



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ALESSANDRA CASAGRANDE RIBEIRO

EFEITO DA ADIÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA ROSA (*Schinus terebinthifolius* Raddi) MICROENCAPSULADO EM QUEIJO MINAS FRESCAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: DSc. Mirela Guedes Bosi
Co-orientadora: DSc. Patrícia Campos Bernardes
Co-orientadora: DSc. Pollyanna Ibrahim Silva

ALEGRE- ES

2015

Ao meu filho Felipe,
meu maior incentivador,
amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS por nunca me abandonar,
Aos meus pais por sempre me apoiarem,
Ao meu filho Felipe pelo amor e carinho,
Aos meus irmãos e tios por estarem sempre torcendo por mim,
Aos meus avós por me inspirarem,
Aos meus amigos da UFES por encherem esses dias de alegria, companheirismo e aprendizado, especialmente: Ariane, Carla, Carmelita, Gisela, Marcela, Paula e Sabrina,
À Joyce e ao André por fazerem parte deste trabalho,
À CAPES pela tão esperada Bolsa,
À UFES e ao PCTA pela oportunidade de um curso de pós-graduação,
À AGROROSA, pela gentil doação da pimenta rosa,
À minha orientadora Mirela por toda dedicação, carinho, ensinamentos e paciência,
Às minhas co-orientadoras: Patrícia e Pollyanna por estarem sempre presentes colaborando, incentivando e acrescentando este projeto,
Ao professor Sérgio por toda atenção dedicada,
Aos professores Adilson, Christiano, Renê e Sukarno pela contribuição neste trabalho,
Ao Toninho pelo apoio,
Aos técnicos: Amanda, Eduardo, Letícia e Mariza por estarem sempre disponíveis a nos atender,
À Edivânia pelo carinho especial,
E tantos outros que tornaram este momento possível.

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1: Formulações utilizadas para microencapsulação.</i>	25
<i>Tabela 2: Dados médios de extração de óleo essencial de pimenta rosa.</i>	36
<i>Tabela 3: Composição do óleo essencial de pimenta rosa</i>	37
<i>Tabela 4: Valores médios e respectivos desvio padrão da atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa.</i>	38
<i>Tabela 5: Valores médios e desvio padrão (\pm) do halo de inibição (cm) do óleo essencial de pimenta rosa e antibióticos para <i>S. aureus</i>.</i>	40
<i>Tabela 6: Caracterização físico-química das 3 formulações de microcápsulas de óleo essencial de Pimenta Rosa</i>	42
<i>Tabela 7: Diâmetro médio (μm) das partículas das 3 formulações de microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa</i>	43
<i>Tabela 8: Parâmetros de cor das três formulações de microcápsulas</i>	50
<i>Tabela 9: Soma de ordens para as formulações A, B, C e D de queijo Minas Frescal adicionado 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%, de óleo essencial de pimenta rosa respectivamente e a diferença entre elas.</i>	52
<i>Tabela 10: Médias e desvios padrão de acidez titulável e pH do leite utilizado nos três processamentos do experimento.</i>	53
<i>Tabela 11: Média e desvio padrão acidez titulável e pH dos queijos produzidos nos três processamentos do experimento</i>	53
<i>Tabela 12: Médias e desvios padrão da composição centesimal do leite utilizado no experimento.</i>	54
<i>Tabela 13: Composição centesimal dos queijos produzidos: médias e desvios padrão dos 3 processamentos</i>	55
<i>Tabela 14: Parâmetros do perfil de textura instrumental dos queijos controle (CO) e queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR)</i>	56
<i>Tabela 15: Parâmetros de cor na formulação de queijo controle (CO) e queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR)</i>	58
<i>Tabela 16: Médias e respectivos desvios padrão do log das contagens de coliformes totais; <i>Escherichia coli</i>; fungos filamentosos e leveduras nos queijos ($\log \text{UFC.g}^{-1}$)</i>	59
<i>Tabela 17: Médias e seus respectivos desvios padrão das notas dos julgadores no teste sensorial de aceitação</i>	62
<i>Tabela 18: Médias e seus respectivos desvios padrão da intenção de compra dos julgadores.</i>	65

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1: Pimenta rosa (Fonte FAES e SENAR, 2009)</i>	9
<i>Figura 2: Esquema básico microencapsulação spray dryer (adaptação ASCHERI, 1997).</i>	13
<i>Figura 3: Representação esquemática das atividades realizadas no experimento</i>	18
<i>Figura 4: Fluxograma da fabricação do queijo Minas Frescal com e sem adição de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.</i>	29
<i>Figura 5: Ficha para o teste de ordenação-preferência (adaptação Minim, 2010)</i>	34
<i>Figura 6: Modelo de Ficha de avaliação utilizada no teste de aceitação sensorial (adaptação de Minim, 2010)</i>	35
<i>Figura 7: Crescimento de S. aureus diferentes concentrações (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0%) de óleo essencial de pimenta rosa após 11 horas de incubação.</i>	41
<i>Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 01 (Fo1), aumento 1000, 2000, 8000 e 20000 vezes.</i>	44
<i>Figura 9: Espectro de Energia Dispersiva (EDS) obtido da formulação 01</i>	45
<i>Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 02 (aumento 1000, 2000 e 8000 vezes).</i>	46
<i>Figura 11: Espectro de energia dispersiva (EDS) obtido da formulação 02.</i>	46
<i>Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 03 (aumento 1000, 2000 e 8000 vezes).</i>	47
<i>Figura 13: Espectro de energia dispersiva (EDS) obtido da formulação 03</i>	48
<i>Figura 14: Difratoograma das formulações 01 (Fo1), 02 (Fo2) e 03 (Fo3).</i>	49
<i>Figura 15: Contagem de S. aureus no queijo Minas Frescal CO e OEPR (log UFC.g⁻¹ de queijo).</i>	60
<i>Figura 16: Distribuição de frequências para o atributo aparência</i>	63
<i>Figura 17: Distribuição de frequências para o atributo sabor.</i>	63
<i>Figura 18: Distribuição de frequências para o atributo textura</i>	64
<i>Figura 19: Distribuição de frequências para a impressão global</i>	64

RESUMO

Ribeiro, Alessandra Casagrande. : Efeito da adição de óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi) microencapsulado em queijo Minas Frescal. (Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES. Orientadora: DSc. Mirela Guedes Bosi. Co-orientadoras: DSc. Patrícia Campos Bernardes e DSc. Pollyanna Ibrahim Silva.

