pública e econômica, e como na região do semiárido Nordeste ainda não estão definidas as características microbiológicas e os principais pontos de contaminação na cadeia produtiva do queijo, por isso se faz necessário estudos que propicie tais conhecimentos. Daí a necessidade da investigação do perfil microbiológico do queijo coalho, o qual pode apresentar Coliformes totais, Termotolerantes, *Escherichia coli* e *Salmonella ssp.*, como microrganismos indicadores higiênico-sanitários (DANTAS, 2012).

3.2. Polissacarídeos: Uma ênfase nas galactomananas

3.2.1 Aspectos gerais sobre polissacarídeos

Os carboidratos são macronutrientes definidos quimicamente como poli-hidroxialdeído ou poli-hidroxiketona, sendo classificados como monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, conforme o número de unidades carboidráticas presentes nas moléculas (PASTORE, BICAS e JUNIOR, 2013).

Os polissacarídeos são polímeros de monossacarídeos, constituindo moléculas de alta massa molar. São compostos por unidades glicosídicas, podendo estar arranjados tanto em cadeias lineares quanto em cadeias ramificadas ou, ainda, formando redes com cadeias interligadas. O número de unidades monoméricas que forma a cadeia média do polímero é designado como grau de polimerização e varia com o tipo de polissacarídeo.

São biopolímeros amplamente distribuídos na natureza e em comparação com os outros biopolímeros, como proteínas e ácidos nucleicos, oferecem uma maior capacidade de transportar informações biológicas devido a sua variabilidade estrutural (LIMA, 2009).

As propriedades físico-químicas dos polissacarídeos estão correlacionadas às suas estruturas químicas, podendo ser iônicos ou neutros, mas sempre ricos em grupos OH causando seu caráter hidrofílico e formação de ligações cooperativas de hidrogênio. Dependendo das condições iônicas e termodinâmicas do meio eles serão solúveis em água ou formarão géis físicos. Suas características estruturais, que essencialmente determinam suas

propriedades funcionais, são as identidades químicas dos monômeros constituintes, e o tipo de ligação glicosídica entre eles. Em relação à identidade química, os polissacarídeos são classificados como homopolissacarídeos quando todos os monômeros são idênticos, e como heteropolissacarídeos quando existem dois ou mais monômeros diferentes (FILHO, 2009).

Ainda segundo Filho (2009), os polissacarídeos apresentam numerosas vantagens sobre os polímeros sintéticos, pois além de serem abundantes e disponíveis, são obtidos a partir de fontes renováveis como algas, plantas e culturas microbianas de cepas selecionadas e produzidas por técnicas de DNA recombinante. Estes biopolímeros têm uma grande variedade de composições e propriedades que dificilmente podem ser mimetizadas em laboratórios químicos. Por isso, estes polímeros naturais vêm sendo estudados como materiais de revestimento e no processo de formação de géis.

Redeshi (2006) também ressalta que os polissacarídeos apresentam uso consagrado na indústria alimentícia e farmacêutica, atuando como agentes filmógenos, espessantes, emulsionantes, estabilizantes, formadores de matrizes hidrofílicas e hidrogéis, entre outras aplicações. Tais características devem-se as suas propriedades coloidais, que em contato com solvente apropriado ou agente de intumescimento, produzem géis ou soluções de elevada viscosidade, mesmo em baixas concentrações.

Os polissacarídeos apresentam atividades biológicas e propriedades físicas e químicas que permitem aplicabilidade na indústria de alimentos, pois são, em geral, atóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e polifuncionais. Os polissacarídeos com aplicações industriais são extraídos de plantas, incluindo as algas, de animais e fungos, ou são obtidos via fermentação microbiológica. Nas plantas superiores estes podem ser obtidos de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos. Outros são produtos de biossíntese microbiana (xantana, gelana, dextrana, curdlana) ou podem ser obtidos através de modificações químicas de polissacarídeos naturais, como pectina, gelatina, amido, carbiximetilcelulose de sódio. (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009; PASTORE, BICAS e JUNIOR, 2013).

Cunha, Paula e Feitosa (2009) em suas pesquisas sobre polissacarídeos da biodiversidade brasileira, ressaltam que o país tem todas as condições para transformar o conhecimento de polissacarídeos da sua biodiversidade em valor econômico e bem-estar para a população, sem prejuízo da sustentabilidade ambiental. A formação de parcerias e redes de competências entre o setor acadêmico e a indústria é essencial, assim como políticas públicas capazes de incentivar uma postura ambientalmente correta por parte da indústria.

Neste contexto, segundo Joshi e Kappor (2003) e Cerqueira et al. (2009), as tendências internacionais exigem a introdução de fontes alternativas de polissacarídeos de

sementes, sendo fundamental a busca de fontes renováveis, de fácil acesso pela abundância das espécies vegetais e baixo custo. Portanto, é importante a busca de fontes alternativas e renováveis como a produção de filmes e revestimentos comestíveis e biodegradáveis.

Dentre os principais produtos de reserva sintetizados pelas plantas, os polissacarídeos são a estratégia evolutiva de maior sucesso. O amido é o mais abundante, seguido pelos frutanos e pelos polissacarídeos de parede celular. Sendo estes, com base nos aspectos estruturais, são agrupados em três classes: mananas, xiloglucanas e galactanas. Por sua vez, o grupo das mananas é subdividido em mananas puras, glucomananas e galactomananas (REID et al., 1979 e BUCKERIDGE et al., 2000 citado por SOARES, 2009). Segundo Cunha, Paula e Feitosa (2009), os polissacarídeos de sementes podem ser divididos em de reservas ou estruturais. Os de reservas são os mais utilizados industrialmente, dentre eles, incluem as galactomananas, xiloglucanas, glucanas e mananas, mas as duas primeiras destacam-se em aplicações industrial. Na tabela 9 pode-se observar as principais características dos polissacarídeos de reserva da parede celular.

Tabela 9: Características dos polissacarídeos de reserva da parede celular.

Polissacarídeo	Cadeia principal	Unidades laterais	Localização na planta	Exemplo
Mananas	D-Manose	Raramente D-galactose	Semente	Café, gergilim
Glucomanana	D- Manose e D-Glucose	D-galactose	Semente; órgãos subterrâneos	Alface e tomate; <i>Liliaceae</i>
Galactomanana	D-Manose	D-galactose	Semente	<i>Leguminosas, Ananácea</i>
Xiloglucana	D-Glucose	D-Xilose, D-Galactose e D-Arabinose	Semente	<i>Leguminosa, Tropaeolacea, Mirinacea</i>
Arabino(galactana)	D-Galactose	D-Arabinose	Semente	<i>Leguminosa, café</i>

Fonte: Buckeridge et al. (2000) citado por Soares (2009) com modificações.

3.2.2 Conceitos e composição química das galactomananas

As galactomananas são polissacarídeos de reserva da parede celular encontradas em maior quantidade na natureza. Além disso, são um dos sistemas sobre o qual se tem maior conhecimento acerca da biossíntese (LIMA, 2009) e constituem o segundo maior grupo de açúcares de reserva de energia nas plantas superiores (ALVES et al., 2010; GEMIN, 2008).

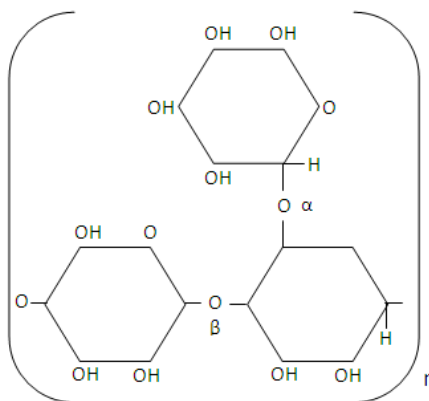
As galactomananas estão contidas em sementes de plantas, comumente encontradas no endosperma das sementes de leguminosas, onde são utilizadas como fonte de

reserva para o vegetal, podendo ser obtidas também a partir de fontes microbianas, como leveduras e fungos (SALVALAGGIO, 2010; SOUZA et al., 2009; LIMA, 2009).

De acordo com ROSA et al. (2009) as galactomananas estão presentes em 13 famílias vegetais: *Annonaceae*, *Compositae*, *Convolvulaceae*, *Ebenaceae*, *Mimosaceae*, *Caesalpinaceae*, *Fabaceae*, *Lagoniaceae*, *Malvaceae*, *Palmae*, *Solanaceae*, *Tiliaceae*, *Umbelliferae* e possivelmente nas *Cuscutaceae*.

As galactomananas são definidas quimicamente, como polissacarídeos ramificados cuja estrutura básica é formada por uma cadeia principal composta por resíduos de D-manopiranosose ligados entre si por ligações O-glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, sendo as ramificações constituídas geralmente por um único resíduo de D galactopiranosose ligado a cadeia principal por ligações O-glicosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$. (DEA; MORRISON, 1975 citados por ALVES et al., 2010; CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009). A estrutura química representativa da galactomanana pode ser observada na figura 21.

Figura 21: Segmento representativo de uma cadeia de galactomanana.



Com relação às propriedades das galactomananas, sabe-se que elas formam soluções altamente viscosas em contato com a água. Neste aspecto, é importante considerar sua massa molar, sua relação proporcional de manose/galactose e distribuição de galactose na cadeia polissacarídica (MESQUITA et al., 2009).

A relação entre manose/galactose (M/G) e a distribuição ao longo da cadeia principal é uma das principais características bioquímicas das galactomananas, as variações dos monômeros proporcionam diferentes propriedades físico-químicas à estrutura formada, ocasionando variação na densidade; solubilidade, a qual é afetada pelo grau de substituição da galactose em relação a cadeia de manose, ou seja, quanto maior o teor de D-galactose, maior a

solubilidade em água; e viscosidade das soluções. Apesar da relação M/G fornecer informações importantes, galactomananas com a mesma relação, podem apresentar propriedades muito distintas, portanto, a razão M/G não é o único fator a influenciar as propriedades funcionais das galactomananas. A massa molar e a distribuição sequencial dos resíduos galactopiranosila, ao longo da cadeia principal são importantes (AZERO e ANDRADE, 2002; ROSA et al., 2009). Suas propriedades reológicas e de solubilidade dependente do grau de substituição. Em sistemas aquosos simples, elas são espessantes eficazes e, quando associadas a outros polissacarídeos, tais como xantanas, podem produzir géis. O nível de substituição e a distribuição de galactose desempenham um papel importante na formação do gel (GEMIM, 2008; MATOS, 2008).

A estrutura química das galactomananas provenientes de diferentes sementes de espécies vegetais pode ser analisada por meio de diferentes técnicas com objetivo de estimar a composição monossacarídica e, conseqüentemente, sua razão M/G. Tais resultados podem ser obtidos através de técnicas cromatográficas, como a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Cromatografia gasosa líquida (CGL), Cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-MS), e Cromatografia de coluna de troca iônica associado a métodos enzimáticos. Outras técnicas, tais como análise de metilação e oxidação com periodato podem ser empregadas. No entanto, para investigar a estrutura fina desses polissacarídeos, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) desponta como ferramenta promissora (SOARES, 2009).

As gomas de *Caesalpinia pulcherrima* e *Cassia javanica* possuem razão manose/galactose próxima à de alfarroba (~3:1) e rendimentos de extração compatíveis com os obtidos industrialmente, 25 e 26%, respectivamente. As espécies de maior utilização industrial, principalmente em alimentos, são as extraídas de *Cyamopsis tetragonolobus* (goma guar) e de *Ceratonia siliqua* (alfarroba). A proporção de manose e galactose nestes polissacarídeos é, respectivamente, ~1,7:1 e ~3:1 (CUNHA, PAULA e FEITOSA, 2009).

Os estudos com galactomananas visam, principalmente, o interesse comercial. Porém, as galactomananas procedentes de fontes da América Latina são pouco utilizadas industrialmente, apesar da biodiversidade da flora, local e clima favorável para sua produção ou para o desenvolvimento das espécies nativas (AZERO e ANDRADE, 2002). No Brasil a importação de polissacarídeos supera a exportação (CUNHA, PAULA, FEITOSA, 2009).

No entanto, salienta-se que a demanda no Brasil por hidrocolóides e por polímeros biocompatíveis está crescendo, mas não obstante as condições favoráveis para a sua produção, e por isso as empresas nacionais dependem da importação de tais produtos. Devido

a sua capacidade de formar soluções de alta viscosidade mesmo em baixas concentrações, como a 0,5 a 1%, são bastante úteis comercialmente, especialmente como espessantes. A obtenção de galactomananas que possam substituir em parte ou totalmente as gomas tradicionais pode trazer muitos benefícios econômicos e sociais, visto que tais polímeros não possuem nenhum valor agregado (MAHAMMAD et al., 2007; SILVA et al., 2011).

A maioria dos estudos sobre galactomananas visam principalmente o interesse comercial que envolve estes polissacarídeos nas diferentes áreas da indústria (MESQUITA et al., 2009). A produção de galactomananas constitui-se em atividade lucrativa em muitas regiões do mundo e compreende várias etapas, que vão do plantio e colheita de sementes até a obtenção industrial da goma (AZERO & ANDRADE, 1999).

As galactomananas são muito empregadas pelas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia; em virtude, principalmente, da sua capacidade de formar gel em associação com outros polissacarídeos, de controlar a atividade de água, de estabilizar soluções e dispersões aquosas, e por causa do seu alto poder espessante (FERNANDES, NAKASHIMA e SERRA, 2004). As galactomananas por darem origem a soluções aquosas viscosidade elevada, mesmo a baixas concentrações o que as torna comercialmente úteis principalmente como agentes espessantes na indústria de alimentos. Além de serem materiais largamente disponíveis, de baixo custo e não tóxicos (SILVA et al., 2011).

Atualmente, as tendências internacionais buscam a introdução de fontes alternativas de gomas de sementes e é, portanto, como fontes alternativas e renováveis que podem ser utilizadas, por exemplo, para a produção de filmes comestíveis e biodegradáveis e revestimentos comestíveis. Em particular, as fontes latino-americanas de galactomananas não são bem conhecidos, apesar da rica biodiversidade da flora local e do clima favorável para a sua produção (CERQUEIRA et al., 2009).

Na área alimentícia, têm-se realizado estudos com filmes de polissacarídeos atuando como material de embalagem, pois possuem potencial para controlar, evitando ou diminuindo, a transferência de massa entre o ambiente e o alimento. As desvantagens dos filmes contendo polissacarídeos em relação aos que contêm polímeros sintéticos, é que não apresentam boas características mecânicas, além de apresentarem uma maior sensibilidade à água. Estudos envolvendo a otimização das características mecânicas e físico-químicas de filmes de polissacarídeos pela adição de diferentes plastificantes foram realizadas e sugerem que a adição dessas substâncias pode amenizar consideravelmente tais desvantagens (CERQUEIRA et al., 2011; MARTINS et al., 2010; OLIVATO, MALI E GROSSMANN, 2006; CERQUEIRA et al., 2009; CERQUEIRA et al., 2012; FAJARDO et al., 2010).

3.2.3. *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Sw.

Caesalpinia pulcherrima (L.) Sw. é uma espécie arbustiva nativa da África oriental conhecida vulgarmente por poinciana-anã, baio-de-estudante, orgulho de barbados, flor-do-paraíso, flamboyant-mirim, flamboianzinho, flor-de-pavão, tendo as sementes como o principal meio de propagação. É uma espécie cultivada pela sua beleza destacada principalmente pela diversidade de inflorescências e o pequeno porte a torna apropriada para a arborização das cidades (OLIVEIRA et al., 2010).

Essa planta pertencente à família *Leguminosae*, com porte médio que cresce em regiões quentes e úmidas da Índia, África e América (FRANCA et al, 2010b). É uma árvore comum em todo o litoral do Nordeste brasileiro, sendo fácil de plantar e crescer, além de produzir uma grande quantidade de sementes (BRAGA et al., 2011). A *C. pulcherrima* pode atingir 3 ou 4 metros na fase adulta. É muito apreciada pelas qualidades ornamentais de suas flores, que apresentam diversas tonalidades e cores como rosa, amarelo, vermelho, laranja e vermelha com extremidades amarelas (FRANCA et al., 2010a).

As folhas de *C. pulcherrima* são bipinadas, 20-40 cm de comprimento, tendo 3-10 pares de pinas, cada um com 60-100 pares de folíolos de 15-25 mm de comprimento e 10-15 mm de largura. As folhas são suportados em racemos até 20 cm de comprimento, com cinco cada flor amarela, laranja ou pétalas vermelhas. O fruto é uma vagem de 6-12 cm de comprimento (CHAKRABORTHY & BADUJAR, 2009). Os espinhos são espaçados nos ramos e a casca da planta é de cor cinza. A época de floração começa a partir de setembro a novembro e frutifica de março a abril (KUMAR, et al., 2010).

As sementes *C. pulcherrima* são ricas em proteínas, apresentando cerca de 26,6% da massa das sementes íntegras e estas ainda não foram exploradas em pesquisas científicas (BRAGA et al., 2009). É uma árvore com uma ampla produção de sementes, de fácil plantio e crescimento. Um estudo feito pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará estimou uma produção média de 40 Kg de galactomananas por hectare plantado de *C. pulcherrima* a cada ano. Portanto, é um biomaterial potencial de baixo custo e alta disponibilidade (FRANCA et al., 2010a). Além disso, a planta possui muitos ingredientes ativos farmacêuticos como flavonóides, carotenóides, glicosídeos, fenóis e esteróides (CHAKRABORTHY & BADUJAR, 2009). Apresentando várias propriedades medicinais, utilizadas no tratamento de úlcera, febre, tumores, asma e doenças de pele (BOSE et al., 2011). A planta *Caesalpinia pulcherrima* pode ser observada na figura 22.

Figura 22: Partes individualizadas da *Caesalpinia pulcherrima* (A: Planta; B: Flores; C: Frutos; D: Sementes).



Fonte: São Benedito, 2013.

3.2.4 Utilização de galactomananas como revestimentos

As características das galactomananas, principalmente, relacionada às suas propriedades de formarem soluções viscosas, mesmo em baixas concentrações (SILVA et al., 2011), tornam este polissacarídeo um produto possível de ser adicionado aos alimentos como forma de melhorar as características dos mesmos e seus atributos de qualidade. Soares et al. (2012) ressaltam as formas de utilização das galactomananas, e na área de alimentos, podem ser utilizadas como espessantes, estabilizantes e substitutos de gordura.

Segundo Cerqueira et al. (2011) as galactomananas, polissacarídeos naturais, são um material alternativo na produção de filmes e revestimentos, tendo como principal fator a sua comestibilidade e biodegradabilidade. O seu funcionamento e desempenho dependem das suas propriedades, bem como o seu processo de formação e método de aplicação no produto.

Vale salientar também que a caracterização e aplicação de galactomananas como filmes e revestimentos ainda é muito limitado quando comparada com o disponível para outros polissacarídeos. No entanto, há novas perspectivas sobre as propriedades e a utilização de filmes e revestimentos comestíveis a base de galactomanana (CERQUEIRA et al., 2011).

A utilização dos filmes e revestimentos comestíveis tem sido alvo de estudos com a finalidade de ser utilizado como ferramenta para a conservação dos alimentos, já que preservam os mesmos e funcionam como uma barreira impedindo o contato com o meio externo. Além disso, esta técnica leva a pesquisadores a desenvolverem embalagens que sejam biodegradáveis e que não prejudiquem o meio ambiente.