A pimenta rosa é o fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), uma planta nativa do Brasil. A extração e caracterização do seu óleo essencial viabiliza a sua utilização industrial. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da adição de óleo essencial de pimenta rosa em queijo Minas Frescal. Foram identificados 95,36% dos constituintes do óleo essencial, sendo o δ -careno-3 o componente majoritário. O óleo essencial de pimenta rosa apresentou características antioxidante ($2,53 \pm 0,28$ μ mol de trolox por mL de óleo) e inibitórias para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*. Foi observado, no teste de difusão em ágar, a formação do halo de inibição de $1,35 \pm 0,32$ cm, e na análise de concentração inibitória mínima, o valor de 3,13%. O óleo essencial é sensível à degradação no meio em que se encontra, portanto necessita de processos tecnológicos para assegurar sua ação. Para proteger o óleo essencial foi realizada a microencapsulação por meio da secagem por spray dryer. O óleo foi microencapsulado utilizando três formulações com diferentes concentrações de goma arábica, maltodextrina e amido modificado como papel de parede. As microcápsulas obtidas foram analisadas quanto às suas características físico-químicas e morfológicas e foi selecionada uma formulação para posterior adição ao queijo Minas Frescal. A formulação com 5% de amido modificado, 10% de maltodextrina e 5% de goma arábica foi selecionada. Para definição da concentração de óleo essencial que foi utilizada no queijo, foi realizado teste sensorial de ordenação-preferência, visto que a concentração inibitória mínima (3,13%) era muito alta para ser utilizada nos queijos. A formulação com 0,01% de óleo essencial foi a preferida e utilizada para fabricação dos queijos. Foram elaborados e caracterizados os queijos controle (CO) e o queijo com adição das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa (OEPR). Em relação às

características físico-químicas, os queijos CO e OEPR só apresentaram diferença significativa em relação à umidade ($P= 0,0021$; $\alpha= 0,05$). O queijo OEPR teve boa aceitação sensorial com média de aceitação global de $7,6 \pm 0,97$, não apresentando diferença significativa, ao nível de 95% de confiança, do queijo controle ($7,6 \pm 1,18$). Para avaliar a capacidade do óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado em inibir o desenvolvimento de *S. aureus*, foram inoculadas nos queijos CO e OEPR concentrações iniciais de 10^6 UFC.g⁻¹. Os queijos foram armazenados em estufa incubadora à temperatura de 4 ± 1 °C até realização das análises, que ocorreram nos tempos: 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias. Houve redução de 1,53 ciclos log no queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa após 30 dias. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o óleo essencial de pimenta rosa é uma alternativa viável de utilização em queijo Minas Frescal, devido ao seu potencial antioxidante, antimicrobiano e à sua aceitação sensorial.

ABSTRACT

Ribeiro, Alessandra Casagrande. Effect of microencapsulated essential oil of pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) addition on Minas Frescal cheese. (Dissertação Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre - ES. Advisor: Mirela Guedes Bosi. Co- Advisor: Patrícia Campos Bernardes e Pollyanna Ibrahim Silva.

Pink pepper is the fruit of the pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi), a native plant from Brazil. The extraction and characterization of its essential oil enables its industrial use. This work aimed to evaluate the effect of essential oil of pink pepper addition on Minas Frescal cheese. 95.36% of constituents of essential oil were identified, and δ -carene-3 was the major component. Pink pepper essential oil showed antioxidant (2.526 ± 0.277 $\mu\text{mols per ml Trolox oil}$) and inhibitory characteristics regarding the development of *Staphylococcus aureus*. It was observed in the agar diffusion test, the formation of inhibition zone of 1.35 ± 0.322 cm, and in the minimum inhibitory concentration analysis, the value of 3.13%. Essential oil is sensitive to degradation, so it requires technological processes to ensure its action. In order to protect the essential oil, it was microencapsulated with the use of a spray dryer. To microencapsulate it, three wallpaper formulations were developed using different concentrations of gum arabic, modified starch and maltodextrin. The microcapsules were analyzed according to their physical, chemical and morphological characteristics and a formulation was selected to be added to Minas Frescal cheese. The formulation with 5% modified starch, 10% of maltodextrin and 5% arabic gum was selected. In order to define the cheese essential oil concentration, it was conducted a sensory test-ordering preference, once the minimum inhibitory concentration (3.13%) was very high to be added to the cheese. The formulation with 0.01% essential oil was the most preferred. Control cheese (CO) and cheese with addition of pink pepper essential oil microcapsules (OEPR) were prepared and characterized. Concerning physico-chemical characteristics, CO and OEPR cheeses only differed on moisture. OEPR cheese presented good sensory acceptance. Global acceptance means were 7.6 ± 0.97 , with no significant difference ($p > 0.05$) compared to

control cheese (7.6 ± 1.18). To evaluate the effect of pink pepper essential oil on inhibiting the development of *S. aureus*, the oil was inoculated in CO and OEPR cheeses with initial concentrations of 10^6 CFU.g⁻¹. The cheeses were stored in incubator at temperature of 4 ± 1 °C during the period of time of analysis: 0, 3, 6, 9, 12, 15 and 30 days. Results showed reduction of 1.53 cycles log in cheese with the addition of pink pepper essential oil after 30 days. According to these results, pink pepper essential oil is a feasible alternative of addition in Minas Frescal cheese due to its antioxidant and antimicrobial potential, and its sensory acceptance.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	4
2.1	Objetivo geral	4
2.2	Objetivos específicos	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Queijo Minas Frescal	5
3.2	Gastroenterite estafilocócica	6
3.3	Pimenta rosa	8
3.4	Microencapsulação	11
3.4.1	Secagem por atomização	13
3.4.2	Material de parede	14
4	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Extração do óleo essencial de pimenta rosa	19
4.2	Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa	20
4.2.1	Composição química	20
4.2.2	Atividade antioxidante	21
4.2.3	Atividade antimicrobiana	23
4.3	Microencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa	24
4.4	Caracterização físico-química das microcápsulas	25
4.4.1	Atividade de água	26
4.4.2	Umidade	26
4.4.3	Higroscopicidade	26
4.4.4	Microscopia eletrônica de varredura	26
4.4.5	Difração de raios x	26
4.4.6	Cor	27
4.5	Elaboração do queijo Minas Frescal	27
4.6	Caracterização do queijo Minas Frescal	30
4.6.2	Análises microbiológicas dos queijos	32
4.6.3	Análises sensoriais	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Extração do óleo essencial de pimenta rosa	36

5.2	Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa.....	36
5.2.1	Composição química.....	36
5.2.2	Atividade antioxidante	38
5.2.3	Atividade antimicrobiana	39
5.3	Microencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa.....	42
5.3.1	Caracterização físico-química e morfológica das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa.....	42
5.3.2	Microscopia eletrônica de varredura	43
5.3.3	Difração de raios x.....	48
5.3.4	Cor.....	50
5.4	Elaboração e caracterização do queijo Minas Frescal.....	51
5.4.1	Acidez titulável e pH.....	52
5.4.2	Composição centesimal do leite e do queijo Minas Frescal	53
5.4.3	Análises microbiológicas	59
5.4.4	Teste de aceitação sensorial	62
6	CONCLUSÕES	66
5	PERSPECTIVAS FUTURAS	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O Minas Frescal é um queijo não maturado com elevada atividade de água (Aw) e alto teor de nutrientes. Estas características o tornam favorável para o desenvolvimento de microrganismos, o que pode causar riscos à saúde do consumidor. Dentre os microrganismos capazes de se desenvolver em queijo Minas Frescal, *Staphylococcus aureus* tem sido bastante pesquisado, pois neste produto há relatos de surtos causados por este microrganismo (ROCHA et al., 2006; SENGHER; BIZANI, 2011; SOARES et al, 2008; WALSTRA, 2006).

O uso de conservantes é uma alternativa á obtenção de produtos seguros do ponto de vista microbiológico. Porém, tem-se preferido produtos alimentícios com um mínimo de conservantes, o que tem levado os pesquisadores a buscar alternativas para atender a essa demanda. A adição de óleo essencial extraído de plantas (galhos, folhas e sementes), por suas propriedades antimicrobianas, é uma maneira encontrada para exercer esse controle (AZEVEDO et al., 2012; BURT, 2004; HOLLEY; PATEL, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; SOARES et al., 2008).

A pimenta rosa é o fruto da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Anacardiaceae e que possui outros nomes comuns como: aroeira-vermelha, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, araguaráiba, fruto-de-sabiá e árvore-da-pimenta (BAGIO, 1988; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Ocorre desde o Nordeste, passando pelos cerrados, chegando ao Rio Grande do Sul e estendendo pela Argentina e Paraguai. Seu plantio desponta como alternativa para a diversificação agrícola. A extração de seu óleo essencial viabiliza sua utilização industrial, conferindo sabor peculiar ao produto ao qual é adicionado (BAGIO, 1988; FAES e SENAR, 2009; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). No entanto, sua composição, atividade antimicrobiana e ação antioxidante precisam ser mais bem investigadas. Óleos essenciais de orégano, alecrim, louro têm sido usados com sucesso para controlar reações de oxidação em alimentos (OLMEDO et al., 2013; ARAÚJO, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A oxidação é um fenômeno natural que ocorre em alimentos e bebidas, sendo responsável por uma série de alterações que levam à perda do valor

nutricional, alteração das características sensoriais e formação de compostos tóxicos (ARAÚJO, 2011). Os efeitos da oxidação afetam a maioria dos componentes no alimento, incluindo micronutrientes e os macronutrientes. A utilização de substâncias químicas capazes de fornecer proteção contra a oxidação é uma alternativa para reduzi-la (ARAÚJO, 2011; BOROSKI et al., 2012; OLMEDO et al., 2013; TRAJANO; 2010). Os antioxidantes, além de retardar a rancidez oxidativa, protegem carotenoides, vitaminas e outros compostos insaturados. A atividade antioxidante está relacionada com estrutura e composição química e os óleos essenciais possuem compostos com características químicas propícias para atuarem como antioxidantes (ARAÚJO, 2011; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Dentre estes compostos estão os hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos.

Diversos constituintes químicos dos óleos essenciais são fotossensíveis e podem sofrer processos oxidativos nas condições ambientais. Além disso, estes compostos são de baixa massa molecular e apresentam grande volatilidade. Assim para utilizá-los torna-se necessário a aplicação de métodos que ajudem a preservar seus princípios ativos. A microencapsulação é uma técnica que permite a proteção dos princípios ativos contra reações de degradação e permite a liberação desses compostos de maneira controlada. Na microencapsulação, as substâncias nos estados sólido, líquido ou gasoso são revestidas por um agente encapsulante, obtendo partículas de dimensões microscópicas (ASCHERI et.al, 2003; BRASILEIRO, 2011).

Um dos processos mais utilizados para microencapsular partículas alimentícias é a secagem em Spray-Dryer. Nele, o óleo essencial de pimenta rosa ou outro material ativo a ser encapsulado é misturado ao material encapsulante formando uma emulsão. Ao ser atomizado dentro do secador, ocorre a evaporação do líquido do agente encapsulante com a formação da membrana ao redor das gotas do material ativo. O processo é dividido em três etapas: preparo de uma emulsão, homogeneização e atomização em câmara de secagem (DZIEZAK, 1988; GHARSALLAOUI et al., 2007). Esse processo apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos de encapsulação as propriedades e a qualidade do produto são mais eficientemente controladas; podem ser usados produtos sensíveis ao calor como óleos essenciais; há possibilidades de grandes

produções em operação contínua com equipamentos simples; produção de partículas relativamente uniformes e esféricas; boa eficiência e baixo custo do processo.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi produzir queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado, a fim de verificar o efeito do óleo essencial nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do queijo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição do óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado em queijo Minas Frescal nas suas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extrair o óleo essencial de pimenta rosa.
- ✓ Determinar a composição química do óleo essencial de pimenta rosa.
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa.
- ✓ Determinar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa para o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus*: teste de difusão em ágar e concentração inibitória mínima (CIM).
- ✓ Microencapsular o óleo essencial.
- ✓ Determinar as características físico-químicas e morfológicas das microcápsulas.
- ✓ Elaborar o queijo Minas Frescal com óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.
- ✓ Avaliar por meio de teste de ordenação-preferência o queijo Minas Frescal com diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.
- ✓ Determinar as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial microencapsulado.
- ✓ Verificar a eficiência do óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado em inibir o desenvolvimento de *S. aureus* no queijo Minas Frescal.
- ✓ Avaliar a aceitação sensorial do queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Queijo Minas Frescal

Segundo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para Leite e Derivados da Portaria nº 146 de 07/03/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

O queijo é o produto gelatinizado obtido pela agregação da caseína por ação de enzimas ou por alteração do pH. No processo tradicional de fabricação de queijo Minas é adicionada a enzima quimosina (renina) ao leite. Por ser um produto classificado como fresco, está pronto para o consumo logo após sua fabricação segundo mesma portaria do MAPA (BRASIL, 1996).

A alta atividade de água e composição nutricional o torna propício ao desenvolvimento de diversos microrganismos, inclusive bactérias patogênicas. A qualidade inicial do leite é a primeira condição a ser observada na produção de queijo, pois um número inicial elevado de bactérias patogênicas, não terá destruição eficiente pelos processos de beneficiamento. Todo o leite utilizado na fabricação de queijo Minas deverá ser pasteurizado. O desenvolvimento de bactérias em leite pasteurizado está relacionado com condições de armazenamento inadequadas: temperaturas superiores às estabelecidas pela legislação ou à prática higiênicas inaceitáveis (ROCHA; BURITI; SAAD, 2006; VIERA et al., 2008;).

Na microbiota capaz de se desenvolver no queijo Minas Frescal estão bactérias patogênicas, que podem causar infecção (ingestão de microrganismo que podem se multiplicar e disseminar em tecidos e órgãos) ou toxinfecção alimentar (pela ingestão de toxinas). Os sintomas dessas doenças alimentares

variam desde diarreia, vômitos, febre, flatulência até abortos. Alguns exemplos de bactérias que podem estar presentes no queijo Minas Frescal são: *S. aureus*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Listeria* spp (VIEIRA et al., 2008).