No seu estudo, Alves et al. (2010) avaliaram a aplicação de revestimento comestível a base de galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* em queijo coalho, o qual avaliaram as suas características físico-química e sensorial, analisando a interferência da adição deste polissacarídeo. Cerqueira et al. (2010) estudaram a aplicação de duas camadas diferentes de polissacarídeos (galactomanana e quitosana), bem como a temperatura de armazenamento quando aplicado em queijo.

Cerqueira et al. (2009), avaliaram a composição dos revestimentos a base de galactomanana provenientes de fontes de *C. pulcherrima* e *A. pavonina* como forma de prorrogar a vida útil de frutas tropicais: acerola, cajá, pitanga, manga e seriguela. As concentrações testadas foram 0,5; 1,0; e 1,5% de galactomanana e 1,0; 1,5; e 2,0% de glicerol. Lima et al. (2010) avaliaram a mistura de galactomanana de *C. pulcherrima* e *A. pavonina*, bem como colágeno e glicerol para a formação de películas aplicadas em mangas e maçãs e os resultados demonstraram que os revestimentos podem estender a vida útil.

Cerqueira et al. (2009), avaliaram também a aplicação de galactomanana de *Gleditsia triacanthos* com adição de plastificante como revestimentos de queijo e ressaltaram que os queijos com revestimentos apresentaram menor perda de peso, mas que, no entanto, há necessidade de mais pesquisas, incluindo novas fontes de galactomananas.

Além disso, estudos têm sido realizados também utilizando as soluções de galactomananas como veículo para a incorporação de substâncias ativas, que possam contribuir para o aumento da vida útil dos alimentos. Todavia, faz-se necessário avaliar as propriedades dos constituintes verificando as interações entre a película de galactomanana e os componentes adicionados, bem como em relação à matriz alimentar.

Martins et al. (2010), avaliaram a vida útil de ricota com revestimento comestível utilizando galactomananas de *Gleditsia triacanthos* e realizaram a incorporação de nisina. E Fajardo et al. (2010), em seu estudo avaliando película a base de quitosana, utilizaram o

antimicrobiano convencional natamicina visando melhorar a estabilidade de queijo saloio. Salimena et al. (2010) estudaram a inserção de óleo essencial *Syzygium aromaticum* em queijo minas frescal. Os autores ressaltam que a inserção de tais constituintes foi importante para se ter um melhor controle microbiano.

Soares (2009) produziu e estudou filmes comestíveis a partir de blends de galactomanana, amido de milho geatinizado e nisina. Esses materiais foram caracterizados através de RMN, espectroscopia de IR, reologia, medida de atividade de água (aw), DSC e análises microbiológicas. Os filmes comestíveis de galactomanana foram produzidos com a finalidade de recobrir queijos e foi observado que a presença do recobrimento reduziu o crescimento extensivo de fungos quando comparado ao queijo não recoberto.

Diante do exposto, observa-se que o estudo sobre revestimentos comestíveis a base de galactomanana propõe que a extensão da vida útil dos alimentos é uma meta das pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novas tecnologias visando à redução de perdas, melhoria nos processos, estabilidade físico-química e microbiológica, bem como os aspectos relacionados a qualidade sensorial destes produtos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

O óleo essencial de *C. citratus* foi obtido conforme descrição no capítulo 1, em que suas folhas foram obtidas no município de Limoeiro do Norte. A galactomanana de *C. pulcherrima* foi obtida a partir de suas sementes, as quais foram coletadas no município de São Benedito. Para a produção do queijo coalho foi utilizado leite pasteurizado e padronizado da marca Lassa® e coagulante líquido HA-LA®. Para as análises microbiológicas, foi utilizado em algumas etapas, placas Petrifilm™ para contagem de coliformes e placas Petrifilm™ Staph (3M Microbiology) para determinação de *Staphylococcus aureus* coagulase-positivo. Todos os reagentes utilizados para as análises físico-químicas foram de grau analítico.

4.2 Obtenção da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*

As sementes de *C. pulcherrima* foram obtidas no município de São Benedito. Inicialmente as sementes foram selecionadas, retiradas as que se encontravam furadas, abertas, com fungos e em estado de senescência. Em seguida, foram submetidas ao processo de aquecimento a 100°C durante 30 minutos. Logo após as sementes foram resfriadas a temperatura ambiente e descascadas manualmente, e o endosperma foi isolado.

O endosperma foi homogeneizado com água destilada em liquidificador industrial na proporção de 1:50 (m/v) dando origem a uma solução viscosa, a qual foi submetida ao processo de centrifugação em centrífuga refrigerada modelo 580 R na rotatividade 2500 rpm, temperatura de 6°C, durante 20 minutos, a fim de separar as partículas sólidas remanescente do endosperma. O resíduo da centrifugação foi novamente diluído e centrifugado.

Posteriormente, a solução foi precipitada em álcool etílico a 96°gL na proporção de 1:3 (m/v) e em seguida foi filtrado em bomba à vácuo com o auxílio de um funil de placa porosa, a fim de retirar a água remanescente do extrato, sendo este, após a filtragem, imerso em acetona P.A. permanecendo por 24 horas afim de que ocorresse uma desidratação e a retirada do álcool remanescente. Em seguida o extrato foi novamente filtrado em bomba à vácuo utilizando o funil de placa porosa, para remover a acetona.

O extrato foi transferido para a estufa à vácuo modelo VT 6025 a uma temperatura de 30°C durante o período de 24 horas, até que estivesse completamente seco. Após esse processo as galactomananas foram trituradas em moinho e acondicionadas em um

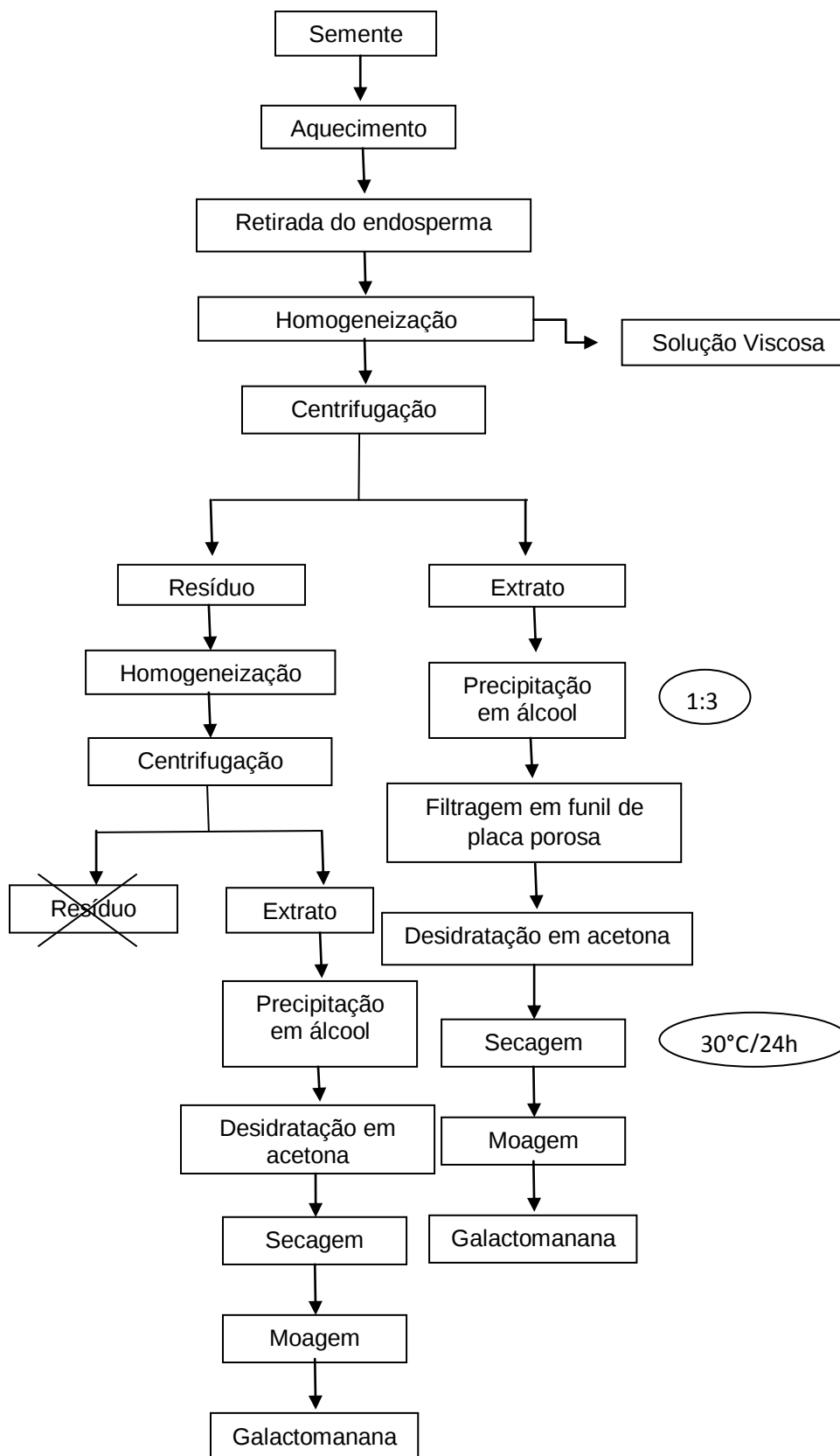
recipiente de polietileno. O procedimento descrito da extração da galactomanana foi realizado conforme Braga et al. (2011) com modificações (Figura 23). Ressalta-se que o resíduo centrifugado da primeira extração foi novamente diluído, seguindo normalmente as etapas citadas, já o resíduo desta última foi descartado.

O cálculo do rendimento das galactomananas foi realizado a partir de três extrações, relacionado a massa da galactomanana obtida e massa das sementes e o resultado multiplicado por 100, para expressar o resultado em porcentagem (m/m).

4.3 Caracterização da galactomanana: Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A caracterização da galactomanana foi realizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H). Os espectros das amostras em D_2O foram registrados a 80°C com transformada de Fourier espectrómetro Bruker Avance (modelo DRX 500, Rheinstetten, Alemanha), com 500 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm. Os procedimentos foram realizados conforme Buriti et al. (2014).

Figura 23 - Fluxograma de extração de galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima*.

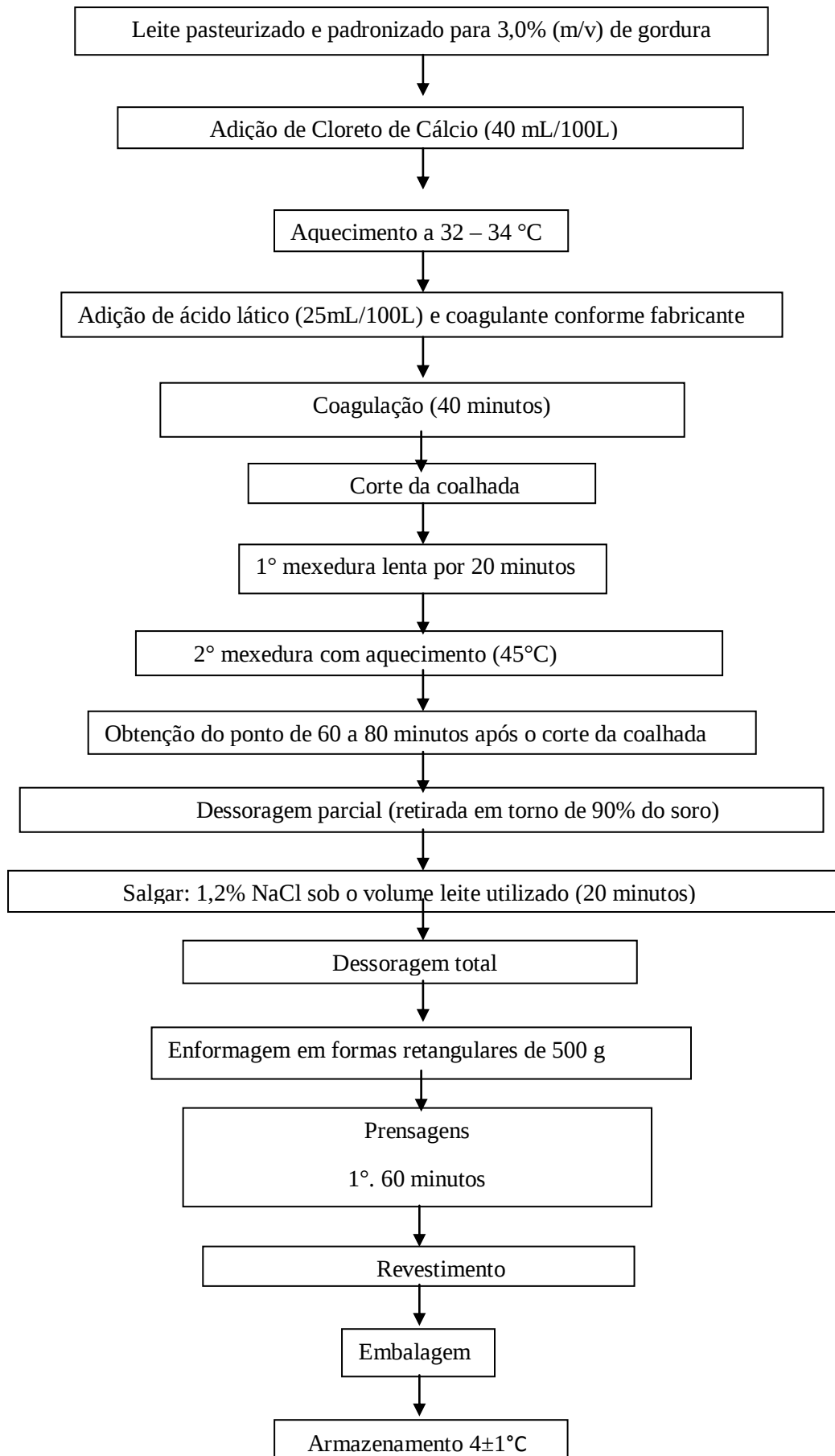


4.4 Processo de fabricação do queijo coalho

O leite de vaca utilizado foi do tipo padronizado e pasteurizado. O leite foi aquecido até 35°C, sendo esta temperatura ideal para a adição dos ingredientes, cloreto de cálcio 40%, ácido láctico 25% e coagulante líquido HA-LA[®]. Em seguida, o leite foi homogeneizado por cerca de dois minutos e deixado em repouso por um período médio de 40 minutos. Posteriormente, quando a coalhada apresentou-se com aspecto firme e brilhante, foi realizado o corte da coalhada lentamente utilizando as liras do tipo vertical e horizontal. A massa permaneceu em repouso por cerca de cinco minutos.

A mexedura foi iniciada com movimentos leves, com auxílio de uma pá de aço inoxidável durante 20 minutos até que a temperatura da massa atingisse 45°C, permanecendo por 30 minutos. Posteriormente, foi realizado a dessoragem, retirando-se cerca de 90% do soro. A massa foi submetida a salga a 1,2% e deixada em repouso por 20 minutos. Em seguida, foi realizado a segunda dessoragem a fim de obter-se uma massa firme e compacta. A massa foi colocada em formas plásticas e, logo em seguida, foi submetida à prensagem durante 15 horas, sendo realizada uma viragem após uma hora.

Os queijos foram revestidos com a solução de galactomananas e óleo essencial, e deixados em repouso por 2 horas. Em seguida, foram embalados em bandejas de poliestireno expandido e cobertos com folha de policloreto de polivinila, sendo estes submetidos a oito furos por amostra. Vale salientar que a aplicação desta folha teve o objetivo de proteger as amostras contra possíveis sujidades e gotículas de água em decorrência do transporte e armazenamento das amostras. Por fim, os queijos foram armazenados sob refrigeração (4±1°C). O fluxograma de produção do queijo coalho foi realizado conforme Machado et al. (2011) com modificações, sendo que o mesmo pode ser observado na figura 24.

Figura 24: Fluxograma de etapas da fabricação e revestimento do queijo coalho.

4.5 Preparo da película de revestimento e incorporação do óleo essencial

Os revestimentos foram obtidos a partir de soluções variando quanto ao teor de galactomananas, sendo utilizados 0; 1; e 2% (m/v). E em relação ao teor de óleo essencial, foram utilizados percentuais de 0; 0,2; e 0,5%. (v/v) Para todos os tratamentos avaliados foram adicionados 0,1% de polissorbato 80 (v/v). Inicialmente, a galactomanana foi esterilizada a 121°C/15 minutos. Em seguida, a mesma foi solubilizada em água destilada estéril, e dissolvida sob agitação magnética por 5±1 hora. Posteriormente, os queijos previamente fateados, foram pincelados com a solução de cobertura, como mostra a figura 25.

Vale salientar que as concentrações de óleo essencial foram selecionadas com base nos testes da atividade antibacteriana. Além disso, levou-se em consideração a aplicação do revestimento com o objetivo de inibir microorganismos que pudessem vir a contaminar o queijo, além de possíveis alterações sensoriais ao ser adicionado no queijo coalho.

Figura 25: Processo de produção e aplicação do revestimento a base de galactomanana e óleo essencial (A: Solubilização da galactomanana em água destilada; B: Queijos prontos para a aplicação do revestimento; C: Aplicação do revestimento por meio de pincelagem; D: Queijos revestidos e embalados).



Fonte: Sobral, 2014.

4.6 Caracterização microbiológica e físico-química da matéria-prima

A qualidade higiênico-sanitária do leite foi atestada conforme aplicação das análises microbiológicas, tais como Coliformes Totais e Termotolerantes, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e Contagem de Aeróbios Mesófilos (SILVA et al., 2007). Quanto à composição química do leite, foram realizadas as análises de pH, densidade, acidez, umidade, gordura, proteína, cinzas, cálcio, extrato seco total e extrato seco desengordurado conforme normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.7 Estabilidade dos queijos revestidos: seleção da melhor formulação

A estabilidade dos queijos revestidos (nove tratamentos) foi realizada em três tempos ao longo do armazenamento, sendo estes, 1, 10 e 20 dias. Os queijos foram submetidos às análises físico-químicas de umidade, atividade de água e pH de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). Além disso, foram realizadas as análises de perda de peso, em que foram obtidas por diferença de peso ao longo do armazenamento. Foram avaliadas também as características dimensionais dos queijos.

Foram realizadas também as análises microbiológicas, tais como Coliformes Totais e Termotolerantes, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e Contagem de Aeróbios Mesófilos (SILVA et al., 2007). Os resultados foram analisados conforme a RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

4.8 Avaliação da estabilidade do produto final: queijo tipo coalho com revestimento constituído de 1% GAL e 0,2% OE e queijo controle

O queijo coalho com revestimento comestível elaborado com 1% de galactomanana e 0,2% de óleo essencial e a amostra controle foram caracterizadas quanto a sua composição centesimal, microbiológica, avaliação sensorial, intenção de compra, análise da textura e capacidade de derretimento durante o seu armazenamento sob refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$) ao longo de 30 dias, sendo avaliados com 7,15 e 30 dias.

4.8.1 Composição físico-química dos queijos selecionados

Os queijos selecionados foram submetidos às análises de atividade de água (Aa), em aparelho medidor de atividade de água Higrómetro 95 da marca Etec Aparelhos de Medição. Análise de pH, utilizando aparelho potenciômetro digital tipo Hanna, devidamente calibrado com solução tampão de pH 7,0 e 4,0.

A acidez titulável (expressa em ácido láctico); umidade (% m/m); gordura (%), a qual foi determinada pelo método Butirométrico de Gerber; cinzas (%), a qual foi determinado utilizado o método de incineração da amostra em mufla à 550°C; proteínas (%), sendo realizado através da análise do conteúdo de nitrogênio pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando o fator de conversão 6,38; cálcio (mg/100g), sendo determinado por volumetria com EDTA. Todas as análises foram realizadas conforme as Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz (IAL, 2008).

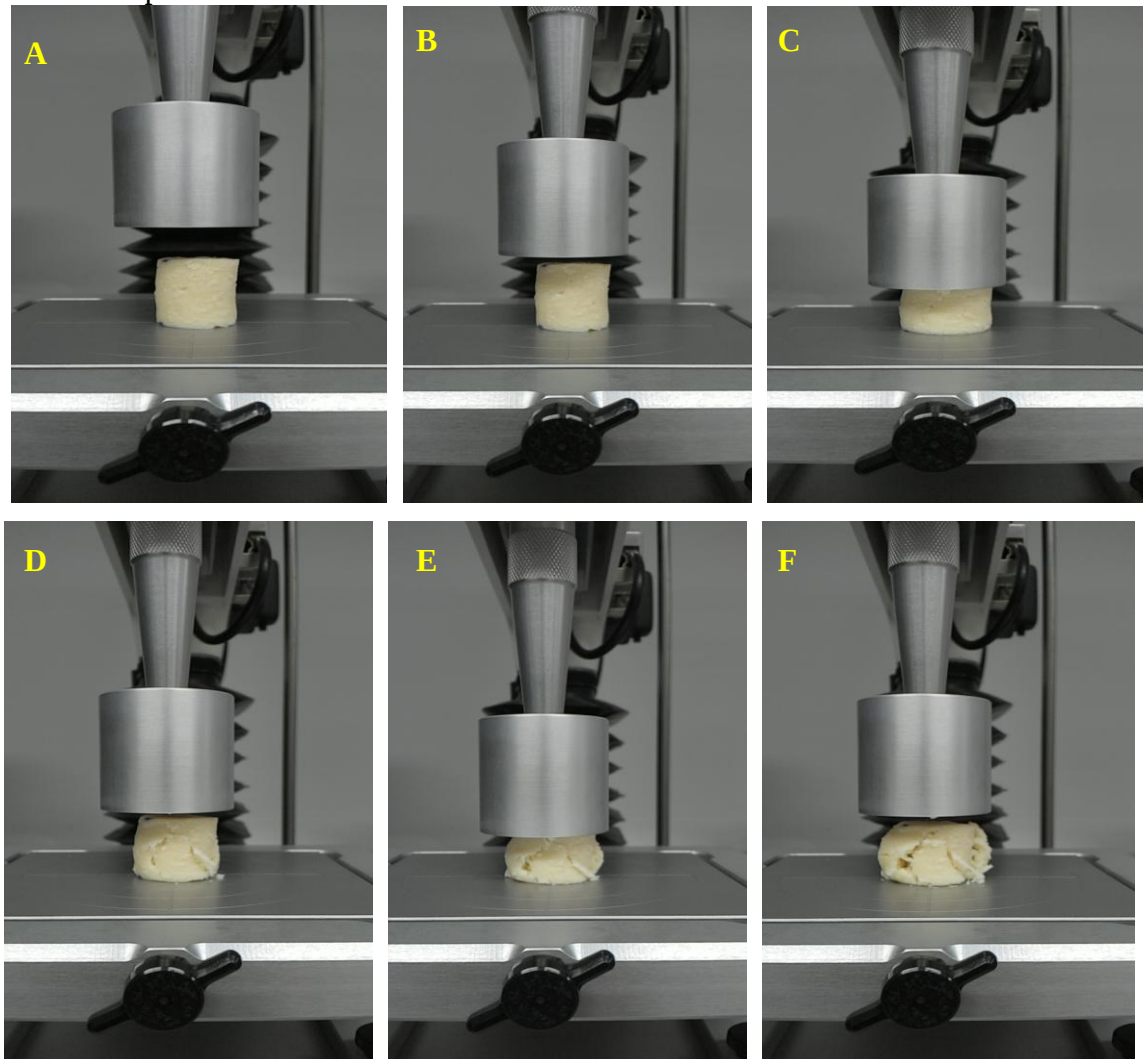
O Extrato Seco Total, EST (%) foi determinado por diferença da composição total e o teor de umidade; e o teor de Gordura no Extrato Seco (%) foi obtido através da diferença entre o percentual de gordura e extrato seco total, multiplicado por 100.

4.8.2 Perfil de textura instrumental dos queijos selecionados

O perfil da textura foi determinado através de teste de dupla compressão nas amostras. Os testes de textura são baseados em força de compressão, onde a amostra passa por duas forças de compressão, denominadas de “mordidas”, tendo como função a simulação da mastigação entre os dentes molares. Este teste foi realizado imediatamente após a retirada das mesmas do acondicionamento sob refrigeração, utilizando um “probe” SMS P/36R, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra).

Foram analisados os atributos que compõem as características mecânicas dos queijos, tais como dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência, sendo os dados coletados através do programa “Texture Expert for Windows” (Stable Micro Systems). Foram atribuídos os seguintes parâmetros: amostras de queijo coalho em formato cilíndrico com 2 cm de altura e 2 cm de diâmetro. Valores de pré-teste: 1 mm/seg; teste: 2 mm/seg; pós-teste: 2 mm/seg; distância de compressão de 10 mm; time de 5 seg; e trigger de 1,00 N (SILVA, 2013; ANDRADE, 2006). A análise de instrumental de textura foi realizada em decauplicata (Figura 26).

Figura 26: Análise de textura em equipamento texturômetro TA-XT2 com demonstração das etapas da primeira (A, B, C) e segunda compressão (D, E, F) do queijo coalho sem revestimento após 30 dias de armazenamento.



4.8.3 Análise da capacidade de derretimento dos queijos selecionados

A capacidade de derretimento foi avaliada nos tempos de 15 e 30 dias de armazenamento refrigerado seguindo metodologia descrita por Machado et al. (2011) e Santos et al. (2011). Inicialmente, os queijos foram fatiados com espessura de 7 mm e em seguida, por meio de um cilindro de 36 mm de diâmetro foi retirado a amostra da peça de queijo. No centro de uma placa de petri, marcada com quatro linhas gerando um ângulo de 45° entre elas foi colocado uma amostra, sendo medidos quatro diâmetros (D_i). Posteriormente, as placas foram deixadas a temperatura ambiente por 30 minutos e em seguida, foram encaminhadas para estufa a 107° por sete minutos. Após a retirada da estufa, as placas foram mantidas a

temperatura ambiente por 30 minutos. O diâmetro de cada amostra foi medido (D_f). A capacidade de derretimento foi calculada seguindo a equação 3.

Eq.

$$CD (\%) = \frac{(D_f^2 - D_i^2)}{D_i^2 \times 100} \quad (3)$$

CD: Capacidade de derretimento

D_f^2 : Diâmetro final

D_i^2 : Diâmetro inicial

4.8.4 Avaliação microbiológica dos queijos selecionados

As análises microbiológicas foram realizadas a fim de constar a qualidade das amostras (queijo coalho revestido e o controle) a serem submetidas à avaliação sensorial. Os testes microbiológicos aplicados foram Coliformes Totais e Termotolerantes, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2007). Os resultados foram analisados conforme a RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

4.7.5 Avaliação sensorial e Intenção de compra dos queijos selecionados

O recrutamento dos julgadores foi composto por professores e alunos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará, Campus Sobral, sendo estes convidados a participar da pesquisa e informados dos objetivos e importância da análise sensorial para o desenvolvimento do projeto. Houve a participação de 60 provadores para cada tempo de avaliação em relação a estabilidade do produto. Tais provadores foram conduzidos a cabines individuais, em ambiente apropriado, livre de odores, ruídos e com iluminação adequada. As amostras foram servidas em copos plásticos descartáveis, sendo estes previamente codificados com três dígitos, de forma sequencial e aleatória. Juntamente com as amostras (queijo coalho com revestimento e sem revestimento), os provadores receberam um formulário para que pudessem avaliar a aceitabilidade do produto, sendo este avaliado através da aplicação do teste de aceitação global, onde os atributos de sabor, aroma, cor, textura e impressão global foram analisadas por meio de uma escala estruturada com 9 pontos, em que os escores 1, 5 e 9

representavam desgostei muitíssimo; nem gostei e nem desgostei; e gostei muitíssimo, respectivamente (ANEXO A).

Foram avaliados também a preferência positiva dos julgadores, bem como a intenção de compra, os quais utilizaram uma escala estruturada com 5 pontos, em que 1 representava certamente não compraria e 5 certamente compraria, com a finalidade de expressar a intenção positiva ou negativa em relação ao produto avaliado (ANEXO B).

Os testes sensoriais foram realizados conforme procedimentos descritos por DUTCOSKI (1996) e MINIM (2006).

4.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental para o recobrimento dos queijos foi realizado através de blocos completos com repetições, utilizando fatorial 3x3x3, tendo como fator as concentrações de galactomananas, óleo essencial e tempos de armazenamento.

A constituição dos revestimentos a partir dos diferentes percentuais de galactomananas e óleo essencial proporcionaram a produção de nove tipos diferentes de revestimentos, possibilitando o estudo de nove tratamentos, conforme tabela 10 e 11. Vale ressaltar que em todos os tratamentos foram adicionados 0,1% de óleo essencial.

Após a análise de variância, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. Todos os resultados foram realizados com auxílio do programa estatístico ASSISTAT (SILVA, 2011).

Tabela 10: Níveis de variáveis codificadas do planejamento fatorial.

Variável codificada	Variável real	Nível inferior (-1)	Nível central (0)	Nível superior (+1)
X1	Galactomanana	0,0%	1,0%	2,0%
X2	Óleo essencial	0,0%	0,2%	0,5%

Tabela 11: Matriz experimental das variáveis codificadas do planejamento fatorial.

Variável codificada	Experimento								
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
X1	-1	-1	-1	0	0	0	+1	+1	+1
X2	-1	0	+1	-1	0	+1	-1	0	+1

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

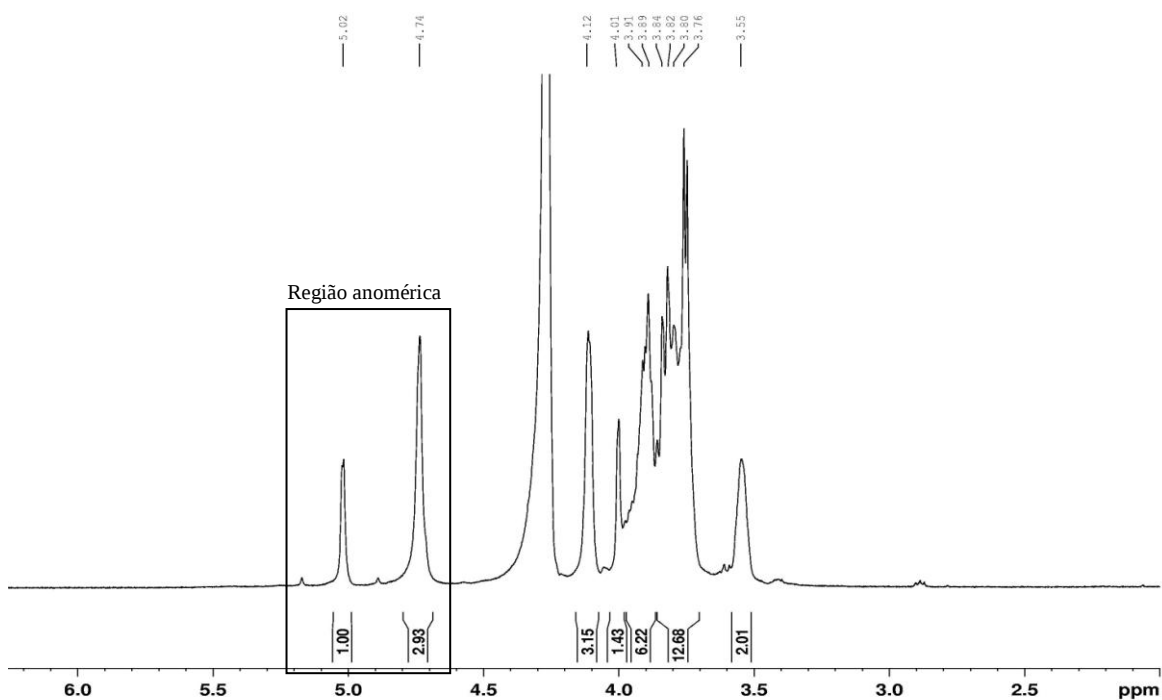
5.1 Rendimento da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima*

O rendimento médio do processo de extração da galactomanana das sementes de *C. pulcherrima* foi de $25,44 \pm 0,60\%$. O resultado encontra-se semelhante aos rendimentos obtidos industrialmente que, de acordo com CUNHA, PAULA e FEITOSA (2009) e AZERO & ANDRADE (1999), este rendimento é de 25% para as gomas alfarroba e guar. E por CERQUEIRA et al. (2009) que obtiveram um rendimento de 25,70%. ALVES et al. (2010) ao avaliarem queijos revestidos com embalagens biodegradáveis produzidas a partir de galactomananas de sementes de flamboianzinho, obtiveram um rendimento de 19,3% de galactomananas, sendo este valor abaixo do rendimento encontrado no presente trabalho.

5.2 Espectroscopia de RMN ^1H

O espectro de RMN ^1H da galactomanana de *C. pulcherrima*, bem como a sua região anomérica do espectro pode ser observado na figura 27.

Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da solução de (20 mg.mL^{-1}) da galactomanana de *Caesalpinia pulcherrima* em D_2O .



A análise ^1H RMN foi empregada para investigar a estrutura do polissacarídeo de *Caesalpinia pulcherrima*. O espectro ^1H RMN mostrado na figura 27 apresentou sinais de deslocamento químico (δ) atribuídos aos prótons H^1 para dos resíduos alfa-D-galactose e beta-D -manose de 5,02 e 4,74 ppm, respectivamente. A razão (Man:Gal) pode ser obtida diretamente das áreas relativas destes sinais, cujo singleto em 5,02 é compatível com a conformação esperada do anel alfa-D-galactopiranoose, e o sinal de 4,74 ppm corresponde ao monômero beta-D-monopiranoose. A razão da galactomanana de *C. pulcherrima* do presente estudo apresentou um valor de M:G de 2,93:1,0.

Os valores encontrados estão próximos ao de Cerqueira et al. (2009)b, ao aplicar galactomananas como revestimentos em frutas tropicais, cuja razão manose/galactose foi de 2,88 para galactomanana de *C. pulcherrima*, e de 1,35 para galactomanana de *A. pavonina*. Tais autores concluíram que o revestimento a base de *C. pulcherrima*, na concentração de 0,5% adicionado de 1,5% de glicerol foi efetivo quando aplicado em seriguela.

Resultado semelhante foi encontrado por Cerqueira et al. (2009)c ao extrair, purificar e caracterizar galactomanana a partir de fontes não tradicionais, cujo valor de manose/galactose encontrado para galactomanana de *C. pulcherrima* foi de 2,88:1. E também para Azero e Andrade (1999), cuja razão manose-galactose foi de 3:1.

Braga et al. (2011), obtiveram razão manose/galactose de 3,6:1 ao avaliar galactomanana de *C. pulcherrima* como matriz de afinidade interagindo com lectinas. Salvalaggio (2010) ressalta que a relação manose:galactose em torno de 3:1 é característica das galactomananas da subfamília *Caesapinoideae*.

5.3 Caracterização da matéria-prima para a fabricação do queijo coalho

A comprovação da qualidade da matéria-prima é importante, visto que muitos trabalhos na literatura abordam resultados acima do permitido pela legislação, mesmo em leite submetido ao processo de pasteurização. Os resultados dos testes microbiológicos realizados no leite utilizado para a produção dos queijos encontraram-se em conformidade com as exigências estabelecidas pela Resolução RDC nº12 (BRASIL, 2001), cujos valores foram $< 3/\text{mL}$ NMP/mL para coliformes totais e termotolerantes; < 10 g para *Staphylococcus aureus* e para Contagem de mesófilos aeróbios (UFC/mL); e ausência de *Salmonella* sp.

A contagem de microrganismos pode se elevar conforme vários aspectos que estão relacionados com as condições higiênicas de produção, armazenamento, transporte e refrigeração nas diferentes etapas da cadeia produtiva do leite (PINTO, MARTINS e

VANETTI, 2006). Portanto, pode-se afirmar que as condições de industrialização dos lotes utilizados para a produção do queijo foram adequadas para a obtenção de leite com qualidade.

Segundo Arcuri (2006), a disponibilidade de nutrientes no leite e o seu pH próximo a neutralidade torna-o extremamente favorável ao crescimento microbiano. Por isso, o leite deve ser obtido de vacas sadias, em condições higiênicas adequadas e resfriado à 4°C, sendo estas medidas fundamentais e primárias para garantir a qualidade e segurança do leite e dos seus derivados, como o queijo coalho.

Além da caracterização microbiológica, é fundamental conhecer a composição química do leite a ser utilizado para a produção de derivados lácteos. Todas as avaliações apresentaram diferença estatística entre os lotes, com exceção do teor de cinzas. Isto pode estar relacionado à variação na composição química do leite, que Segundo Reis et al. (2007), pode variar conforme a individualidade, raça, alimentação, estágio de lactação, idade, temperatura ambiente, estação do ano, fatores fisiológicos, entre outros. As características físico-químicas do leite utilizado nos quatro lotes estão expostas na tabela 12.

Tabela 12: Composição físico-química do leite fluido.

Análises	pH	Densidade (g/mL)	Acidez (°D)	Umidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)	Cálcio (mg/100mL)	EST (%)	ESD (%)
Repetições										
Lote 1	6,7 a	1,028 a	20,0 ab	89,40 a	2,8 c	na	na	na	10,59 c	7,79 d
Lote 2	6,4 b	1,028 a	18,3 bc	89,16 b	3,0 b	na	0,64 a	100,1 b	10,83 b	7,83 c
Lote 3	6,1 c	1,034 b	20,6 a	87,71 c	3,2 a	2,14 a	0,68 a	144,6 ab	12,28 a	9,11 b
Lote 4	6,6 a	1,033 c	17,6 c	87,79 c	2,8 c	4,76 b	0,70 a	177,4 a	12,20 a	9,40 a
CV (%)	1,11	0,00	3,69	0,04	0,98	18,72	12,50	19,80	0,30	0,07

*NA: não analisado;

** EST: Extrato Seco Total; ESD: Extrato Seco Desengordurado.

O pH do leite utilizado nos quatro lotes apresentaram valores próximos a neutralidade, variando entre 6,1 a 6,7. Tal valor encontra-se de acordo com Malacarne et al. (2013), que obtiveram valor médio de 6,72 ao avaliar o leite cru para eventual aplicação em queijo parmigiano-reggiano, e para Real et al. (2013), que obtiveram pH de 6,67 ao caracterizar leite tipo UHT integral.

A acidez do leite, nos lotes 2 e 4, apresentou-se em conformidade com a legislação brasileira, que preconiza o valor variável de 14 a 18°D (BRASIL, 2011). Valores inferiores foram encontrados por Santos et al. (2011), em amostras de leite pasteurizado, cuja acidez foi de 12°D e por Mendes et al. (2010), que encontraram valores de 16 e 17°D. No entanto, em dois lotes, sendo estes o lote 1 e 3, a acidez apresentou-se relativamente alta, embora a acidez seja caracterizada por mensurar, através do método Dornic, possível

contaminação microbiana, visto que as bactérias fermentam a lactose produzindo ácido láctico (GIOMBELLI et al., 2011). A acidez elevada nos lotes 1 e 3 podem ser explicadas por meio do procedimento analítico, sendo que as análises físico-químicas foram realizadas posteriormente a realização das análises microbiológicas, o que pode ter ocorrido a elevação da acidez durante este período de espera, em torno de 8 horas.