Por estar associado a infecções no úbere, *S. aureus* pode estar presente no leite cru e, devido a falhas no processo de fabricação, ser transmitido aos queijos (ASPERGER; ZANGERL, 2011). Pasteurização inadequada, ou utilização de leite cru no processamento dos queijos são possíveis maneiras desta contaminação ocorrer. Outra forma de contaminação seria através de manipulação inadequada. Os manipuladores nas fábricas de processamento de lácteos também podem ser hospedeiros deste microrganismo e, por falhas nos programas de boas práticas de fabricação, contaminar os queijos. Se houver produção de enterotoxinas haverá intoxicação estafilocócica (FOX, 1988; VIEIRA et al., 2008; WALSTRA, 2006).

A produção de alimentos seguros, que não causem danos à saúde do consumidor, é um dos alvos a serem alcançados pela indústria alimentícia. Portanto, aliado a boas práticas de fabricação, o uso de substâncias que reduzam o desenvolvimento microbiano, a oxidação de lipídios e com isso as alterações indesejáveis nos alimentos vem atender a essa demanda.

3.2 Gastroenterite estafilocócica

A gastroenterite estafilocócica é causada pela ingestão de alimentos que contenham uma ou mais enterotoxinas, produzidas por algumas espécies e linhagens de estafilococos. Embora a produção de enterotoxinas esteja associada a *Staphylococcus aureus* coagulase e tersonucleases (TNase) positivos, algumas espécies que não produzem estas enzimas podem produzir enterotoxinas (JAY, 2005).

S. aureus é um importante patógeno oportunista que tem impacto sobre a saúde humana. Embora seja conhecido por causar infecções de pele e dos tecidos moles, ele tem capacidade de infectar quase todos os sistemas e órgãos do corpo humano, muitas vezes com consequências fatais devido à variedade de seus fatores de virulência (BOSE; BAYLES, 2013). Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou estratégias que as bactérias utilizam para “driblar” o

sistema de defesa do hospedeiro e causar uma infecção. Alguns estão relacionados com a colonização do microrganismo e outros com as lesões causadas pelo organismo, por exemplo, as toxinas como é o caso do estafilococo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Staphylococcus* inclui mais de 30 espécies, sendo 18 delas de real e potencial interesse em alimentos. Dessas 18 espécies e subespécies somente 6 são coagulase positiva e produzem nuclease termoestável (TNase). Das coagulases negativas, 10 demonstraram capacidade de produzir enterotoxinas, mas não produzem nucleases, ou se produzem, elas são termosensíveis. Estafilococos produtores de enterotoxina, em particular, *S. aureus*, são provavelmente a principal causa de doença de origem alimentar em todo o mundo (ASPERGER; ZANGERL, 2011).

O desenvolvimento de *S. aureus* em alimentos está relacionado a casos de intoxicação alimentar pela ingestão de enterotoxina. Enterotoxinas são proteínas produzidas por algumas espécies de estafilococos. Geralmente os alimentos associados são: carne (bovina, suína e aves), e seus subprodutos (presunto, salsichas e salames), saladas com presunto ou frango ou batata, cremes de recheio de produtos panificados e produtos lácteos, com destaque para os queijos (APHA, 2001).

S. aureus é um patógeno associado a infecções em animais. (APHA, 2001). Ele pode colonizar e infectar a glândula mamária de vacas. A adesão ao epitélio escamoso e úmido é fundamental para colonização de *S. aureus* (FOSTER, 2011). Este microrganismo pode expressar uma série de proteínas de superfície, que interagem com a superfície das células epiteliais escamosas, e que contribuem para o processo infeccioso. Estas proteínas promovem a aderência à matriz extracelular, a evasão de respostas imunes e invasão das células epiteliais. Além disso, elas inibem a migração de neutrófilos e danificam as membranas das células hospedeiras, incluindo fagócitos.

Portanto o leite e produtos lácteos, especialmente os queijos, podem ser contaminados por este microrganismo quando não existem boas práticas de higiene, incluindo o controle de mastite; ou o leite não é pasteurizado adequadamente. Após a contaminação com estafilococos enterotoxigênico, a intoxicação alimentar pode acontecer quando o desenvolvimento abundante e

formação de enterotoxina ocorrem durante a produção e armazenamento destes produtos lácteos (ASPERGER; ZANGERL, 2011).

Devido às suas características e sua constituição química, o óleo essencial desponta como uma alternativa para controlar o desenvolvimento de microrganismos, além da oxidação de lipídios. Porém são necessários estudos que investiguem sua ação antimicrobiana, antioxidante e os efeitos de sua utilização em alimentos.

3.3 Pimenta rosa

A aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) é uma planta nativa do Brasil, pertencente à família Anacardiaceae e possui outros nomes comuns como: aroeira-vermelha, aroeira-de-remédio, aroeira-mansa, aroeira-branca, aroeira-da-praia, aroeira-do-sertão, araguaráiba, fruto-de-sabiá e árvore-da-pimenta (BAGIO, 1988; SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Ocorre desde o Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) passando pelos cerrados (Mato Grosso do Sul), região sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) chegando à região sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) e se estendendo pela Argentina e Paraguai (SILVA-LUZ; PIRANI, 2015). Seu plantio desponta como alternativa para a diversificação agrícola, pois é uma espécie que permite o sistema integrado de produção agroflorestal. A espécie florestal (aroeira) atua como elemento básico para amenização ambiental e diversificação da produção agrícola (BAGIO, 1988).

O fruto da Aroeira é conhecido como pimenta rosa, ou *poivre-rose* na França; *pink pepper* nos Estados Unidos da América. A pimenta rosa possui sabor peculiar, bastante apreciado na culinária internacional, sendo a produção nacional praticamente voltada para exportação. A pimenta rosa, por sua cor atrativa é utilizada para decorar pratos, conferindo-lhes requinte. Portanto os frutos com injúrias ou verdes são descartados. Uma alternativa para utilização destes frutos seria a extração do seu óleo essencial (BERTOLDI, 2006).



Figura 1: Pimenta rosa (Fonte FAES e SENAR, 2009)

Para conseguirem proteção contra inimigos potenciais tais como bactérias, fungos, vírus, nematoides, ácaros, insetos, mamíferos ou animais herbívoros, os vegetais desenvolveram sistemas de defesas. O primeiro nível de defesa envolve a superfície da planta (cutícula e periderme). O segundo nível está relacionado a um grupo de diversos compostos vegetais, existentes apenas no reino vegetal e conhecidos como metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Sabe-se que muitos produtos do metabolismo secundário têm funções importantes nos vegetais: eles agem como atrativos para polinização; protegem as plantas contra herbívoros e contra a infecção por microrganismos patogênicos, entre outras funções (TAIZ; ZEIGER, 2013). Apesar de não apresentar função direta no crescimento e desenvolvimento dos vegetais os metabólitos secundários geralmente desempenham papel fundamental nas funções vitais das plantas como: fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, síntese de proteínas, assimilação de nutrientes entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2013). Os metabólitos secundários podem ser divididos em 3 grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados.