Em relação à densidade, foram observados valores entre 1,028 e 1,034 g/mL, em conformidade com a Instrução Normativa nº62, que estabelece variação de 1,028 a 1,034 g/mL (BRASIL, 2011). Valores aproximados foram obtidos por Real et al. (2013), com densidade média de 1,029 g/mL, com um mínimo de 1,020 g/mL e máximo de 1,031 g/mL.

E também por Mendes et al. (2010), ao realizarem uma pesquisa de fraude no leite informal, com variação entre 1,028 a 1,031. Santos et al. (2011), ao avaliar a composição físico-química de leite pasteurizado padronizado em São Luis (Maranhão), detectaram que 100% das amostras encontravam-se não conforme aos padrões exigidos pela Legislação Brasileira, cuja média foi de 1,023. Segundo os mesmos, a determinação da densidade permite verificar a ocorrência de fraudes, em que valores abaixo de 1,028 indicam adição de água e, valores acima de 1,034, fraude por substâncias estranhas ou desnate do leite, podendo, tais procedimentos serem prejudiciais à saúde do consumidor.

A gordura do leite apresentou percentual variando de 2,8 a 3,2. Sendo que apenas dois lotes estavam conformes com a porcentagem mínima para leite padronizado de 3% (BRASIL, 2011). Valores superiores foram obtidos por Malacarne et al. (2013), cuja média foi de 3,71% e por Mendes et al. (2010), que encontraram variação de 3,4 a 3,8%. Porém, tais valores estão relacionados ao leite integral. Em contrapartida, Santos *et al.* (2011), ao avaliar amostras de leite pasteurizado padronizado encontraram valores entre 2,5 a 3,8%. Vale salientar o exposto por Santos et al. (2011), que a redução da gordura compromete diretamente o rendimento industrial, principalmente em relação à fabricação de queijos, visto que este componente contribui para a consistência destes produtos.

O teor de proteínas, cujos percentuais determinados foram 2,14 e 4,76% para o 3º e 4º lote, respectivamente. No entanto, conforme a Instrução Normativa nº62, a amostra do 3º lote está abaixo do esperado, em que o valor de proteínas deve ser no mínimo de 2,9%.

Os teores de cinzas, 0,64; 0,68 e 0,70%, estão de acordo com os encontrados por Santos et al. (2011), que obtiveram variação de 0,52 a 0,95%, com teor médio de 0,62%. Um dos principais minerais que constituem a composição do leite é o cálcio, nesta pesquisa, foi encontrado teor de 100,0; 144,6; e 177,4 mg/100mL. Tais valores aproximam-se do exposto no rótulo do produto, cujo valor especificado foi de 246 mg referente a uma porção de 200

mL. Leonardi, Canniatti-Brazaca e Arthur (2011), ao avaliar a disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama, obtiveram para a amostra controle valor de 142,4mg/100mL. Mageste et al. (2013), determinaram o teor de cálcio em leite pasteurizado de três marcas comerciais e obtiveram valores de 123,1; 112,2 e 118,2 mg/100 mL.

O Extrato Seco Total (EST) é a reunião dos componentes sólidos do leite e é importante para o rendimento dos produtos derivados, quanto maior a quantidade de sólidos totais, melhor o rendimento deste leite para a indústria de laticínios, e o Extrato seco desengordurado (ESD) reflete o mesmo comportamento, uma vez que esta variável é obtida pela diferença entre o EST e o teor de gordura (SANTOS *et al.*, 2011). A variação obtida para EST foi de 10,59 a 12,28%. Tais valores corroboram aos de Santos et al. (2011), com média de 11,4%; por Mendes et al. (2010), com variação de 11,65 a 12,64 % e por Oliveira et al. (2012), com variação de 12,61 a 13,78%.

O ESD obtido variou de 7,83 a 9,40%, sendo que o 1° e 2° lote apresentaram valores abaixo do recomendado pela legislação, cujo percentual mínimo é de 8,4%. De forma geral, os lotes 3 e 4 encontram-se superiores aos encontrados por Reis et al. (2007), com variação entre 8,13 a 8,59% para o leite obtido de ordenha manual e de 8,05 a 8,25% para o obtido de ordenha mecânica. No trabalho de Santos et al. (2011), o valor médio foi de 8,4%, para Mendes et al. (2010), foi de 8,05 a 8,84% e para Oliveira et al. (2012), em que houve variação de 8,77 a 9,62% quando avaliados leite fluido de diferentes procedências.

5.4 Avaliação da estabilidade de queijo coalho com diferentes revestimentos comestível: Seleção da melhor formulação a base de galactomanana e óleo essencial

5.4.1 Caracterização física e perda de peso

A avaliação da estabilidade de queijo coalho com diferentes revestimento comestíveis foram produzidos com dimensões em torno de 12 cm de comprimento; 7,5 cm de largura; e 4,0 cm de altura apresentaram massa em torno 100 g nos três lotes produzidos, variando de 98,13 a 126,4g; 112,6 a 126,7g; e 99,9 a 115,7g para os lotes 1, 2 e 3.

Tolentino (2013), ao avaliar queijo recoberto com gordura suína e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) desidratado, fabricou queijos com comprimento de 9,8 cm, altura média de 4,6 cm, sendo este de forma cilíndrica com peso entre 390 a 430 g.

Os valores da perda de peso em função do período de armazenamento durante 20 dias a temperatura de $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ estão expostos na tabela 13. Como podem ser observados, os

queijos apresentaram perdas de 3,86 a 7,64% quando avaliado com 10 dias e 13,15 a 25,62% durante os 20 dias de armazenamento.

Tabela 13: Perda de peso de queijo coalho durante o armazenamento a 4±1/C.

Tratamentos*	Perda de Peso (%)**	
	10 dias	20 dias
T1	6,50 ^a	15,44 ^{bc}
T2	7,64 ^a	22,88 ^{ab}
T3	5,49 ^a	25,62 ^a
T4	3,86 ^a	15,11 ^{bc}
T5	6,02 ^a	13,37 ^c
T6	2,52 ^a	20,95 ^{abc}
T7	5,10 ^a	15,13 ^{bc}
T8	4,01 ^a	13,15 ^c
T9	5,42 ^a	16,00 ^{bc}
CV (%)	26,73	11,80

* T1 (0G; 0OE); T2 (0G; 0,2OE); T3 (0G; 0,5OE); T4 (1G; 0OE); T5 (1G; 0,2OE); T6 (1G; 0,5OE); T7 (2G; 0OE); T8 (2G; 0,2OE); T9 (2G; 0,5OE); ** Letras minúsculas na mesma coluna não difere estatisticamente a nível de 5% de probabilidade. *** G: Galactomanana; OE: Óleo Essencial.

Segundo Cerqueira *et al.* (2009), revestimentos a base de galactomananas, devido a sua característica hidrofílica, apresentam boa barreira ao dióxido de carbono e ao oxigênio, porém, deficiente barreira ao vapor de água. O que pode ter comprometido a perda de peso dos queijos revestido com galactomanana. No entanto, os tratamentos com revestimento sem galactomananas (T2 e T3) obtiveram maiores perdas, enquanto os tratamentos com 1 e 2% de galactomananas, com exceção do T6, apresentaram menores perdas de peso durante os 20 dias de armazenamento, principalmente os tratamentos T5 e T8.

Martins *et al.* (2010), avaliando a vida útil de ricota com revestimento comestível utilizando galactomananas de *Gleditsia triacanthos* com incorporação de nisina, obtiveram perdas de 7,59% e 4,74% para os queijos tipo ricota sem e com revestimento após 28 dias de armazenamento. Fajardo *et al.* (2010), em seu estudo avaliando película a base de quitosana como veículo de natamicina visando melhorar a estabilidade de queijo saloio, a perda de peso apresentou-se em torno de 4%. Valores inferiores ao do presente estudo, o que pode ser explicado devido ao tamanho dos queijos, já que queijos pequenos tendem a perder massa.

Cerqueira *et al.* (2010), também observaram um decréscimo de 3,8% nas perdas de peso, quando avaliou queijo regional revestido com galactomananas armazenado a 4°C durante 21 dias. Os autores ressaltaram que houve perdas tanto nos queijos com e sem

revestimento e também quando avaliados em relação à temperatura de armazenamento, sendo estas de 4 e 20°C, no entanto, os queijos sem revestimentos apresentaram maiores perdas.

Este fato também foi observado no presente estudo, em que os tratamentos com revestimento a base de 1 e 2% de galactomanana apresentaram um decréscimo médio de 4,8% e 6,5% nas perdas de peso com 20 dias de armazenamento, respectivamente, sendo este resultado obtido pelas diferentes médias de T1, T2 e T3; T4, T5 e T6; e T7, T8 e T9. Além disso, observa-se que ao comparar os tratamentos sem revestimento a base de galactomananas, ou seja, os tratamentos T1, T2 e T3, os tratamentos apenas com óleo essencial não são eficientes no controle da perda de peso. No entanto, pode-se inferir que o óleo essencial interferiu positivamente no revestimento, em conjunto com a galactomanana, visto que ao comparar os revestimentos apenas com o teor de galactomananas, sendo estes, T1, T4 e T7, não se observaram diferença estatística após 20 dias de armazenamento. Portanto, a quantidade de galactomanana também não é um tratamento dose/dependente.

No presente estudo, ao comparar a perda de peso dos tratamentos constituído com 0,2% de óleo essencial, observa-se diferença estatística das amostras T5 e T8 quando comparado ao tratamento (T2) após 20 dias de armazenamento. No entanto aumentando a quantidade de óleo essencial para 0,5% não é observado redução na perda de peso, portanto, este não é um tratamento dose/dependente. Este fato foi observado também por Tolentino (2013), visto que obteve diferença de 26 g entre os queijos com e sem revestimento ao utilizar leite pasteurizado para a fabricação dos mesmos, sendo avaliados após 60 dias de maturação.

5.4.2 Resultados das análises microbiológicas dos queijos

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos com diferentes revestimentos comestíveis estão apresentados na tabela 14. Observa-se que a adição do óleo essencial de capim limão no revestimento de galactomananas aplicado ao queijo coalho resultou em uma diminuição do crescimento de microrganismos mesófilos aeróbios.

Quando se avalia a influência da galactomanana sobre o revestimento, observa-se que os revestimentos sem galactomananas atingiram a inibição de mesófilos com 10 dias de armazenamento, levando-se a considerar que o óleo essencial aplicado individualmente é o composto que possui o efeito antimicrobiano, funcionando como obstáculo a contaminação do queijo, contribuindo assim, com a conservação deste produto.

Tabela 14: Resultados das análises microbiológicas dos queijos coalho com diferentes revestimentos durante o armazenamento a 4±1/C.

Análises Tratamentos*	Dias	Mesófilos Aeróbios (UFC/g)	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (NMP/g)
T1	01	4,2 x 10 ⁴	52,0	50
	10	1,8 x 10 ⁴	25,0	25
	20	2 x 10 ²	1,5	1,5
T2	01	2,8 x 10 ⁴	< 3/g	< 3/g
	10	< 10/g	3,6	3,6
	20	< 10/g	1,5	1,5
T3	01	3,8 x 10 ⁴	< 3/g	< 3/g
	10	< 10/g	7,6	7,6
	20	< 10/g	< 3/g	< 3/g
T4	01	2,6 x 10 ⁴	18	14,3
	10	7,0 x 10 ⁴	9,3	9,3
	20	4,0 x 10 ⁴	1,5	1,5
T5	01	1,5 x 10 ⁴	10,5	7
	10	2,0 x 10 ⁴	1,3	1,3
	20	< 10/g	1,5	1,5
T6	01	2,0 x 10 ⁴	7,3	2,3
	10	1,1 x 10 ⁴	3,6	3,6
	20	8 x 10 ³	5,5	5,5
T7	01	5,6 x 10 ⁴	13,5	2
	10	2,3 x 10 ⁵	15	15
	20	< 10/g	32	32
T8	01	5,4 x 10 ⁴	10	6,6
	10	1,0 x 10 ⁴	9,3	9,3
	20	< 10/g	10,6	2,3
T9	01	6 x 10 ³	5,6	2,5
	10	2 x 10 ³	5,5	5,5
	20	< 10/g	2	2

* G:

Galactomanana; OE: Óleo Essencial.** T1 (0G; 0OE); T2 (0G; 0,2OE); T3 (0G; 0,5OE); T4 (1G; 0OE); T5 (1G;0,2OE); T6 (1G; 0,5OE); T7 (2G; 0OE); T8 (2G; 0,2OE);T9 (2G; 0,5OE);

Vale ressaltar também, que esta redução também foi observada para os resultados de coliformes totais, com exceção do T8, que se mantém estável até os 20 dias de armazenamento, tal fato pode ser decorrente do maior teor de galactomanana, visto que pode ser utilizado como nutriente para os microrganismos. Tal fato não ocorreu com o tratamento T9, em virtude do teor do maior óleo essencial (0,5%). A eficiência do óleo essencial, como agente antibacteriano, é fato comprovado largamente na literatura (CARMO, LIMA e SOUZA, 2008; NGUEFACK et al., 2012; OKOH et al., 2010; SILVA et al., 2009), como pode ser observado no capítulo 1.

Com relação aos tratamentos T5 e T6, cujo teor de galactomananas é de 1%, variando o teor de óleo essencial, o T5, cujo valor de óleo essencial utilizado foi de 0,2%, foi o que apresentou melhor resultado, visto que inibiu o crescimento destes microrganismos com 20 dias de armazenamento. Ao avaliar os tratamentos com 2% de galactomananas, todos os tratamentos, incluindo o T7, em que não foi aplicado óleo essencial, obtiveram redução nas contagens. Podendo-se inferir que, para a contagem de mesófilos, a galactomanana utilizada com percentual de 2% pode ter influenciado no efeito de redução microbiana. Porém, ao avaliar todos os tratamentos constituídos de óleo essencial e galactomanana, os tratamentos T5 e T9 foram os que apresentaram as menores contagens gerais. Em contrapartida, ao observar os dados de coliformes, o T5 apresentou maiores reduções.

As contagens de aeróbios mesófilos informam as condições higiênicas vigentes ao longo do processamento e armazenamento, sendo que altas contagens de bactérias mesófilas podem indicar a ocorrência de condições potenciais para o desenvolvimento de patógenos (PINTO, 2001). Salimena et al. (2010) avaliando a inserção de óleo essencial *Syzygium aromaticum* em queijo minas frescal, obteve contagens de aeróbios mesófilos de 2,79 a 3,71 Log UFC.g⁻¹, ressaltando Franco e Landgraf (1996), que contagens superiores a 10⁶ UFC.g⁻¹ de aeróbios mesófilos, podem começar a aparecer, na maioria dos alimentos, alterações detectáveis, podendo ser considerados suspeitos, pois aumentam a possibilidade de estarem presentes microrganismos deteriorantes e patogênicos.

Trajano et al. (2010) ao analisarem o efeito inibitório do óleo essencial das folhas de *Eugenia caryophyllata* sobre microrganismos contaminantes de queijo coalho, observaram que nas concentrações de 2,5-20 µg/g causou uma diminuição na taxa de crescimento de bactérias mesófilas em comparação ao observado para o ensaio de controle durante os 15 dias de armazenamento. Isso também pode ser observado nos resultados deste trabalho, sendo que no T5, com 0,2% de óleo e 1% de galactomanana, ocorreu uma redução na concentração de mesófilos com o decorrer de 20 dias de armazenamento.

Os resultados encontrados para *S. aureus*, apresentaram-se ausentes (<10 UFC/g) durante os 20 dias de armazenamento para todos os tratamentos. Mendonça (2004) que, avaliou a ação inibitória dos óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano e manjerição em ricotas cremosas inoculadas com *S. aureus*, analisou os óleos essenciais nas concentrações de 1%, 5% e 10% respectivamente, comprovou que os óleos essenciais apresentam inibição bacteriana de *S. aureus* em matrizes alimentares. Isso também pode ser constatado nos resultados deste trabalho ao utilizar concentrações menores (0,2 e 0,5%) de óleo essencial de capim limão com objetivo de inibir contaminações pós-processamento.

Não foi observado também a presença de *Salmonella* sp. Segundo Dantas (2012), a *Salmonella* sp. apresenta a maioria dos sorotipos patogênicos ao homem, e por este motivo é considerada uma das principais zoonoses de interesse para a saúde pública, devido a sua alta endemicidade e morbidade, constituindo-se responsável por graves intoxicações alimentares.

Em relação aos resultados para inibição das bactérias da microflora contaminante, do grupo coliformes totais e termotolerantes, de um modo geral, todos os tratamentos encontraram-se em conformidade com os limites estabelecidos pela RDC nº12 (BRASIL, 2001), visto que apresentaram valores inferiores a $5,0 \times 10^2$. No entanto, o revestimento tem o objetivo de ser utilizado como veículos para a incorporação de conservante natural para reduzir o risco de pós-contaminação conforme descrito por Cerqueira et al. (2009) que ressalta revestimentos a base de galactomananas com esta função.

Para Salimena et al. (2010) que, aplicaram óleos essenciais de *Syzygium aromaticum* (Cravo-da-Índia) em queijo minas frescal como conservante natural, nas concentrações 0,78, 1,56 e 3,12%, obtiveram resultados que variaram de < 0,48 a 1,36 Log NMP/g para coliformes a 45°C e 4,97 a 5,30 Log UFC/g para *S. aureus*.

Okura (2010) avaliou a eficiência das especiarias orégano e salsinha sobre os microrganismos coliformes a 35°C e a 45°C presentes no queijo e observou que nas concentrações de 1% de orégano e salsinha ocorreu uma diminuição nos coliformes a 45°C, sendo que essa diminuição ocorreu principalmente no óleo de orégano. No presente trabalho foi observada uma diminuição de coliformes a 45°C, porém em concentrações mais baixas.

A qualidade microbiológica do queijo foi atestada mediante a aplicação de técnicas de conservação combinadas, visto que a incorporação do óleo essencial, antimicrobiano natural, teve influencia positiva na vida útil do queijo coalho, sendo este armazenado sob refrigeração. Conforme Machado et al. (2011), o estudo de tecnologias alternativas na produção de queijo sem alterar suas características funcionais se torna importante para o atendimento das exigências legais de qualidade e saúde pública.

Estas novas tecnologias, juntamente com rígidos padrões de higiene utilizando-se as boas práticas de fabricação, são fundamentais, visto que são vários os estudos que abordam a contaminação de queijo coalho, tanto para os microrganismos do grupo dos coliformes, como para *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (FILHO et al., 2009; SALOTI, 2006; SANTANA et al., 2008; ALVES et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010).

5.4.3 Resultados das análises físico-químicas dos queijos

Os resultados das análises físico-química de umidade, atividade de água e pH dos queijos encontram-se nas tabelas 15, 16, e 17. Como pode ser observado na tabela 15, não houve diferença estatística para umidade durante 20 dias de armazenamento.

Conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo Coalho (BRASIL, 2001), os requisitos físico-químicos correspondem às características de composição e qualidade dos queijos de média a alta umidade, conforme estabelecido pela Portaria 146/96 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), que estabelece a classificação dos queijos coalho em de alta umidade, sendo esta entre 46,0 a 54,9% e média umidade, com teor entre 36,0 e 45,9%. Portanto, a maioria dos tratamentos, com percentual entre 42,70 a 50,29% em estudo encontra-se classificada em queijos de alta umidade, os quais são conhecidos como de massa branda ou macios.

Tolentino (2013), ao adicionar cobertura nos queijos elaborados com gordura suína e alecrim, observou que os mesmos promoveram uma barreira contra a perda de umidade e o queijo produzido com leite pasteurizado, após 20 dias de maturação, com umidade de 40,48%, permaneceu estável ao longo de 60 dias, indicando que o recobrimento auxiliou na retenção da umidade, fazendo com que o queijo não formasse casca e não perdesse a coloração do branco para amarelado.

TABELA 15: Evolução dos parâmetros de umidade de queijo coalho com durante o seu armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ até 20 dias

TRATAMENTOS*	01 DIA	10 DIAS	20 DIAS	CV (%)
T1	49,96 ^{Aa}	46,74 ^{Aa}	49,09 ^{Aa}	6,19
T2	49,09 ^{ABa}	47,34 ^{Aa}	44,77 ^{ABa}	4,20
T3	50,14 ^{Aa}	46,36 ^{Aa}	46,19 ^{ABa}	4,22
T4	50,29 ^{Aa}	47,60 ^{Aa}	48,14 ^{ABa}	5,42
T5	47,71 ^{ABa}	46,26 ^{Aa}	47,58 ^{ABa}	3,22
T6	46,09 ^{ABa}	45,83 ^{Aa}	44,27 ^{ABa}	2,35
T7	48,24 ^{ABa}	47,71 ^{Aa}	43,81 ^{ABa}	4,97
T8	49,50 ^{ABa}	45,27 ^{Aa}	46,28 ^{ABa}	4,95
T9	45,33 ^{Ba}	45,63 ^{Aa}	42,70 ^{Ba}	5,09
CV (%)	3,17	6,09	3,72	

*F de interação entre o tratamento e tempo não foi significativo (CV: 4,14%); **Para cada coluna, letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os tratamentos com seus respectivos coeficientes de variação; Para cada linha, letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos; *** T1 (0G; 0OE); T2 (0G; 0,2OE); T3 (0G; 0,5OE); T4 (1G; 0OE); T5 (1G; 0,2OE); T6 (1G; 0,5OE); T7 (2G; 0OE); T8 (2G; 0,2OE); T9 (2G; 0,5OE); **** G: Galactomanana; OE: Óleo Essencial.

Diferente de Tolentino (2013), em que adicionou um revestimento a base de lipídios, no presente estudo foi avaliado revestimentos de polissacarídeos, que segundo Vargas et al. (2009) e Park, Chinnan e Shewfelt (1995) citado por Pinheiro et al. (2010), as propriedades hidrofílicas dos filmes de polissacarídeos são responsáveis pela sua elevada permeabilidade ao vapor de água, caracterizando-se como desvantagem, tendo em vista o controle da transferência de vapor de água. Nesta pesquisa observa-se que os tratamentos apresentaram uma tendência em relação a teores mais elevados do que os tratamentos sem revestimentos a base de galactomananas, sendo que o T1 (0% de galactomananas) apresentou diferença estatística do T9 (2% de galactomananas) no tempo 1 e 20 dias.

Observa-se também, que embora a adição do óleo essencial em relação ao T3 (0,5% de óleo essencial) tenha apresentado diferença do T9 (0,5% de óleo essencial) com 1 dia de produção do queijo, com 20 dias de armazenamento os mesmos não diferiram, ou seja, o óleo essencial parece não ter interferido no teor de umidade dos queijos. Lipídios têm sido adicionados aos filmes de polissacarídeos com objetivo de diminuir a permeabilidade ao vapor de água (Pinheiro et al., 2010). A literatura aborda diversos estudos a respeito do efeito antimicrobiano do óleo essencial de *C. citratus* (DC) Stapf. No entanto, Cerqueira *et al.* (2011) afirmam que a incorporação de compostos aos filmes ou revestimentos comestíveis, utilizando galactomananas como veículo são muito escassos, e devem ser observados a interação do mesmo na funcionalidade da película.

Os resultados médios da atividade de água dos queijos avaliados durante o armazenamento refrigerado até 20 dias encontram-se descritos na tabela 16. A análise de variância realizada para os valores de atividade de água dos queijos nos tratamentos estudados demonstrou que não houve interação entre tratamento e tempo. Porém, os efeitos principais em relação ao tempo foram significativos a nível de 5% de probabilidade.

A atividade de água variou entre 0,926 e 0,941; 0,926 a 0,950; e 0,918 a 0,934 em relação aos tratamentos durante 1, 10 e 20 dias de armazenamento. Olivato, Mali e Grossmann (2006), ao avaliar o efeito de embalagem biodegradável de amido no armazenamento de queijo prato processado, observaram que as amostras embaladas com amido de inhame e a amostra controle apresentaram redução da atividade de água em torno de 0,950 para 0,750 durante 20 dias de armazenamento. Porém, os queijos embalados com filme plástico de polipropileno (convencional) mostrou-se estável ao longo de 30 dias de armazenamento, mantendo-se em torno de 0,950.

TABELA 16: Evolução da atividade de água de queijo coalho com durante o seu armazenamento a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ até 20 dias.

TRATAMENTOS	01 DIA	10 DIAS	20 DIAS	CV (%)
T1	0,933 ^a	0,931 ^a	0,922 ^a	1,23
T2	0,932 ^a	0,938 ^a	0,931 ^a	1,34
T3	0,930 ^a	0,950 ^a	0,929 ^a	1,01
T4	0,933 ^{ab}	0,943 ^a	0,922 ^b	0,75
T5	0,941 ^a	0,941 ^a	0,934 ^a	0,54
T6	0,926 ^a	0,929 ^a	0,920 ^a	0,61
T7	0,929 ^a	0,927 ^a	0,928 ^a	0,97
T8	0,935 ^a	0,933 ^a	0,926 ^a	1,40
T9	0,941 ^a	0,926 ^a	0,918 ^a	0,92

*Variação tratamento não significativo a nível de 5% de probabilidade e F de interação entre o tratamento e tempo não foi significativo (Coeficiente de variação: 1,02%); ** Para cada coluna, letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os tratamentos; Para cada linha, letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) obtidas entre os diferentes períodos de armazenamento; *** T1 (0G; 0OE); T2 (0G; 0,2OE); T3 (0G; 0,5OE); T4 (1G; 0OE); T5 (1G; 0,2OE); T6 (1G; 0,5OE); T7 (2G; 0OE); T8 (2G; 0,2OE); T9 (2G; 0,5OE); **** G: Galactomanana; OE: Óleo Essencial.

Santos *et al.* (2011), ao realizar a caracterização físico-química de queijo coalho elaborado com diferentes concentrações de leite de cabra e leite de vaca, sendo que uma das proporções utilizadas não continha leite de cabra, e esta apresentou atividade de água de 0,980. Vale salientar que no estudo dos referidos autores não houve diferença estatística entre as diferentes amostras de queijo elaborado com a mistura leite de cabra e bovino, bem como para o queijo elaborado somente com leite de cabra. A atividade de água do presente estudo encontra-se inferior ao da pesquisa citada, ressaltando-se que a atividade de água representa a água disponível ao crescimento microbiano (SOUSA *et al.* 2014).

A tabela 17 apresenta os valores do pH para os nove tratamentos avaliados ao longo de 20 dias de armazenamento. A interação entre o tempo e tratamento, bem como a avaliação do tempo, não apresentaram valor F significativo. Em relação aos tratamentos, não houve diferença a nível de 5% de probabilidade. Os valores de pH variaram entre 6,17 a 6,40; 6,11 a 6,46; e 6,06 a 6,39 para os tratamentos durante 1, 10 e 20 dias, respectivamente.

Valores próximos foram encontrados por Alves *et al.* (2010), que avaliaram a composição físico-química de queijo coalho revestido com galactomananas de *C. pulcherrima*, encontraram pH variando de 6,10 a 6,28 identificando que suas amostras mantiveram valores muito aproximados, concluindo que o revestimento a base de galactomananas não interferiu em suas análises de pH. Machado *et al.* (2011), ao avaliarem os aspectos físico-químico de queijo coalho fabricado com o uso de ácido láctico, assim como no

presente estudo, obtiveram declínio dos valores de pH ao longo de 60 dias de armazenamento, sendo que com 20 dias apresentou valores em torno de 6,1.

TABELA 17: Evolução do pH de queijo coalho com durante o seu armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ até 20 dias.

TRATAMENTOS	01 DIA	10 DIAS	20 DIAS
T1	6,37 ^A	6,46 ^A	6,39 ^A
T2	6,35 ^A	6,22 ^A	6,26 ^A
T3	6,24 ^A	6,13 ^A	6,06 ^A
T4	6,40 ^A	6,42 ^A	6,43 ^A
T5	6,18 ^A	6,11 ^A	6,11 ^A
T6	6,17 ^A	6,38 ^A	6,18 ^A
T7	6,39 ^A	6,35 ^A	6,27 ^A
T8	6,27 ^A	6,39 ^A	6,10 ^A
T9	6,22 ^A	6,34 ^A	6,25 ^A
CV (%)	1,82	2,21	3,35

*Variação tempo e interação entre o tratamento e tempo apresenta F não significativo (Coeficiente de variação: 2,54%); **Para cada coluna, letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferenças significativas ($p<0,05$) obtidas entre os tratamentos; *** T1 (0G; 0OE); T2 (0G; 0,2OE); T3 (0G; 0,5OE); T4 (1G; 0OE); T5 (1G; 0,2OE); T6 (1G; 0,5OE); T7 (2G; 0OE); T8 (2G; 0,2OE); T9 (2G; 0,5OE); **** G: Galactomanana; OE: Óleo Essencial.

Martins et al. (2010), avaliando a vida útil de ricota com revestimento comestível utilizando galactomananas de *Gleditsia triacanthos* com incorporação de nisina, obtiveram pH estáveis ao longo do armazenamento de 28 dias, variando de 5,60 a 6,47, sendo que não apresentaram diferença estatística. No presente estudo, a inserção do óleo essencial ao revestimento também não interferiu nos valores de pH. Sousa et al. (2014) avaliaram a composição físico-química de queijos comercializados no Nordeste, sendo que no Ceará, os queijos apresentaram valores de 6,02 a 6,21.

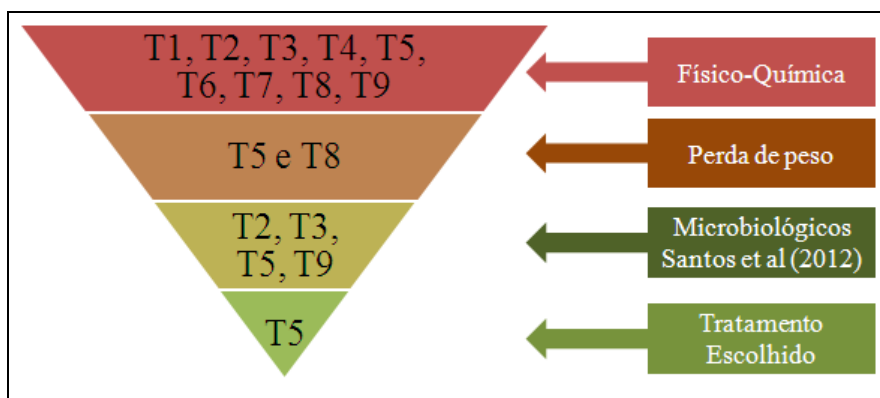
5.5 Caracterização da estabilidade do queijo coalho com revestimento comestível constituído de 1% de galactomanana e 0,2% de óleo essencial

A primeira etapa do estudo foi constituída por nove tratamentos. Dentre estes, foi escolhido o T5, com 1% de galactomanana e 0,2% de óleo essencial como pode ser observado na figura 28. A análise da perda de massa demonstrou bons resultados para os tratamentos em que o revestimento foi composto de galactomanana e óleo essencial.

Em relação aos quesitos microbiológicos, os tratamentos que apresentaram melhores resultados foram os queijos com revestimento sem galactomanana e constituído

apenas de óleo essencial (T2 e T3) e os constituídos de galactomananas e óleo essencial (T5 e T9). Entre os tratamentos, T5 com 0,2% de óleo e T9 com 0,5% de óleo essencial, observa-se na literatura, através da pesquisa de Santos et al. (2012) que a concentração de 0,5% de óleo essencial de *Cymbopogon citratus* aplicado em queijo coalho interfere nos escores médios do sabor deste produto, na avaliação sensorial quando realizado o teste de aceitação.

Figura 28: Esquema de escolha da melhor formulação com base nas análises aplicadas às amostras de queijo coalho.



A maioria dos tratamentos não apresentou diferença quanto aos parâmetros físico-químicos. Dessa forma, o T5 foi escolhido por apresentar bons resultados quando avaliados até os 20 dias de armazenamento em todas as avaliações realizadas e por apresentarem os menores teores efetivos, sendo, portanto, submetido às análises físico-química, microbiológicas, sensorial, capacidade de derretimento e perfil de textura instrumental ao longo de 30 dias de armazenamento.

5.5.1 Composição físico-química

Os resultados da composição físico-química dos queijos com revestimento (T5) e do queijo controle (T1) encontram-se na tabela 18.

Conforme pode ser observado, os parâmetros de umidade, acidez, proteínas e cinzas apresentaram diferença estatística quando avaliado ao longo de 30 dias de armazenamento. Em relação aos outros parâmetros, constata-se que a aplicação do revestimento comestível não apresentou alteração na composição centesimal do queijo coalho.

O teor de umidade apresentou diferença ao longo de 30 dias de armazenamento, diferentemente da avaliação com 20 dias (Tabela 15), em que não tinham apresentado diferença estatística. Observa-se que a umidade de ambos os tratamentos sofreram declínio

com 30 dias. Percentuais de umidade inferiores foram obtidos por Gadêlha (2009), que também analisou queijo de coalho com revestimento de galactomanana de *C. pulcherrima* nos tempos de 1, 7 e 14 dias de armazenamento, onde os queijos revestidos apresentaram valores de umidade variando de 24,08 a 47,06 e os sem revestimentos de 28,72 a 47,6%; por Ferreira e Filho (2008), que avaliaram a qualidade físico-química do queijo de coalho comercializado no município de Barreiros-PE, cujo valor máximo de umidade foi de 40,62%.

Resultados semelhantes foram obtidos por Fajardo et al. (2010), avaliando película a base de quitosana como veículo de natamicina aplicado em queijo saloio, obtiveram umidade de 51,05% com 0 dia e 47,57% aos 27 dias.

Tabela 18: Composição físico-química do queijo coalho (T1-controle) e (T5-revestido) durante o seu armazenamento a 4±1/C durante 30 dias.

Análises	Tratamento	Estabilidade (Dias)		
		07	15	30
Umidade (%)	T1	49,68 ^{Aa}	48,19 ^{Aa}	45,59 ^{Ab}
	T5	50,21 ^{Aa}	49,88 ^{Aa}	44,90 ^{Ab}
Atividade de Água	T1	0,927 ^{Aa}	0,926 ^{Aa}	0,929 ^{Aa}
	T5	0,915 ^{Aa}	0,934 ^{Aa}	0,924 ^{Aa}
pH	T1	6,70 ^{Aa}	5,75 ^{Aa}	5,52 ^{Aa}
	T5	6,66 ^{Aa}	5,63 ^{Aa}	5,34 ^{Aa}
Acidez (g/100g ácido láctico)	T1	0,16 ^{Ac}	0,31 ^{Ab}	0,37 ^{Aa}
	T5	0,18 ^{Ab}	0,32 ^{Aa}	0,32 ^{Ba}
Proteína (%)	T1	21,17 ^{Ba}	21,60 ^{Aa}	17,75 ^{Bb}
	T5	22,44 ^{Aa}	20,91 ^{Ab}	19,69 ^{Ab}
Gordura (%)	T1	24,66 ^{Aa}	26,02 ^{Aa}	23,98 ^{Aa}
	T5	23,49 ^{Aa}	28,24 ^{Aa}	24,03 ^{Aa}
Cinzas (%)	T1	4,55 ^{Aa}	3,67 ^{Ab}	3,42 ^{Ab}
	T5	4,56 ^{Aa}	3,24 ^{Bb}	3,51 ^{Ab}
Sódio (mg/100g)	T1	214,59 ^{Bb}	310,90 ^{Aa}	297,55 ^{Aab}
	T5	311,17 ^{Aa}	318,33 ^{Aa}	372,74 ^{Aa}
Cálcio (mg/100g)	T1	459,74 ^{Aa}	417,10 ^{Aa}	400,14 ^{Aa}
	T5	311,69 ^{Aa}	406,03 ^{Aa}	402,42 ^{Aa}
EST (%)	T1	50,31 ^{Aa}	51,80 ^{Aa}	54,40 ^{Ab}
	T5	49,78 ^{Aa}	50,11 ^{Aa}	55,09 ^{Ab}
GES (%)	T1	41,74 ^{Aa}	45,39 ^{Aa}	48,07 ^{Aa}
	T5	56,74 ^{Aa}	47,88 ^{Aa}	43,61 ^{Aa}

* As médias seguidas de uma mesma letra minúscula na mesma coluna não diferem quanto ao tratamento e a mesma letra maiúscula na mesma linha não diferem quanto ao tempo a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; T1: Tratamento controle; e T5: Tratamento com revestimento comestível. **EST: Extrato Seco Total; GES: Gordura no Extrato Seco. **** G: Galactomanana; OE: Óleo Essencial.

A atividade de água e o pH não diferiram quanto ao tratamento e ao tempo. Sendo que a atividade de água apresentou uma tendência de se manter estável durante os 30 dias de

armazenamento sob refrigeração. No entanto, os valores de pH demonstraram uma leve redução ao longo dos 30 dias. Valores próximos foram encontrados por Filho et al. (2012) que obtiveram variação de 5,2 a 6,5, ao avaliarem os parâmetros físico-químicos do queijo de coalho artesanal produzido em Calçado-PE. Por Santos et al. (2011), que obtiveram valor médio de 5,61. Fajardo et al. (2010), avaliando película a base de quitosana como veículo de natamicina aplicado em queijo saloio, obtiveram variação média para pH de 4,75 a 5,16.

A acidez dos queijos aumentou ao longo dos dias, sendo que o queijo com revestimento apresentou-se estável após 15 dias de armazenamento. Efeito semelhante foi observado por Cavalcante et al. (2007), que obtiveram acidez de 0,74; 0,75 e 0,76% durante 10, 20 e 30 dias de armazenamento de queijo coalho fabricado com cultura lática. Acidez semelhante ao da presente pesquisa foi obtida por Tolentino (2013) ao adicionar revestimento a base de gordura e alecrim ao queijo elaborado com leite pasteurizado, cujos valores foram de 0,27 e 0,40% com 1 e 20 dias. Segundo o mesmo, citando Mcsweeney e Fox (2004), os queijos de massa lavada ou semicozida, apresentam teores de lactose residual baixo, o que pode resultar em um menor teor de ácido láctico.

Em relação ao teor de proteínas, ambos os tratamentos apresentaram decréscimos ao longo dos 30 dias de armazenamento, sendo que o T5 variou de 22,44 a 19,69%, com revestimento, apresentaram maiores valores do que o T1, com variação de 21,17 a 17,75%. Valores próximos foram encontrados por Filho *et al.* (2012) e Nassu *et al.* (2003), em que encontraram médias em suas determinações em queijo coalho de 24,15% e 24,87%, respectivamente. Nas análises de Gadêlha (2009) a porcentagem de proteína variou de 19,50 a 37,21% nos queijos revestidos e de 21,43 a 37,27% nos queijos não revestidos, sendo que o teor de proteína apresentou pequeno decréscimo a partir do 14º dia. Diferentemente desta pesquisa, Cavalcante *et al.* (2007), avaliando o processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura lática endógena, obtiveram teores de 23,12; 27,70 e 26,37% com 10; 20; e 30 dias de armazenamento, respectivamente.