Os óleos essenciais fazem parte dos metabólitos secundários, importante grupo de constituintes dos vegetais e são responsáveis pelos seus odores aromáticos característicos (BIZZO; HOVELI; REZENDE, 2009). Os óleos essenciais compreendem uma mistura complexa de hidrocarbonetos, alcoóis e compostos carbonílicos. Os hidrocarbonetos, por sua vez, são uma mistura de substâncias voláteis, os terpenos e em menor frequência, esquiterpenos

(ARAUJO, 2011; PAWLOWSKI et al., 2012). A extração do óleo essencial da pimenta rosa viabiliza sua utilização industrial, conferindo seu sabor ao produto ao qual é adicionado (BAGIO, 1988; BERTOLDI, 2006; FAES e SENAR, 2009; PAWLOWSKI et al., 2012).

Entre as diferentes classes de produtos naturais encontrados em óleos essenciais, os terpenos estão associados aos danos no processo de divisão celular, síntese de ATP e anormalidades cromossômicas o que pode estar envolvido no seu mecanismo antimicrobiano (PAWLOWSKI et al., 2012).

Outra característica que vem sendo associada aos óleos essenciais é a capacidade antioxidante. O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua inativação pelos sistemas de defesa do organismo. Está sujeito de ocorrer em todos os organismos expostos a ambientes oxigenados. O oxigênio atmosférico possui baixa energia de ativação inicial, porém durante o metabolismo do oxigênio, podem ser produzidas espécies altamente reativas causadoras de danos a biomoléculas. Em alimentos, isto pode provocar a oxidação de lipídios, pigmentos, vitaminas e proteínas, acarretando perda de sabor, descoloração e perda de nutrientes importantes, além de formação de compostos carcinogênicos. Logo os sistemas biológicos, animais e vegetais, desenvolveram diversas defesas antioxidantes, a fim de se proteger da oxidação (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DECKER, 2002).

Os alimentos que são derivados de diferentes tecidos biológicos contêm uma série de diferentes sistemas de defesa para prevenir os efeitos prejudiciais das espécies reativas do oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2^{\cdot}), hidroxila (OH) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Porém durante o processamento as espécies reativas podem aumentar levando a um descontrole oxidativo, resultando em perda de qualidade, diminuição de tempo de conservação e formação de compostos tóxicos. Para garantir a qualidade e segurança dos alimentos são adicionados antioxidantes aos alimentos processados (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DECKER, 2002).

Os antioxidantes utilizados em alimentos podem ser sintéticos ou naturais. Em geral os antioxidantes sintéticos são estruturas fenólicas, e os naturais são compostos fenólicos, quinonas, lactonas e os polifenóis. Nos mecanismos de

controle de oxidação de lipídios estão envolvidos os bloqueadores da reação em cadeia (doadores de hidrogênio) e os complexadores de metais. Os bloqueadores são classificados em dois grupos: doadores e receptores de elétrons (ARAÚJO, 2011). Os antioxidantes doadores de elétrons ou hidrogênio competem pelo radical formado, diminuindo a velocidade da reação de oxidação. A eficiência da atuação é dependente da estrutura química e estabilidade do radical formado. Os antioxidantes receptores de elétrons competem com o oxigênio triplete pelo radical livre, reduzindo a formação de radicais, principalmente o radical peróxil (ARAÚJO, 2011).

O segundo mecanismo envolve a complexação de metais, catalisadores da reação de oxidação de lipídios. É um mecanismo definido como preventivo, pois não ocorre interação entre radicais e sim complexação de íons metálicos, inibindo com isso a decomposição dos peróxidos (ARAÚJO, 2011).

A busca por uma alimentação mais saudável e “natural”, com o mínimo de conservantes ou aditivos sintéticos tem incentivado as pesquisas para encontrar aditivos ou antioxidantes eficazes e de baixo custo (DECKER, 2002). Além dos esforços para redução da deterioração oxidativa, busca-se o desenvolvimento de técnicas de processamento de alimentos que ajudem a preservar antioxidantes endógenos. Estes compostos também têm sido associados a benefícios para a saúde (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; DECKER, 2002).

Portanto o óleo essencial de pimenta rosa pode ser uma alternativa viável para o controle da oxidação de lipídios e do desenvolvimento de microrganismos, dentre estes o *S. aureus*, patógeno associado à toxinfecções alimentares.

3.4 Microencapsulação

Uma das grandes dificuldades tecnológicas em relação aos óleos essenciais é a preservação de suas características físico-químicas, sensoriais e aromáticas durante o processamento e estocagem, pois possuem grande parte dos componentes sensíveis ao calor e à oxidação, além de serem altamente voláteis. Além disso, os óleos essenciais podem reagir com outros ingredientes na formulação alterando suas propriedades (MÜLLER, 2011). A cor, o sabor e o odor originais dos alimentos geralmente são os mais afetados pelos métodos

tradicionais de processamento. Com isso, se torna necessário implantar métodos que preservam estas características, além de deixar componentes nutricionais mais bio-acessíveis. Uma maneira encontrada para a aplicação dos óleos essenciais é a microencapsulação.

Microencapsulação é o processo de empacotamento de materiais ativos (sólidos, líquidos ou gasosos), as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (REBELLO, 2009). As microcápsulas podem ser descritas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo. As microcápsulas são empregadas para melhorar o desempenho do material ativo ou possibilitar novas aplicações (ARSHADY, 1993).

A microencapsulação tem a função de preservar os componentes como aromas e vitaminas dos alimentos. A perda destes nutrientes traz prejuízos ao seu valor nutricional, além de afetar suas características sensoriais, transformando o alimento em um produto distante do produto original (REBELLO, 2009).

As microcápsulas têm a capacidade de modificar e melhorar a aparência e as propriedades de uma substância. Sua utilização visa a atender às necessidades específicas da indústria de alimentos como reduzir a reatividade do núcleo com o ambiente; facilitar a manipulação do material encapsulado; promover liberação controlada de determinadas substâncias; mascarar sabor e odor desagradáveis e promover a diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (REBELLO, 2009).

Além dos óleos essenciais, existem outros compostos para os quais a microencapsulação é utilizada, dentre os quais: pigmentos, compostos de sabor, nutrientes, enzimas, conservantes, acidulantes, probióticos, entre outros (MÜLLER, 2011).

Diversos métodos têm sido utilizados na elaboração das microcápsulas, tais como: spray drying ou secagem por atomização, coacervação, liofilização, secagem em leite em espuma, spray cooling, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leite fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão (REBELLO, 2009).

Conforme o tamanho, as cápsulas podem ser classificadas em 3 categorias: macro ($> 5000 \mu\text{m}$), micro ($0,2- 5000 \mu\text{m}$) e nano cápsulas ($< 0,2 \mu\text{m}$). As cápsulas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente centralizado, envolto em um filme bem definido de material de parede, caracterizando as “verdadeiras” microcápsulas; e aquelas nas quais o núcleo é disperso na região matricial, denominada as microesferas (PINTO, 2012).

3.4.1 Secagem por atomização

A secagem por atomização também conhecida como secagem por aspersão consiste na transformação do material do estado líquido para o sólido, através da dispersão de gotículas que entram em contato com ar quente dentro de uma câmara. Essa técnica é a mais utilizada pela indústria de alimentos. O material que deverá ser seco pode estar sob a forma de solução, suspensão, emulsão ou pasta. A microencapsulação por atomização conforme ilustrado na Figura 2, envolve as operações de emulsificação do material ativo com uma solução aquosa do material de parede, atomização dentro da câmara de secagem, seguida de secagem das gotículas atomizadas (ASCHELI, 1997).

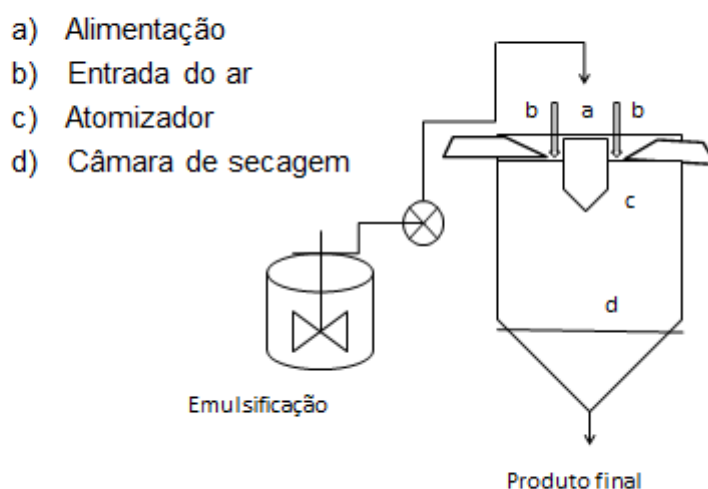


Figura 2: Esquema básico microencapsulação spray dryer (adaptação ASCHELI, 1997).

Como a evaporação da água acontece rapidamente, a temperatura dentro do núcleo não ultrapassa 100 °C, com temperaturas geralmente em torno de 60 °C, reduzindo a ocorrência de alterações indesejáveis nos compostos termossensíveis. Esta é considerada a principal vantagem da atomização (AZEREDO, 2005).

3.4.2 Material de parede

A seleção do material de parede adequado é crítica para o sucesso da microencapsulação. O material correto evita interações químicas, oxidação e volatilização do núcleo além de maximizar a retenção do óleo essencial após o processo de secagem. Os materiais de parede não devem reagir com o material ativo do núcleo e devem ser seguros para o uso em alimentos (AZEREDO, 2005; FERNANDES et al., 2014). Além disso, para encapsulação de óleos, os materiais de parede devem possuir capacidade de formar e estabilizar emulsões, proporcionando uma película em torno da superfície das gotículas de óleo da emulsão durante a homogeneização, formando uma barreira ao oxigênio, principal responsável pela oxidação (GARTI, 2008).

Existe uma grande variedade de materiais de parede utilizados para a microencapsulação. Polímeros naturais como proteínas (gelatina, proteínas do soro de leite, caseinato de sódio e proteína de soja), pequenas moléculas de hidratos de carbono (emulsionantes, amidos e amidos modificados, sacarose, glicose, lactose, maltodextrina), gomas (goma arábica, xantana, guar) entre outros (GARTI, 2008). Os polímeros naturais têm sido preferidos nestes aspectos, sendo compatíveis com formulações alimentícias (FERNANDES et al., 2014).

A goma arábica é considerada um excelente material de parede, mas problemas relacionados à utilização desse material têm levado a estudos que indiquem substitutos. Seu custo elevado e fornecimento limitado estão entre os principais problemas. O amido modificado e a maltodextrina tornaram-se uma alternativa viável para a substituição da goma arábica, devido à alta disponibilidade e baixo custo.

A goma arábica é um dos materiais mais utilizados para compor as paredes das microcápsulas (FERNANDES et al., 2014). É um biopolímero extraído de um arbusto, Acácia Senegal, encontrado principalmente na África. A goma arábica é uma mistura complexa de diferentes biopolímeros, com pelo menos três frações principais com alta massa molecular. Tem sido proposto que a fração surfactante ativa consiste em arabinogalactanos ramificados ligados à cadeia de um polipeptídeo. A cadeia polipeptídica tem grupos laterais hidrofóbicos, responsáveis pela sua adsorção dos lipídios na superfície. Já a outra porção hidrofílica dos blocos de arabinogalactano se posiciona na fase aquosa formando uma camada interfacial. A esta camada é creditada a estabilidade contra a agregação das gotículas, principalmente por meio de repulsão estérica, mas com alguma contribuição da repulsão eletrostática (KASAPIS, 2009; DICKISON, 2003).

No entanto, quando comparada a outros biopolímeros de superfície, a goma arábica tem baixa afinidade pelas interfaces óleo-água. É recomendada sua utilização em concentrações elevadas ou juntamente com outros biopolímeros para formação de emulsões estáveis (DICKISON, 2003; KASAPIS, 2009).

Problemas frequentes associados com variações de qualidade têm levado a pesquisas para investigar fontes alternativas de emulsificantes de biopolímeros para uso em alimentos (ASCHERI, 1997; ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003; FERNANDES et al., 2014; KASAPIS, 2009).

Os amidos naturais costumam ter pouca atividade de superfície por serem moléculas predominantemente hidrofílicas. No entanto, a sua modificação química irá produzir emulsionantes altamente eficazes. Geralmente esta modificação é feita anexando grupos laterais hidrofóbicos ao longo de suas estruturas (NILSSON; BERGENSTAHL, 2006; TRUBIANO, 1995). Estes amidos modificados são amplamente utilizados como emulsionantes na indústria de bebidas, frequentemente como uma alternativa ou substituição à goma arábica. Um dos amidos modificados mais utilizado é um derivado de octenilsuccinato de milho ceroso. O amido modificado consiste principalmente em amilopectina quimicamente modificada para conter grupos laterais aniônicos e não polares (ASCHERI, 1997; I; ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003; FERNANDES et al., 2014).

Estes grupos laterais apolares se prendem às superfícies das gotículas lipofílicas, enquanto as cadeias de amido polares posicionam direcionadas para a fase aquosa (KASAPIS, 2009), característica fundamental de um bom emulsificante. Estas cadeias de amido poliméricas hidrofílicas protegem as gotículas da coalescência, através principalmente de repulsão estérica; embora a repulsão eletrostática também possa desempenhar algum papel. Esta modificação também confere ao material excelente capacidade de retenção de voláteis durante a atomização no atomizador (ROCHA et al., 2012) .