A gordura, embora não tenha apresentado diferença estatística ao longo do tempo e também em relação aos tratamentos, observa-se que o percentual de gordura aumenta com 10 dias e, posteriormente, apresenta um declínio aos 30 dias de armazenamento. Valores mostram-se próximos aos encontrados por Filho et al. (2009), os quais avaliaram sete amostras de queijo de coalho produzido artesanalmente em Jucati (PE) com teores variando entre 18,99 a 31,88% de gordura. Valores superiores foram encontrados por Cavalcante et al. (2007), cujos resultados foram de 28,00; 34,00 e 34,00% com 10; 20; e 30 dias de armazenamento, respectivamente.

Os tratamentos (T1 e T5) não apresentaram diferença entre si, sendo que em relação ao tempo, o T5 diferiu com 15 dias de armazenamento, onde foi observado um menor teor de cinzas. Cavalcante et al. (2007) obtiveram teores de 4,33; 3,99; e 4,16% nos tempos de 10, 20 e 30 dias, respectivamente. Matos (2009), que realizou análises físico-químicas de queijo de coalho revestidos com solução de galactomananas de sementes de *Adenanthera pavonina*, encontrou uma média de 5,5%. Teores próximos aos encontrados no presente trabalho também foi obtido por Alves et al. (2010), onde nos queijos revestidos com galactomananas de *C. pulcherrima*, o valor para as cinzas foi de 3,31 a 4,72% e nos queijos controle variou de 3,67 a 4,72%.

A partir das cinzas presentes nos queijos, foi determinado o teor de sódio, em que T1 apresentou-se diferiu de T5 com 7 dias de fabricação, sendo que o T5 manteve-se estável ao longo dos 30 dias de armazenamento e T1 aumentou com 15 dias de armazenamento. De maneira geral, todos os tratamentos apresentaram teores inferiores ao estipulado na tabela de composição de alimentos, quando comparado ao queijo pasteurizado, cujo teor é de 780 mg/100g. Em relação ao teor de cálcio, não houve diferença estatística entre os tratamentos. De maneira geral, o teor de cálcio variou de 311,69 a 459,74 mg/100g. Valores semelhantes foram obtidos por Todescatto et al. (2013), ao desenvolver e caracterizar queijo análogo ao boursin, cujo teor foi de 460 mg/100g. Valores superiores foram obtidos por Ferro et al. (2010), ao determinar minerais em 22 amostras de queijos de coalho oriundos de 11 produtores do Vale do Jaguaribe, CE, visando uma indicação geográfica, cuja variação nos valores de cálcio foi de 781,19 a 1445,87 mg/100g.

O extrato seco total apresentou diferença estatística com 30 dias de armazenamento, estando este parâmetro relacionado ao teor de umidade, o qual diminuiu estatisticamente aos 30 dias. Os valores variaram para o T1 de 50,31 a 54,40% e para o T5 de 49,78 a 55,09%. Santos et al. (2011) encontraram valor médio de 50,93% para queijo coalho.

Quanto a gordura no extrato seco, os tratamentos não diferiram ao longo do tempo. A maioria dos tratamento apresentaram percentual acima de 45%. Portanto, conforme a Portaria 146/96 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), classifica-se como queijo gordo, cujo percentual varia de 45,0 a 59,9%. Valores semelhantes foram obtidos por Cavalcante et al. (2007), cujos valores foram 48,75; 55,63; e 54,63% para 10, 20 e 30 dias de armazenamento. E por Santos *et al.* (2011), cujo valor foi de 47,63% para sua formulação com utilizando apenas leite bovino.

5.5.2 Capacidade de derretimento

Os resultados médios em relação a capacidade de derretimento estão descritos na tabela 19. A interação tempo e tratamento, bem como as variáveis independentes, tempo e tratamento não apresentaram F significativo.

Tabela 19: Derretimento ao longo de 30 dias sob armazenamento refrigerado a $(4\pm1/^{\circ}\text{C})$

Derretimento (%)	Tratamento	Estabilidade (Dias)		
		7	15	30
	T1	2,71	6,65	1,95
	T5	5,43	5,21	3,43

*Não foi aplicado o teste de comparação de médias porque o F de interação não foi significativo (CV: 34,80%).

Segundo Santos et al. (2011), o derretimento do queijo coalho pode ser explicado pelo baixo valor de pH e alto teor de umidade, que de acordo com Munck (2004), pH inferior a 5,7, o queijo coalho derrete e se deforma na presença de calor.

Tal fato pode explicar os maiores percentuais durante os 7 e 15 dias de armazenamento, em que a umidade apresentou maiores valores, que foram de 49,68 e 50,21% e 48,19 e 49,88, respectivamente (Tabela 18). Além disso, aos 15 dias, o baixo pH o alto teor de umidade podem ter ocasionado os maiores percentuais de derretimento. Aos 30 dias, embora não tenha apresentado diferença estatística, os percentuais reduziram com o tempo, o que pode está relacionado com o seu menor teor de umidade.

Valores parecidos foram encontrados por Santos et al. (2011), ao elaborar queijo coalho fabricado com leite bovino e leite de cabra, na proporção 1:1, o qual demonstrou percentual de derretimento de 5,88%.

Machado et al. (2011) ressaltam que o derretimento é um importante parâmetro de estudo do queijo coalho, pois uma das características deste tipo de queijo é a capacidade de ser submetido ao calor sem sofrer alteração da sua forma original. Tais autores ao avaliarem a adição de ácido láctico ao queijo coalho observaram que não houve diferença entre os tratamentos estudados, no entanto, a porcentagem de derretimento aumentou ao longo do tempo, sendo estes avaliados até 90 dias, sendo que aos 15 e 30 dias de armazenamento, o percentual de derretimento encontrado foi em torno de 2% e de 4 a 6%, respectivamente.

Portanto, o revestimento, a base de galactomanana e óleo essencial não apresentou interferência na capacidade de derretimento do queijo coalho, sendo que o não derretimento do queijo coalho é um resultado positivo, visto que esta é uma característica apreciada pelos

consumidores, pois segundo Andrade (2006), uma das formas mais utilizadas para o consumo de queijo coalho é assado, mantendo-se compacto e não derretido.

5.5.3 Perfil de textura instrumental

Os resultados da análise instrumental de textura das amostras de queijo sem revestimento (T1) e com revestimento a base de galactomanana e óleo essencial (T5), avaliados com 7, 15 e 30 dias de armazenamento, estão na tabela 20.

Tabela 20: Perfil de textura de queijo coalho durante o armazenamento a $4\pm 1^\circ\text{C}$ até 30 dias.

Análises	Tratamento	Estabilidade (Dias)		
		07	15	30
Dureza (N)	T1	65,73 ^{Aa}	51,99 ^{Ab}	28,36 ^{Ac}
	T5	69,26 ^{Aa}	53,30 ^{Ab}	27,51 ^{Ac}
Adesividade (g.s)	T1	- 9,05 ^{Aa}	- 28,03 ^{Aa}	- 18,48 ^{Aa}
	T5	- 10,16 ^{Aa}	- 10,94 ^{Aa}	- 18,58 ^{Aa}
Elasticidade*	T1	0,87 ^{Aa}	0,86 ^{Aa}	0,87 ^{Aa}
	T5	0,84 ^{Aa}	0,86 ^{Aa}	0,87 ^{Aa}
Coesividade*	T1	0,47 ^{Aa}	0,49 ^{Aa}	0,39 ^{Ab}
	T5	0,44 ^{Aa}	0,39 ^{Ba}	0,38 ^{Aa}
Gomosidade (N)	T1	33,54 ^{Aa}	27,75 ^{Aa}	11,26 ^{Ab}
	T5	34,37 ^{Aa}	23,13 ^{Ab}	9,69 ^{Ac}
Mastigabilidade (N)	T1	29,28 ^{Aa}	23,94 ^{Aa}	10,05 ^{Aa}
	T5	34,37 ^{Aa}	23,14 ^{Ab}	09,69 ^{Ac}
Resiliência*	T1	0,24 ^{Aa}	0,24 ^{Aa}	0,17 ^{Ab}
	T5	0,22 ^{Aa}	0,20 ^{Ba}	0,17 ^{Ab}

*Parâmetros adimensionais; ** As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem quanto ao tratamento; e a mesma letra minúscula na mesma linha não diferem quanto ao tempo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; T1: 0%G;0%OE; e T5: 1%G,0,2%.

Os valores médios de dureza, coesividade, gosmosidade e resiliência apresentaram diferença em relação ao tempo de armazenamento, porém não apresentaram diferenças em relação ao tratamento. Enquanto adesividade, elasticidade e mastigabilidade não apresentaram diferença entre os tratamentos e os tempos avaliados.

A dureza do queijo fornece a idéia da firmeza do alimento, sendo uma propriedade sensorial definida como a força necessária para comprimir o alimento entre os dentes molares, e instrumentalmente, como a força requerida para causar uma determinada deformação (SILVA, 2013). No presente estudo, a dureza não apresentou diferença estatística quando comparado entre os tratamentos com e sem revestimento comestível nos tempos

avaliados de 7, 15 e 30 dias. Todavia, ambos os tratamentos diferiram entre os tempos avaliados, os valores referentes à dureza diminuíram com decorrer do tempo, cuja variação foi de 28,36 a 65,73 N para o queijo controle e de 27,51 a 69,26 N. Tais resultados corroboram aos encontrados por Andrade (2006), ao avaliar a textura instrumental de queijo coalho produzido de forma industrial e artesanal comercializado no estado Ceará, em que obteve variação de 20,27 a 58,86 N para os queijos produzidos de forma industrializada e de 25,80 a 34,81 N para os queijos produzidos de forma artesanal.

Tolentino (2013) avaliou queijos produzidos com leite pasteurizado coberto com lipídio e alecrim, encontrou valores de dureza (g) variando de 1472,21 a 854,72 ao longo de 60 dias de maturação. Silva (2013), em que obteve variação de 94,77 a 117,68 N para queijo tradicional e 59,53 a 71,05 para os queijos adicionados de tomate, durante 28 dias de armazenamento, sendo ocasionada pela perda de água.

A adesividade não apresentou diferença estatística entre tratamentos e tempo de armazenamento, apresentando variação de -9,05 a -28,03 g.s para T1 e -10,16 a -18,58 g.s. para T5. Tunick (2000) define adesividade como o trabalho necessário para superar a força de atração entre o queijo e a superfície do probe. Na pesquisa de Tolentino (2013) os queijos maturados cobertos com gordura suína e alecrim apresentaram adesividade maiores do que na amostra controle, cujos valores foram de -4,73 a -27,52. Silva (2013) nas suas análises de textura descartou o parâmetro adesividade, visto que o corpo de prova raramente adere-se a ao prato de compressão, resultando em valores inconsistentes e com alta variabilidade não sendo possível mensurá-lo. Neste estudo o coeficiente de variação foi de 116,36%.

A elasticidade, segundo Bertolino et al. (2011), é definida como a medida da distância recuperada pelo queijo após uma deformação no período de tempo até que ocorra a segunda deformação. No presente estudo, este parâmetro manteve-se estável ao longo dos 30 dias de armazenamento, os quais variaram de 0,86 a 0,87 para o queijo controle e 0,84 a 0,87 para o queijo revestido. Tais resultados corroboram aos encontrados por Andrade (2006), ao avaliar a textura instrumental de queijo coalho produzido de forma industrial e artesanal comercializado no estado Ceará, em que obtiveram variação de 0,83 a 0,85 para os queijos produzidos de forma industrializada e de 0,79 a 0,89 para os queijos produzidos artesanalmente. E aos de Silva (2013), que obteve variação de 0,87 a 0,88 ao trabalhar com queijo tradicional ao longo de 28 dias de armazenamento. Bem como ao obtido por Tolentino (2013) que obteve valores de 0,86 a 0,84 com até 60 dias de maturação.

Os quadros da análise de variância para os parâmetros de coesividade, gomosidade, mastigabilidade e resiliência não apresentaram F significativo para a interação

entre os fatores tratamento x tempo, o que nos permite uma abordagem individual para cada um deles, efeitos principais, uma vez que esses atuam de maneira independente.

A coesividade é definida como uma medida da força das ligações entre as proteínas (TUNICK, 2000). Os dados encontrados foram de 0,39 a 0,47 e 0,38 a 0,44 para o queijo controle (T1) e queijo revestido (T5), respectivamente. Sendo que T5 apresentou diferença estatística de T1 com 15 dias de armazenamento, no entanto ao longo do tempo manteve-se estável, diferente de T1 que diminuiu após 30 dias de armazenamento. Seguindo a definição de Andrade (2006) formulações com a mesma coesividade sofrem a mesma extensão necessária para que seu material possa ser deformado antes da ruptura, ou seja, sensorialmente tais dados mostram que tais amostras devem apresentar, portanto o mesmo grau de compressão entre os dentes, antes de romper sua estrutura. Silva (2013) apresentou média de 0,62 a 0,68 para queijos durante 28 dias de armazenamento. E por Tolentino (2013), com variação de 0,77 a 0,76 para queijo produzido com leite pasteurizado.

Conforme Bertolino et al. (2011), a gomosidade e mastigabilidade, as quais representam força e energia, respectivamente, são utilizadas para mastigar o alimento até a homogeneização para engolir. Portanto, com base nos resultados expressos na tabela 20, cujos resultados diminuíram ao longo do tempo, demonstrando que o queijo reduziu a necessidade de energia para serem desintegrados, caracterizando-os como macios, que segundo Silva (2013), o teor de gordura influencia na mastigabilidade, em que foi possível observar que entre tratamentos não houve diferença estatística entre estes dois parâmetros.

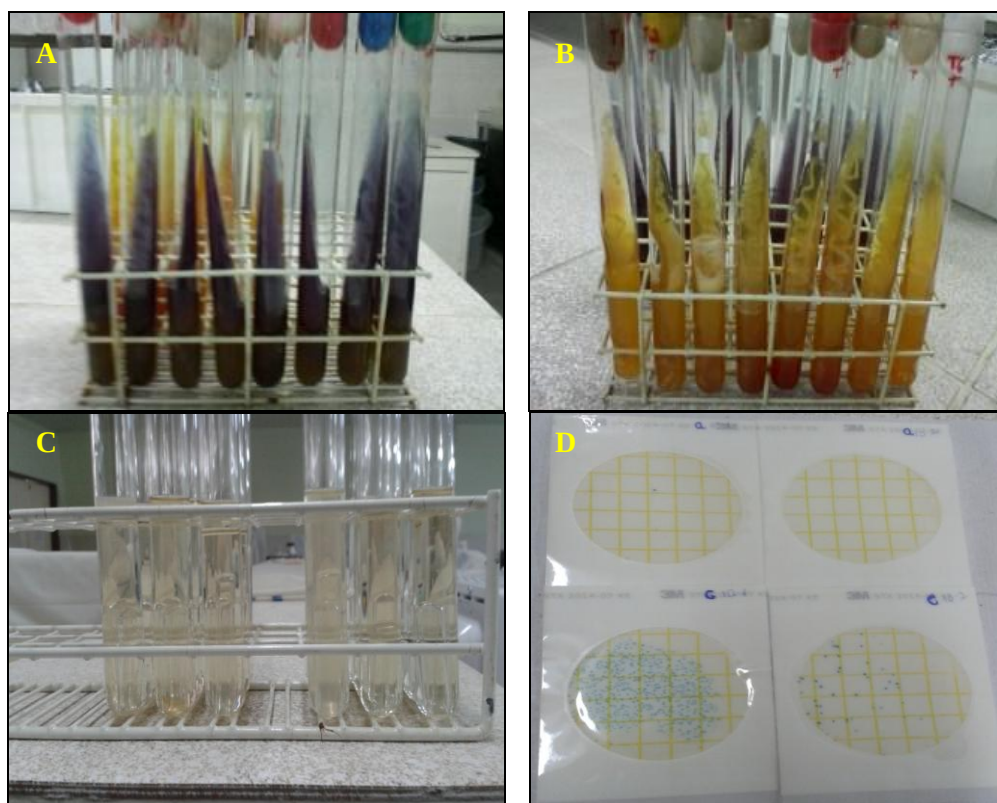
A resiliência do presente estudo mostrou-se inferior aos de Tolentino (2013), cuja variação que encontrou foi de 0,43 a 0,37. Este parâmetro demonstra a capacidade do queijo retornar a posição normal após a primeira compressão. Portanto, neste estudo os queijos apresentaram baixa resiliência. Segundo Bertolino et al. (2011), este parâmetro apresenta decréscimo no decorrer do armazenamento.

5.5.4 Resultados microbiológicos

As amostras de queijo coalho, T1 e T5, apresentaram ausência de *Salmonella* sp (A e B), coliformes totais (C) e *Staphylococcus aureus* (D) como pode ser observado na figura 29, em todos os tempos avaliados mediante análise sensorial. Em relação à análise de *Staphylococcus aureus* (D), não houve crescimento de colônias típicas deste microrganismo. No entanto, ao comparar as placas, observa-se que o queijo sem revestimento (T1) apresentou

uma flora contaminante, enquanto o queijo com revestimento (T5) não apresentou crescimento de colônias quando avaliado com 30 dias de armazenamento.

Figura 29: Demonstração dos resultados das análises microbiológicas com 30 dias de armazenamento refrigerado $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ (A: tubos negativos da análise de *Salmonella* em meio LIA; B: tubos negativos da análise de *Salmonella* em meio TSI; C: tubos negativos da análise de coliformes; D: Resultados negativo para análise de *Staphylococcus aureus*).



5.5.5 Análise sensorial, intenção de compra e avaliação da preferência positiva

Foram analisadas por meio do teste sensorial de aceitação global. A distribuição da idade dos provadores foi dividida por sexo em cada tempo avaliado.

Aos 7 dias de armazenamento, 51% dos provadores eram do sexo masculino, sendo que 25% tinham entre 15 a 20 anos, e 48% eram do sexo feminino, e destas, 21% possuíam idade entre 15 a 20 anos. Aos 15 dias, 42% eram do sexo masculino, sendo 23% de 15 a 20 anos de idade, e 58% eram do sexo feminino, em que 38% tinham idade entre 15 a 20 anos. Quando avaliados com 30 dias de armazenamento, 50% eram do sexo masculino e 50% feminino, dos quais 26 e 25% tinham idade entre 15 a 20 anos de idade, respectivamente. Em seguida, foram expressivos nas avaliações, provadores com idade entre 20 a 25 anos, com percentual de 35, 15 e 38%, com 7, 15 e 30 dias, respectivamente.

Os escores médios das notas atribuídas pelos provadores em cada tempo avaliando, 7, 15 e 30 dias de estocagem, para impressão global, aroma, sabor, textura e cor, bem como a média atribuída para a intenção de compra, encontram-se na tabela 21.

Tabela 21: Valores médios das notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitação global durante 30 dias de armazenamento a $4\pm1^{\circ}\text{C}$.