Como o mecanismo dominante de estabilização das emulsões adicionadas de amido modificado é a repulsão estérica, estas se tornam resistentes a alterações do pH, a força iônica e temperatura (CHANAMAI; MCCLEMENTS, 2002).

Da mesma maneira que a goma arábica, o amido modificado possui baixa atividade interfacial quando comparado com proteínas ou agentes tensoativos. Por isso deve também ser usado em grandes concentrações (recomenda-se 1:1 a proporção de amido e óleo nas emulsões óleo em água) para garantir que todas as superfícies das gotículas sejam revestidas adequadamente (KASAPIS, 2009).

A maltodextrina é qualificada como um polímero sacarídeo não doce, que consiste em unidades de D-glicose ligadas principalmente por cadeias α -1,4 com dextrose equivalente (DE) menor que 20. Apresenta-se em pó branco ou solução concentrada obtida a partir da hidrólise parcial do amido com ácido ou enzimas. A sua utilização como material de parede de ingredientes alimentícios tem sido pesquisada, pois oferece vantagens em relação a outros materiais de parede: custo relativamente baixo, aroma e sabor neutros, baixa viscosidade em altas concentrações de sólidos e uma boa proteção do núcleo contra reações de oxidação. A sua limitação ao uso está relacionada à sua baixa capacidade de emulsificação e retenção de compostos voláteis, sendo recomendada a sua utilização com outros materiais de parede (FERNANDES et al., 2014).

Entre suas propriedades funcionais podemos destacar a capacidade de formação de película em torno do material ativo, protegendo-o; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade e boa dissolução em água, facilitando com isso a reidratação do material encapsulado. À medida que se aumenta o número de dextroses equivalentes da maltodextrina aumenta-se sua higroscopicidade,

porém, sua viscosidade diminui (ASCHERI, 1997; I; ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003).

Este estudo avaliou o efeito de goma arábica, amido modificado e maltodextrina na composição, características físico-químicas e morfologia das micropartículas de óleo essencial de pimenta rosa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram divididas em três etapas: Etapa 1 – Extração e caracterização do óleo essencial de pimenta rosa; Etapa 2 – Microencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa; Etapa 3 – Fabricação do queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado juntamente com sua caracterização físico-química; análises microbiológicas e teste de aceitação sensorial do produto elaborado.

A representação esquemática com as etapas do estudo e suas respectivas fases é mostrada na Figura 3.

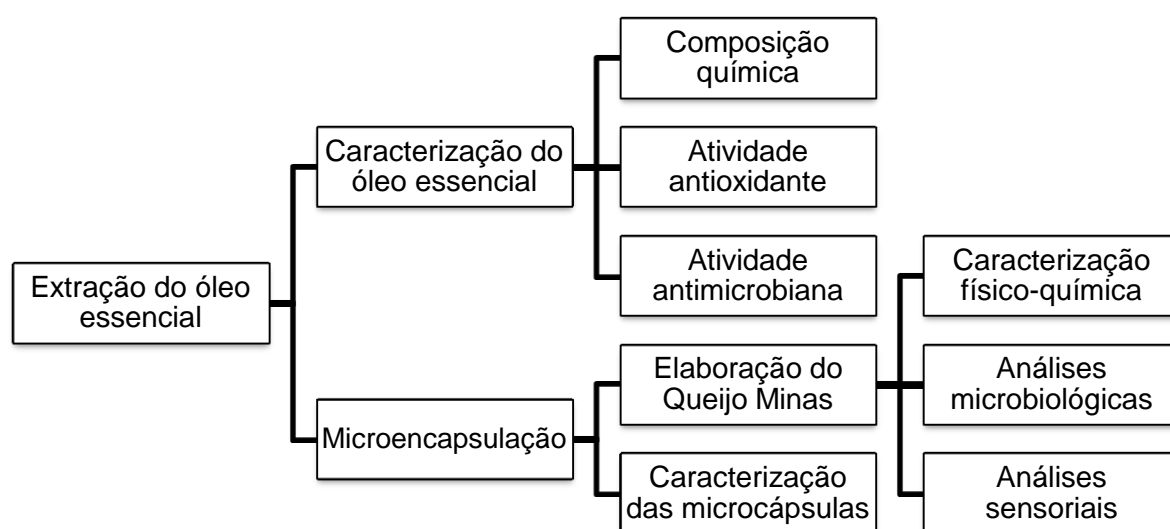


Figura 3: Representação esquemática das atividades realizadas no experimento

Para caracterização do óleo essencial de pimenta rosa, o experimento foi conduzido segundo delineamento inteiramente casualizado com três repetições;

sendo todas as análises foram realizadas em duplicata. Foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Excell® e o programa estatístico SAEG (2007) DEMO.

Para a caracterização das microcápsulas o delineamento foi inteiramente casualizado com três repetições. As análises foram realizadas em duplicata e foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão. Os resultados foram analisados utilizando a Análise Estatística Univariada (ANOVA) para verificar a existência de diferença significativa e por fim foi realizado teste de comparação de médias, Tukey, à nível de 95 % de confiabilidade para verificar a existência de diferença entre as três formulações de microcápsulas.

A caracterização físico-química, microbiológica e sensorial dos queijos produzidos também ocorreu sob o delineamento inteiramente casualizado com três repetições e todas as análises foram realizadas em duplicata e tiveram calculadas as médias e os respectivos desvios padrão. Os dados médios da composição centesimal do queijo Minas Frescal com microcápsulas de óleo essencial e controle foram comparados, utilizando o teste t ao nível de 95% de probabilidade e os resultados analisados para se verificar a existência de diferença significativa entre os tratamentos. Para avaliação dos dados microbiológicos em relação ao tempo foram calculadas médias e desvios padrão. Os resultados obtidos pelo teste de ordenação-preferência foram analisados pelo teste de Friedman ao nível de 5 % de probabilidade, utilizando-se a Tabela de Newel e McFarlane, conforme Minim (2011). Os resultados da aceitação sensorial foram tabulados e as médias obtidas foram comparadas, utilizando o teste t ao nível de 5 % de probabilidade. Os resultados foram analisados para se verificar a existência de diferença significativa entre os tratamentos.

4.1 Extração do óleo essencial de pimenta rosa

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Operações Unitárias do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES.

Os frutos “in natura” foram fornecidos pela empresa AgroRosa Ltda, exportadora de pimenta rosa, localizada na cidade de São Mateus, ES. Esses

frutos foram selecionados e desidratados pela mesma empresa, utilizando equipamentos eletrônicos, segundo sua densidade e coloração, sendo que frutos verdes, pretos e de alta densidade foram excluídos do processo de secagem. Os frutos recebidos foram embalados em sacos de polietileno de alta densidade e armazenados à temperatura ambiente, em local seco e arejado até sua utilização.