Análises	Tratamento	Estabilidade (Dias)		
		07	15	30
Impressão global	T1	7.25 ^{Aa}	7.65 ^{Aa}	7.55 ^{Aa}
	T5	7.08 ^{Aa}	7.31 ^{Aa}	7.18 ^{Aa}
Aroma	T1	6.93 ^{Aa}	7.20 ^{Aa}	7.41 ^{Aa}
	T5	6.80 ^{Aa}	7.11 ^{Aa}	7.20 ^{Aa}
Sabor	T1	7.31 ^{Aa}	7.40 ^{Aa}	7.01 ^{Aa}
	T5	6.73 ^{Ba}	6.86 ^{Aa}	6.73 ^{Aa}
Textura	T1	7.55 ^{Aa}	7.11 ^{Aa}	7.08 ^{Aa}
	T5	7.43 ^{Aa}	7.10 ^{Aa}	6.96 ^{Aa}
Cor	T1	7.76 ^{Aa}	7.51 ^{Aa}	7.43 ^{Aa}
	T5	7.46 ^{Aa}	7.40 ^{Aa}	7.28 ^{Aa}

* As médias seguidas de uma mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem quanto ao tratamento; e a mesma letra minúscula na mesma linha não diferem quanto ao tempo, a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey; **T1: 0%G;%OE; e T5: 1%G,0,2%.

A interação entre tratamento e tempo não apresentou diferença estatística nos dois tratamentos avaliados durante os tempos de armazenamento, bem como ao serem avaliados de forma independentes, em que o aroma, textura, cor e impressão global não diferiram estatisticamente a nível de 5% de probabilidade.

As notas de impressão global apresentaram escores médios variando de 7 a 8, que na escala hedônica representa gostei moderadamente a gostei muito, respectivamente, demonstrando assim que houve boa aceitação dos queijos pelos provadores. Portanto, de maneira geral o revestimento aplicado ao queijo não influenciou na impressão global do produto. As médias encontradas no presente estudo corroboram aos de Cavalcante et al. (2007), ao avaliar queijo coalho empregando leite pasteurizado e cultura endógena, em que apresentaram notas variando de 6,81 a 7,38, sendo estes avaliados com 15 dias de maturação. Valores semelhantes foram também obtidos por Todescatto et al. (2013), avaliando queijo análogo ao bousin, os quais encontraram média de 8,54, estando na faixa de gostei muito e por Andrade (2006), com variação de 6,40 a 7,49 em sua pesquisa avaliando diferentes queijos.

O aroma e a cor, com variações entre 6,80 a 7,41 e 7,28 a 7,76, respectivamente, não apresentaram diferença estatística entre tempo e tratamento, indicando que a adição do

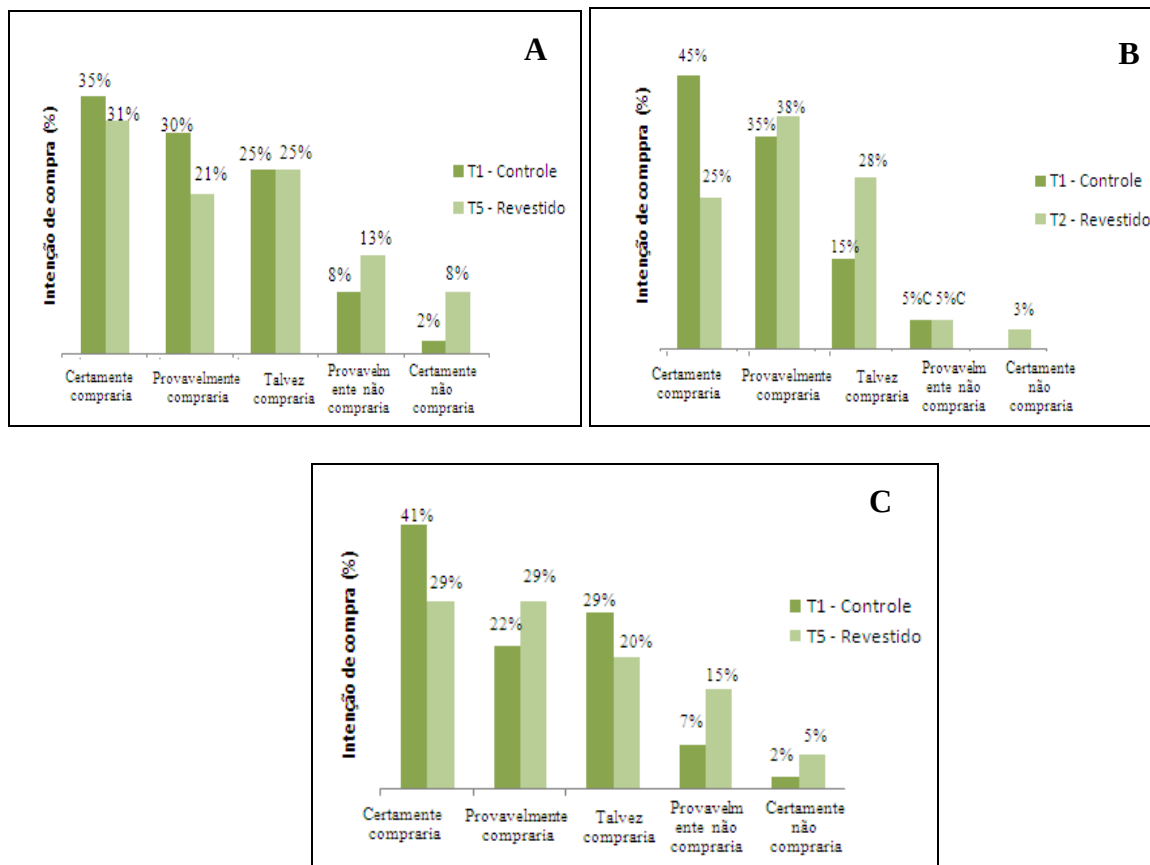
óleo essencial, componente volátil e de aroma característico, não interferiu nestes parâmetros quando avaliado durante 30 dias de armazenamento. Andrade (2006) obteve escores inferiores, sendo estes de 5,76 a 6,81 ao avaliar queijos produzidos de forma artesanal e comercializados no estado do Ceará.

Em relação ao sabor, houve diferença do T1, sem revestimento e T5 com revestimento, quando avaliado com 7 dias de armazenamento, podendo-se constatar que o revestimento, constituído de galactomanana e óleo essencial, afetou o sabor do queijo, visto que foi perceptível pelos julgadores, apresentando notas médias equivalentes a gostei ligeiramente. Os escores inferiores no T5 pode estar relacionado a adição do óleo essencial, visto que as galactomananas não possuem sabor, cor e odor. Alves et al. (2010), avaliaram queijo coalho revestido com galactomanana e observaram que os escores médios para o queijo revestido foram maiores do que os do queijo controle. Kampf e Nussinovitch (2000) avaliaram revestimento para queijo, sendo produzido com hidrocolóides (carragena, alginato e gelana) e detectaram que os revestimentos não influenciaram o gosto do queijo. Vale salientar que com 15 e 30 dias de armazenamento, os tratamentos não diferiram entre si, apresentando escores médios superiores a Andrade (2006), que obteve médias entre 5,78 a 7,05 e 6,19 a 6,69 para queijos comercializados no Ceará, de forma artesanal e industrial, respectivamente.

A interação da intenção de compra não apresentou diferença estatística, indicando médias entre talvez compraria o produto e provavelmente compraria o produto. Os percentuais relativos à intenção de compra dos queijos em cada tempo avaliado, 7, 15 e 30 dias, encontram-se na figura 30. Conforme figura 30 (A), observa-se que o queijo coalho controle (T1) e o queijo revestido (T5) apresentaram percentuais para intenção de compra positiva de 75%, e 52%, respectivamente. E 25% dos provadores ficaram em dúvida se comprariam ambos os queijos (T1 e T5). Portanto, o revestimento aplicado ao queijo coalho reduziu o percentual de compra pelos provadores, o que pode estar relacionado com o parâmetro de sabor, em que apresentou diferença estatística quando avaliado com 7 dias de armazenamento (tabela 21).

Aos 15 dias de armazenamento, houve um aumento na intenção de compra do queijo revestido (T5), em que foi possível observar uma intenção positiva, ao somar os valores de certamente compraria e provavelmente compraria o produto, o qual apresentou percentual de 63%, sendo este 11% superior quando avaliado com 7 dias, sendo que 28% dos provadores ficaram em dúvida se compraria ou não o queijo com revestimento. Para o queijo controle (T1), a intenção positiva, foi de 80%, consolidando assim, um elevado percentual relativo à intenção de compra do queijo coalho.

Figura 30: Resultados da intenção de compra dos queijos T1, sem revestimento; e T5, com revestimento durante o armazenamento refrigerado a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ (A: Percentuais de intenção de compra durante 7 dias; B: Percentuais de intenção de compra durante 15 dias; C: Percentuais de intenção de compra durante 30 dias).

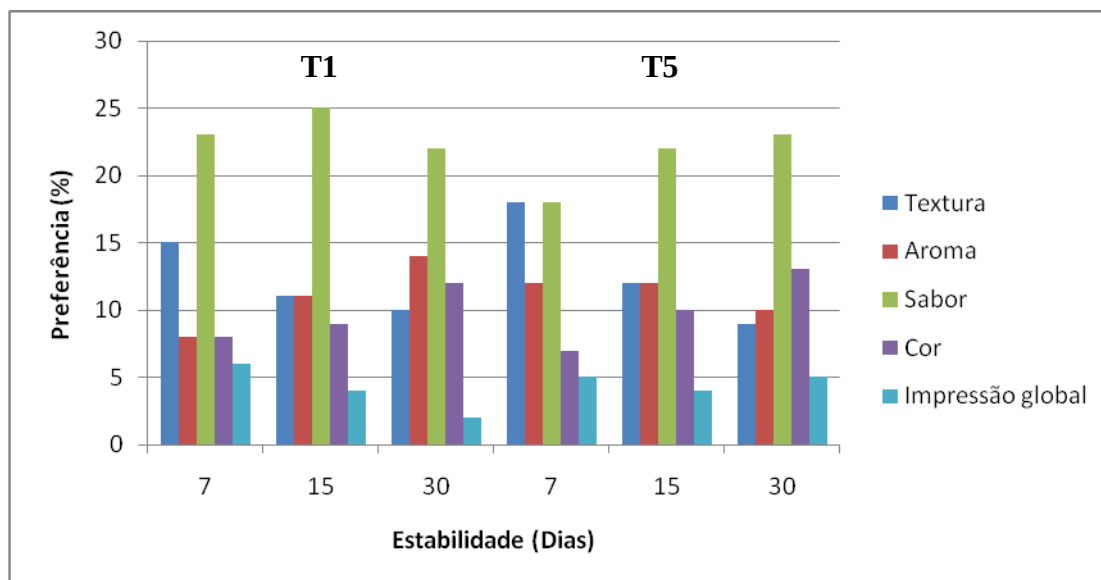


Em relação aos 30 dias, a intenção positiva sofreu um decréscimo em ambos os tratamentos, cujos percentuais foram de 63% e 58%, para T1 e T5, respectivamente. Tolentino (2013), ao avaliar queijo revestido de gordura suína e alecrim, obteve intenção positiva de 77% quando avaliado com provadores acima de 30 anos de idade e 47% quando avaliado por provadores com faixa etária abaixo de 30 anos. Neste sentido, o autor ressalta que a atitude de compra de determinado produto depende do valor que o mesmo custaria no mercado e que consumidores que apresentam idade menor que 30 anos, tendem a não valorizar produtos diferenciados. No presente estudo, a faixa etária dos julgadores pode ter influenciado na intenção de compra do queijo coalho revestido, visto que, embora seja um produto comum e bastante consumido na região, foi aplicado ao mesmo um conservante natural.

Na figura 31 encontra-se a preferência positiva dos consumidores, onde é possível observar que os queijos (T1 e T2) apresentaram comportamentos semelhantes, visto que o sabor apresentou percentuais acima de 20%, com exceção apenas do T2 com 7 dias de armazenamento, coincidindo assim, com a menor nota do parâmetro do sabor no referido

tempo. Em contrapartida, o aroma apresentou o dobro do percentual do T1 com 7 dias, demonstrando que a adição de óleo essencial, em relação a este parâmetro.

Figura 31: Valores da preferência positiva dos provadores em relação aos atributos avaliados durante o armazenamento de 30 dias a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$.



6 CONCLUSÃO

- ✓ O rendimento da extração de galactomanana foi de 25,44% e a sua razão manose:galactose foi de 2,93:1,0;
- ✓ A análise da perda de massa demonstrou que os tratamentos T5 e T8 apresentaram menores perdas de peso ao longo de 20 dias de armazenamento;
- ✓ Os tratamentos com maiores inibições microbiológicas foram os queijos com revestimento sem galactomanana e constituído apenas de óleo essencial (T2 e T3) e os constituídos de galactomananas e óleo essencial (T5 e T9);
- ✓ A maioria dos tratamentos não apresentaram diferença estatística quanto as análises de umidade, atividade de água e pH durante 20 dias de armazenamento;
- ✓ O revestimento, definido a partir da caracterização microbiológica, físico-química e perda de peso dos queijos, apresentou em sua composição 0,2% de óleo essencial; 1% de galactomanana; e 0,1% de polissorbato 80 (T5);
- ✓ A aplicação do revestimento comestível não alterou as características de derretimento e textura instrumental ao longo de 30 dias de armazenamento;
- ✓ Os atributos sensoriais de textura, cor, aroma e impressão global não apresentaram diferença estatística. O T5 apresentou menores notas para o atributo de sabor com 7 dias. Porém, apresentaram escores médios entre gostei moderadamente e gostei muito, sendo estes valores coerentes com os encontrados na literatura;
- ✓ O revestimento a base de galactomanana apresentou-se como uma fonte alternativa e viável de incorporação de óleo essencial adicionado em queijo coalho, principalmente por ser um produto de alta incidência por microorganismos patogênicos. Portanto, a incorporação do óleo essencial surge como um ingrediente possível de ser adicionado ao queijo coalho proporcionando melhor conservação deste produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, L. C. et al. O queijo no Brasil: origem e descrição-2º parte. **Revista Leite e Derivados**, v.3, n.16, p.34-41, 1994 citado por MENDONÇA, E.B.A. **Incidência de *Lysteria monocytogenes* em queijo coalho comercializado na cidade do Recife- PE**. 29 f. Monografia (Especialização em Gestão da Qualidade e Vigilância Sanitária em Alimentos) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Recife – PE, 2009
- ALVES, R. C.; GADÊLHA, P. C.; SILVA, F. A. K.; DAMASCENO, M. N.; BRAGA, R. C.; TEIXEIRA SÁ, D. M. A. Galactomananas de *Caesalpinia pulcherrima* um Potencial Polissacarídeo para Revestimento Visando uma Melhora nas Características Físico-químicas e Sensoriais do Queijo Coalho. CONNEPI, Alagoas, 2010.
- ANDRADE, A.A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo coalho produzido no estado do Ceará**. 127 f. Dissertação (Mestrado). Fortaleza, 2006.
- ÂNGELO, J. H. B; OLIVEIRA, H. B. de; BEZERRA, J. D. C.; FILHO, J. S. de S; FILHO, J. R. F. **Condições higiênico-sanitárias da produção de queijo de coalho artesanal fabricado em jucati-pe: orientação aos proprietários**. In, JEPEX, Recife – PE, 2009.
- ARAÚJO, M. C. G. de; SANTOS, R. A. dos; SILVA, C. P. A. e; CIRILO, R. de L; CIRILO, R. de L.; MARQUES, R. C. P. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de Currais Novos. **Holos**, Ano 25, Vol. 4, 2009.
- AZERO, E.G; ANDRADE, C.T. Extração e Caracterização da Galactomanana de Sementes de *Caesalpinia pulcherrima*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia** - Abr/Jun -1999.
- AZERO, E.G; ANDRADE, C.T. Testing procedures for galactomannan purification. **Polymer Testing**. V. 21, p 551-556, 2002.
- BARROS, G.F; SOUZA, L.M; AGUIAR, N.L; NETO, N.M; MARTINS, P.H.O. **Elaboração de um produto derivado lácteo, denominado Boursin (*petit-suisse* salgado), com características funcionais**. 2009. 58 f. Monografia (bacharelado em Nutrição) –Faculdade de Ciências e Saúde da Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2009.
- BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M. et al. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v.129, p.1001-1011, 2011.
- BEUX, S. Apostila de Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7PYAF/apostila-tecnologia-leite-derivados>. Acessado em: 23 de junho de 2014.
- BOSE, U; HOSSAIN, L; BALA, V; SHILL, A. K; RAHMAN, A. A. Anti-inflammatory and neuropharmacological activities of *Caesalpinia pulcherrima* bark. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**. V. 2 N. 1. Jan/ Mar, 2011.

BRAGA, R. C; TEIXEIRA-SÁ, D. M A; RIBEIRO, A. F; MIRANDA, R. L; ALMEIDA, L. M. DE; HORTA, A. C. G; MOREIRA, R. DE A. Evaluation of *Caesalpinia Pulcherrima* Endospermic Gum as Affinity Matrices for Galactose-Binding Lectins Interaction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. Vol.54, n. 2: pp. 283-292, March-April 2011.

BRAGA, R. C; MOREIRA, R. de A; BELTRAMINI, L. M. Isolamento e Caracterização de proteínas de Interesse Biológico em Sementes de *Caesalpinia Pulcherrima* Linn. In. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011**. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo de coalho. **Instrução Normativa Nº 30**, de 26 de junho de 2001a.

BRASIL. Resolução - **RDC nº 12**. Aprova o REGULAMENTO TÉCNICO SOBRE PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA ALIMENTOS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. De 2 de janeiro de 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Defesa Animal. **Portaria Nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial, Brasília, DF, 11 mar. 1996, seção 1, p. 3977-3986.

BRITO, A.M.G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., e *Mentha piperita* L.** 75 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Tiradentes, Aracaju, 2007.

BUCKERIDGE, M.S; SANTOS, H.P; TINÉ, M.A.S. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. **Plant Physiology Biochemistry**. 38 (1/2), p. 141-156, 2000.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(1): 205-214, jan.-mar. 2007.

CERQUEIRA, M. A ; SOUSA-GALLAGHER, M. J; MACEDO, I; RODRIGUEZ-AGUILERA, R. SOUZA, B; TEIXEIRA, J.A; VICENTE, A. Use of galactomannan edible coating application and storage temperature for prolonging shelf-life of “Regional” cheese. **Journal of Food Engineering** 97, p.87–94, 2010.

CERQUEIRA, M. A; SOUZA, B. W. S; TEIXEIRA, J. A; VICENTE, A. A. Effect of glycerol and corn oil on physicochemical properties of polysaccharide films: a comparative study. **Food Hydrocolloids** 27, p. 175 e 184, 2012.

CERQUEIRA, A; LIMA, A.M; SOUZA, B.W.S; TEIXEIRA, J.A; MOREIRA, R.; VICENTE, A.A. Functional polysaccharides as edible coatings for cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.57, n.4, 1456-1462, 2009a

CERQUEIRA M.A; LIMA, A.M; TEIXEIRA, J.A; MOREIRA, R.A; VICENTE, A.A. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. **Journal of Food Engineering**. 94, p. 372–378, 2009b

CERQUEIRA, M. A; PINHEIRO, A. C; SOUZA, B. W. S; LIMA, A. M; RIBEIRO, C; MIRANDA, C. Extraction, purification and characterization of galactomannans from non-traditional sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 75; n.3; p.408-414, 2009c

CERQUEIRA, M.A; BOURBON, A.I; PINHEIRO, A.C; MARTINS, J.T; SOUZA, B.W.S.A; TEIXEIRA, J.A; VICENTE, A.A. Galactomannans use in the development of edible films/coatings for food applications. **Trends in Food Science & Technology**, 22, P. 662-671, 2011.

CHAKRABORTHY, G. S; BADUJAR, R.S. Antioxidant Activity of the Successive Extracts of *Caesalpinia Pulcherrima* Leaves. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 1, n.2; p. 75-76, 2009.

COSTA, S.L. **avaliação do controle da qualidade do queijo de coalho em laticínios no agreste de pernambuco**. 46 f. Monografia (Especialista em Gestão da Qualidade Vigilância Sanitária em Alimentos) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Recife - PE, 2009.

CUNHA, P.L.R; PAULA, R.C.M; FEITOSA, J.P.A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 649-660, 2009.

DANTAS, D. S; **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, PB**. 80 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Campina Grande, PB, 2012.

DEA, I.C.M.; MORRISON, A. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, v. 31, p. 241-312, 1975, citado por ALVES, R. C.; GADÊLHA, P. C.; SILVA, F. A. K.; DAMASCENO, M. N.; BRAGA, R. C.; TEIXEIRA SÁ, D. M. A. Galactomannans de *Caesalpinia pulcherrima* um Potencial Polissacarídeo para Revestimento Visando uma Melhora nas Características Físico-químicas e Sensoriais do Queijo Coalho. CONNEPI, Alagoas, 2010.

DIAS, J. C. **As peripécias do queijo no Brasil**. Revista Isto É - Dinheiro rural. Edição no 72, outubro, 2010.

DRUBI, A.J. **Estudo microbiológico de matérias-primas processadas de origem animal utilizadas na fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto/SP**. 2005. 46 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp. JABOTICABAL - SÃO PAULO, 2005.

DURANGO, A.M; SOARES, N.F; ARTEAGA, M.R. FILMES Y Revestimientos comestibles como empaques activos biodegradables en la conservación de alimentos. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**. V.9, n.1, p.122 – 128, 2011.

DUTCOSCKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 3 ed. Curitiba: CHAMPAGNAT, 2011.

FAJARDO, P.; MARTINS, J.T; FUCIÑOS, C. PASTRANA, L.; TEIXEIRA, J.A; VICENTE, A.A. Evaluation of a chitosan-based edible film as carrier of natamycin to improve the storability of Saloio cheese. **Journal of Food Engineering** 101 (2010) 349–356.

FEITOSA, T; BORGES, M.F; NASSU, R.T; AZEVEDO, É.H.F; MUNIZ, C.R. Pesquisa de Salmonellasp., Listeriasp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 23(Supl): 162-165, dez. 2003.

FERNANDES, C.A.D; NAKASHIMA, T; SERRA, G.E. Novas Contribuições ao Estudo da Galactomanana Bruta extraída de Sementes de *Senna spectabilis* DC. **Acta Farmacéutica Bonaerense** - vol. 23 nº 3 - ano 2004.

FERRO, E.S; OLIVEIRA, M.E.B; LOPES, MF.G.L; ALMEIDA, M.M.B, BASTOS, M.S.R. Determinação de minerais em queijos coalho do vale do jaguaribe/ce visando uma indicação geográfica. Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Salvador, 2010.

FILHO, J.R.F; FILHO, J.S.S; ARCANJO, H.G.S; OLIVEIRA, H.B; LINO, F.R.L; BEZERRA, J.I.L; SILVA, J.J.P. Avaliação dos parâmetros físico químicos do queijo coalho artesanal produzido em Calçado – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. v. 06, n. 01: p. 722-729, 2012.

FILHO, R.P.V. **Aplicação de polissacarídeos em emulsão cosmética: análises reológicas**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica). Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. CURITIBA, 2009.

FILHO, J.R.F; FILHO, J.S.S; OLIVEIRA, H.B; ANGELO, J.H.B; BEZERRA, J.D.C. Avaliação da Qualidade do Queijo “Coalho” Artesanal Fabricado em Jucati – PE. **Revista Eletrônica de Extensão**, 2009.

FOX, M. A.; WHITESELL, J. K. Organic chemistry. Boston: Jones and Bartlett, 1994.

FRANCA, L. G; CARMO, R. C; SILVA, H. A; CHAVES, M. J. L; QUEIROZ, Z. F; BRAGA, R. C. UTILIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS NATURAIS COMO MATERIAIS ADSORVENTES DE ÍONS METÁLICOS. In. **CONNEPI**, VI., 2010 a.

FRANCA, L. G. da; ALMEIDA, F. G. de; NORTE, M. I. J; FRANCA, L. G. da; CHAVES, M. J. L; SILVA, M. S; BRAGA, R. C. TESTE DE APLICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DE FLAMBOYANT E FLAMBOYANZINHO COMO ESPESANTES EM SUCOS DE FRUTAS TROPICAIS. In. **CONNEPI**, VI., 2010b.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FREITAS, E.I. **Deteção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* spp. isolado do queijo minas frescal**. 2005. 119 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2005.

GIOMBELLI, C.J.; TAMANINI, R.; BATAGLINI, A.P.P.; MAGNANI, D.F.; ÂNGELA, H.L.; BELOT, V.L. Avaliação da qualidade microbiológica, físico-química e dos parâmetros enzimáticos de leite pasteurizado e leite tipo B, produzidos no Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1539-1546, out./dez. 2011.

GRADELLA, A.N. **Aspectos nutricionais e de qualidade do leite**. Curso de especialização em higiene e inspeção de produtos de origem animal. Universidade Castelo Branco. São Paulo, 2008.

GRANDI, A.Z; ROSSI, D.A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia - MG. **HORIZONTE CIENTÍFICO**. VOL 4, SUPLEMENTO 3, NOV 2010.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª ed. 1ª edição digital. São Paulo: IMESP, 2008.

KROLOW, A.C.R; RIBEIRO, M.E.R. **Obtenção de leite com qualidade e elaboração de Derivados**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006.

LÁCTEA BRASIL. **Queijo: Alimento nobre e saudável**. Junho de 2006. Disponível em: <http://www.lacteabrasil.org.br/images/conteudo/Queijos.pdf>.

LANGONI, H.; PENACHIO, D.S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO, F.; FACCIOLI-MARTINS, P.Y.; LUCHEIS, S.B.; MENOZZI, B.D.; SILVA, A.V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.31, n.12, p.1059-1065, 2011.

LEONARDI, A.L.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; ARTHUR, V. Disponibilidade de cálcio em leite bovino tratado por raios gama. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 31(1): 31-40, jan.-mar. 2011.

LIMA, A.T.M. **Avaliação do potencial antioxidante e antiinflamatório de galactomanana do fungo *Tylopilus balouii***. 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do rio Grande do Norte. Natal, 2009.

MACHADO, G. M; COSTA, R. G. B; Viabilidade tecnológica do uso de ácido láctico na elaboração de queijo de coalho. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n.384, p.80-81, 2011.

MAGESTE, A.C.; PEREIRA, J.P.F.; NASCIMENTO, L.F.; SILVA, P.H.F. Determinação dos teores de cálcio total e iônico em leites pasteurizado e UHT desnatados. **Nutrire**, v.38, n.Suplemento, p.195-195, 2013.

MARTINS, J.T; CERQUEIRA, M.A; SOUZA, B.W.S; AVIDES, M.C; VINCENTE, A.A. J. Shelf Life Extension of Ricotta Cheese Using Coatings of Galactomannans from Nonconventional Sources Incorporating Nisin against *Listeria monocytogenes*. **Agric. Food Chem.** 2010, 58, 1884–1891

MATOS, F.C. **Caracterização físico-química de galactomananas de *Adenanthera pavonina* (carolina) e *Delonix regia* (flambuoyant) reticuladas com trimetafosfato de sódio.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). 2008. 103 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. ARARAQUARA – SP, 2008.

MALACARNE, A. M.; SUMMER, A.; FRANCESCHI, P.; FORMAGGIONI, P.; PECORARI, M; PANARI, G.; VECCHIA, P.; SANDRI, S.; FOSSA, E.; SCOTTI, C.; MARIANI, P. Effects of storage conditions on physico-chemical characteristics, salt equilibria, processing properties and microbial development of raw Milk. **International Dairy Journal**. 29, 36e4, 2013.

MENDES, C.G.; SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.A.; JÁCOME, C.G.M.; LEITE, A.I. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**., Goiânia, v. 11, n. 2, p. 349-356, abr./jun. 2010.

MENDONÇA, E.B.A. **Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo coalho comercializado na cidade do Recife- PE.** 29 f. Monografia (Especialização em Gestão da Qualidade e Vigilância Sanitária em Alimentos) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Recife – PE, 2009

MENEZES, S. S. M; Cruz, F. T; MENASCHE, R; **Queijo de Coalho e Queijo Artesanal Serrano: identidades de produtores e de consumidores associadas a atributos de qualidade.** VIII Congresso Lationamericano de Sociología Rural, Porto de Galinhas, 2010.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. **Revista de Geografia** (UFPE) V. 28, No. 1, 2011.

MENEGUIN, R.G. Géis de ágar /galactomanana de *Schizolobium parahybae*((vell.) Blake) (Guapuruvu): análises reológicas e por microscopia eletrônica de varredura. 103 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. 2012.

MILINSKI, C.C; GUEDINE, P.S.M; VENTURA, C.A.A. **O sistema agroindustrial do leite no Brasil: uma análise sistêmica.** Centro Universitário de Franca, São Paulo, 2008.

OLIVEIRA, K.A.; NETO, J. E; PAIVA, J.E.; MELO, L.E.H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do cabo de SANTO AGOSTINHO, PERNAMBUCO, BRASIL. **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set., 2010.

OKURA, M. H. **avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal comercializados na região do Triângulo Mineiro**. 2010. 146 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp. JABOTICABAL - SP, 2010.

PASTORE, G.M.; BICAS, J.L; JÚNIOR, M.R.M. **Biotecnologia de Alimentos**. V. 12. São Paulo: Atheneu. 2013.

PINTO, C.L.O.; MARTINS, M.L.; VANETTI, M.C.D. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicrotróficas proteolíticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, 26(3): 645-651, jul.-set. 2006.

PETRUS, R.R.; LOIOLA, C.G.; OLIVEIRA, A.F. Microbiological Shelf Life of Pasteurized Milk in Bottle and Pouch. **Journal of Food Science**. v.75, n.1, p. 36-40, 2010.

PERRY, K.S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, Vol. 27, No. 2, 293-300, 2004.

QUEIROZ, A.A.M. Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de queijo de coalho no Ceará. 2008. 54 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2008.

REAL, C.G.A.; ALEGRO, L.C.A.; TURATE, M.; SILVA, L.C.C.; SOUZA, C.H.B.; SANTANA, E.H.W. Assessment of physicochemical and microbiological quality of uht whole milk and proteolysis determination during storage. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, nº. 394, p. 5-10, set/out., 2013.

REIS et al. Procedimentos de coleta de leite cru individual e sua relação com a composição físico-química e a contagem de células somáticas. **Ciência Rural**, Santa Maria. v.37, n.4, julho, 2007.

ROSA, I. G; SOUZA, N. S; SANTANA, A. A; LIMA, H. de S. EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS DE *Leucaena leucocephala* (Lam.) DE Wit. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n.1, p. 22-30, 2009.

SALIMENA, A. P. S; JÚNIOR, A. C. S; DOMINGUES, A. S; CARDOSO, M. DAS G; PICCOLI, R. H. **Aplicação de óleo essencial em queijo minas frescal como conservante natural: resultados preliminares**. In: 27º Congresso Nacional de Laticínios, 38ª Expomaq, 37ª Expolac, 37ª Concurso Nacional de Produtos Lácteos, 8º Congresso Internacional do Leite - Embrapa. Juiz de Fora/MG, 2010.

SALOTTI, B.M. et al. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.73, p. 171-175, 2006.

SANTANA, R. F; SANTOS, D.M; MARTINEZ, A.C.C; LIMA, A.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Minas Gerais, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, N.A.F; LACERDA, L.M.; RIBEIRO, A.C.; LIMA, M.F.V.; GALVÃO, N.R.; VIEIRA, M.M.; SILVA, M.I.S. ; TENÓRIO, T.G.S. avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado pradonizado comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arquivo do Instituto Biológico.**, São Paulo, v.78, n.1, p.109-113, jan./mar., 2011.

SEBRAE, **Queijos nacionais**. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas, 2008.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. **Brazilian Journal Food Technology.**, v.8, n.1, p. 43-56, jan./mar., 2005.

SILVA, W.S. **Comportamento mecânico do queijo de coalho tradicional, com carne seca, tomate seco e orégano armazenados sob refrigeração**. 59 f. Dissertação (Mestrado).. Itapetinga: Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.B. R.; OKAZAKI, O.G.M.T. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela. 2007.

SILVA, F. de A. S. **ASSISTAT Versão 7.6 beta**. Assistência Estatística, Departamento de Engenharia Agrícola do CTRN. Universidade Federal de Campina Grande- PB, Brasil. Disponível em: <<http://www.assistat.com/indexp.html>>, 2011.

SOARES, C.E.A. **Caracterização estrutural e potencial da galactomanana de *Adenantha pavonina* L. como matéria-prima para a produção de filmes bioativos**. 262 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2009.

SOUSA, A.Z.B; ABRANTES, M.R; SAKAMOTO, S.M; SILVA, J.B.A; LIMA, P.O; LIMA, R.N; ROCHA, M.O.C; PASSOS, Y.D.B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos Instituto Biológico.**, São Paulo, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

TACO, **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4ª edição revisada e ampliada Campinas – SP, 161 p, 2011.

TODESCATTO, C; COLONETI, L; BEUX, S; CUNHA, M. A. A; Desenvolvimento e caracterização de queijo análogo ao boursin. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 31, n. 2, p. 245-254, jul./dez. 2013.

TOLENTINO, M.C. **Desenvolvimento e caracterização de queijo de massa semidura recoberto com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 122 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Paraná, obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos. Curitiba, 2013.

VENTURINI, K.S; SARCINELLI, M.F; SILVA, L.C. Características do Leite. Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, **Boletim Técnico**, 2007.

VENTURINI, K.S; SARCINELLI, M.F; SILVA, L.C. Processamento do leite. Universidade Federal do Espírito Santo, **Boletim Técnico**, 2007b.

DISCUSSÃO GERAL

Para o estudo de formulações aplicadas em alimentos apresenta-se como requisito fundamental a caracterização dos componentes os quais serão utilizados como matéria-prima para a elaboração do produto em análise, bem como para obter-se controle da pesquisa. No presente estudo, o óleo essencial foi caracterizado quanto ao rendimento de extração, densidade e composição química, assim como a sua atividade antibacteriana testada frente a duas cepas bacterianas, *S. aureus* e *E. coli*, frequentemente encontradas em casos de contaminação alimentar, principalmente no alimento em estudo, queijo coalho.

O óleo essencial, obtido de *C. citratus*, cultivado em Limoeiro do Norte, apresentou rendimentos superiores aos expostos na literatura científica, o que pode estar relacionado com as características edafoclimáticas da região. Foram identificados sete grupos funcionais a partir da análise de infravermelho e 91,87% do óleo essencial foi identificado quanto a sua composição química, revelando os componentes majoritários deste óleo, que são considerados os responsáveis pela atividade antibacteriana que o óleo essencial exerce frente aos microorganismos. Um volume de 0,5 µL do óleo essencial de *C. citratus* apresentou halos de inibição de 7,75 e 8,25 mm para *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. E em relação à concentração inibitória mínima, as concentrações de 42,5 e de 25,5 mg/mL foram eficientes para inibir as bactérias *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente. Portanto, torna-se evidente a importância de determinar a caracterização do óleo essencial, bem como o seu potencial efeito antimicrobiano, principalmente quando se propõe adicioná-lo em matrizes alimentares.

A aplicação do óleo essencial ao queijo coalho teve como base de inserção a solução de galactomananas, polissacarídeo proveniente de *Caesalpinia pulcherrima*, sendo esta também avaliada quanto a sua composição, o qual apresentou rendimento de extração de 25,44% e a sua razão manose:galactose foi de 2,93:1,0; sendo que estes dados corroboram aos encontrados na literatura em estudo. Outra matéria-prima avaliada no presente estudo foi o leite, principal ingrediente para a fabricação dos queijos. O mesmo apresentou-se com qualidade microbiológica, porém, alguns lotes apresentaram valores físico-químicos inferiores aos estipulados pela Legislação Brasileira.

A análise para verificação da melhor película foi avaliada a partir de um estudo de nove tratamentos variando teor de galactomanana e óleo essencial. A análise da perda de massa dos queijos demonstrou que os tratamentos T5 e T8 apresentaram menores perdas de peso ao longo de 20 dias de armazenamento. Em relação aos aspectos microbiológicos, foram

visualizadas inibições nos tratamentos com revestimento sem galactomanana e constituído apenas de óleo essencial (T2 e T3) e os constituídos de galactomananas e óleo essencial (T5 e T9). A maioria dos tratamentos não apresentou diferença estatística quanto as análises de umidade, atividade de água e pH durante 20 dias de armazenamento.

Portanto, o revestimento definido a partir da sua caracterização microbiológica, físico-química e perda de peso apresentaram em sua composição 0,2% de óleo essencial; 1% de galactomanana; e 0,1% de polissorbato 80 (T5).

CONCLUSÃO GERAL

Conclui-se que a partir dos resultados expostos nesta pesquisa torna-se possível a elaboração de revestimentos comestíveis a base de galactomanana e óleo essencial, sendo este o responsável pelo maior controle microbiano e consequentemente, funcionando como um método de conservação aliado a refrigeração, quando adicionado aos queijos coalho.

Ressalta-se também que a incorporação do óleo essencial como ingrediente proporcionou aceitação do produto, sendo estes comprovados pelos testes sensoriais. Leva-se em consideração a percepção da grande diversidade que os queijos apresentam em função de ingredientes e processos de fabricação, o que os tornam fontes de diversos sabores. Portanto, o revestimento em estudo pode ser aplicado ao queijo coalho como um produto inovador e como ferramenta de conservação.

ANEXOS

Nome: _____ Idade: _____	Data: _____ Sexo: _____												
Você está recebendo uma amostra codificada de queijo coalho. Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo e indique o quanto você gostou ou desgostou.													
9- gostei extremamente 8- gostei muito 7- gostei moderadamente 6- gostei ligeiramente 5- nem gostei / nem desgostei 4- desgostei ligeiramente 3- desgostei moderadamente 2- desgostei muito 1- desgostei extremamente													
<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="text-align: left; width: 15%;">AMOSTRA</th> <th style="text-align: left; width: 20%;">Impressão global</th> <th style="text-align: left; width: 15%;">Aroma</th> <th style="text-align: left; width: 15%;">Sabor</th> <th style="text-align: left; width: 15%;">Cor</th> <th style="text-align: left; width: 20%;">Textura</th> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>_____</td> </tr> </table>		AMOSTRA	Impressão global	Aroma	Sabor	Cor	Textura	_____	_____	_____	_____	_____	_____
AMOSTRA	Impressão global	Aroma	Sabor	Cor	Textura								
_____	_____	_____	_____	_____	_____								
Qual atributo você mais gostou? _____													

ANEXO A: Ficha utilizada para a realização do teste sensorial de aceitação global.

Você está recebendo uma amostra de queijo coalho. Por favor, expresse através da escala abaixo a sua intenção de compra.	
5- Certamente compraria 4- Provavelmente compraria 3- Talvez compraria 2- Provavelmente não compraria 1- Certamente não compraria	
AMOSTRA _____	NOTA _____
Comentários:	

ANEXO B: Ficha utilizada para a realização do teste intenção de compra.