O óleo essencial de pimenta rosa foi extraído por hidrodestilação, utilizando um sistema Clevenger. Os frutos foram moídos em moinho Cadence (MDR301) para facilitar a extração e colocados em balão volumétrico de 2000 mL, na proporção de 450 g de frutos moídos para 1200 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até ebulição, e após condensação, o óleo separou-se da água devido à diferença de densidade. Após três horas de extração, o óleo foi recolhido do sistema de Clevenger para um balão de decantação. Com ajuda de uma pipeta de Pasteur, o óleo foi retirado do balão e colocado em tubo de centrifugação. Em seguida, o óleo foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos utilizando centrífuga Fanem/Excelsa II® e armazenado à temperatura de 5 ± 1 °C, em frasco âmbar envolto em folha de alumínio.

4.2 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa

O óleo essencial foi caracterizado quanto à sua composição química, atividade antioxidante e ação antimicrobiana para o microrganismo *S. aureus*.

4.2.1 Composição química

A determinação da composição química do óleo essencial de pimenta rosa foi realizada na Central Analítica, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES.

O óleo essencial obtido foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS), utilizando aparelho modelo QP-PLUS-2010 (SHIMADZU). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária Rtx-5MS, de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As condições operacionais foram: fluxo de gás de arraste (He) de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura do injetor e do detector de 220 °C e 300 °C respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi 60 °C aumentando de 2 °C

por minuto até 240 °C, permanecendo constante por 30 minutos. Injetou-se 1 µL de cada amostra preparada a partir de 10 µL de óleo essencial de pimenta rosa, diluído em 1 mL de hexano (ADAMS, 2007).

A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa obtidos experimentalmente com o banco espectral Wiley, 7ª Edição ou por comparações dos espectros de massas obtidos com os existentes na biblioteca NIST e também pelo índice de retenção relativo (ADAMS, 2007).

A quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa em equipamento SHIMADZU GC-2010 Plus, equipado com detector de ionização de chama (CG-DIC) de acordo com métodos descritos por PINHEIRO et al. (2013) e Rondelli et al. (2012). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio e a coluna capilar Rtx-5MS, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 240 °C e 250 °C, respectivamente. Uma quantidade de 10 mg da amostra foi diluída em diclorometano (1 mL) e injetou-se 1 µL da mistura.

4.2.2 Atividade antioxidante

O Laboratório de Química de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES foi utilizado para determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa.

Para o ensaio ABTS foi utilizado o trolox como referência. Dentre os métodos antioxidantes utilizados “in vitro”, optou-se pelo ensaio ABTS (2,2-azinobis 3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato), segundo adaptação do método descrito por Re et al. (1999). A atividade antioxidante do óleo essencial foi determinada pela descoloração do ABTS, medindo a redução do cátion radical (ABTS^{•+}) como porcentagem da inibição da absorbância a 734 nm.

A diminuição da absorbância do radical ABTS^{•+} produzido pela oxidação ABTS pela amostra é proporcional à concentração de substâncias antioxidantes presentes, e está representado pelas equações 2 e 3.



$$\lambda_{\text{max}} = 734 \text{ nm}$$

Para a determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa foi utilizada uma solução estoque de ABTS (7 mM). Para o seu preparo foram necessários 0,0979 g de ABTS e água destilada para completar o volume de balão volumétrico de 25 mL. Em seguida, preparou-se a solução de persulfato de potássio (2,45 mM), em que foram utilizados 0,1672 g de persulfato de potássio e água destilada completando um balão volumétrico de 250 mL. Para o preparo do radical misturaram-se 10 mL da solução estoque de ABTS e 10 mL de solução persulfato de potássio, deixando reagir por 16 horas no escuro. A diluição do radical foi realizada ajustando a sua absorbância a 0,700; por meio da adição de álcool absoluto.

Para construção da curva analítica foram utilizadas as concentrações de 200 μ M, 150 μ M, 130 μ M, 110 μ M, 90 μ M, 70 μ M, 50 μ M, 30 μ M, 10 μ M e 0 μ M da solução padrão de trolox. Para todas as diluições foi utilizado álcool absoluto.

Em tubos de ensaio coletou-se 0,5 mL da amostra de cada concentração e foram adicionados 3,5 mL de radical ABTS, colocando-se para reagir por 6 minutos envoltos de folha de alumínio e no escuro. Após este tempo foi feita a leitura em espectrofotômetro a 734 nm. A partir dos valores obtidos construiu-se uma curva com linha de tendência linear e observou-se o R^2 .

Após ajustar a curva padrão, o óleo essencial de pimenta rosa foi adicionado, em balão volumétrico, nos volumes de 0,5 mL; 0,3 mL e 0,1 mL completando-se o balão para 10 mL de álcool absoluto. Logo em seguida, transferiu-se 0,5 mL de cada balão para tubos de ensaio e foi adicionado radical ABTS deixando reagir por 6 minutos, envoltos em folha de alumínio e no escuro. Após este tempo, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 734 nm e foi analisado se os valores obtidos estavam dentro dos pontos da curva padrão.

Os cálculos para determinação da atividade antioxidante foram feitos com base na equação do gráfico da curva padrão e na quantidade de óleo essencial utilizada para redução do radical ABTS' em cada amostra, considerando as diluições realizadas, sendo os valores obtidos expressos em μ mols de trolox por mL de óleo essencial.

4.2.3 Atividade antimicrobiana

A determinação da ação antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre. Foram utilizadas cepas de *S. aureus*, ATCC 6538, provenientes da coleção do mesmo Laboratório.

A cepa utilizada foi estocada durante toda a realização do experimento sob refrigeração ($3,0 \pm 1,0$ °C) em ágar nutriente. Para a ativação e utilização das cepas, foi transferida uma alíquota para tubos de ensaio ou tubos Falcon contendo caldo infusão cérebro e coração (BHI). Foi realizado um repique neste meio de cultura com incubação a 37,0 °C, por 24 horas para ativação da cultura. Para a padronização do número de células utilizou-se método descrito por Valeriano et. al (2012). As cepas foram inicialmente inoculadas em tubo de ensaio ou tubo Falcon contendo 7 mL do caldo infusão cérebro e coração (BHI) incubados a 37 °C. Em seguida, a partir do BHI, foram realizadas estrias simples para verificação da morfologia do microrganismo. A cultura foi estriada em placas contendo PCA e incubada a 37 °C por 24 horas.

Para determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa foi utilizado o método de difusão em ágar segundo adaptação do método de Pimentel Filho (2010). O meio de cultura utilizado foi o Mueller Hinton (MH). A partir das colônias isoladas em PCA foi feita uma suspensão de *S.aureus* em solução salina. A suspensão na concentração de aproximadamente 1×10^8 UFC.mL⁻¹ foi espalhada sobre a superfície das placas com o meio de cultura. Para verificar a concentração de microrganismos era utilizado o padrão MC Farland 0,5. Em seguida, 10 µL do óleo essencial de pimenta rosa foram transferidos para os discos. Para se comparar os halos obtidos foi utilizado como controle negativo do crescimento bacteriano a mistura de antibióticos: sulfato de neomicina, sulfato de paromicina, ácido nalidíxico. Para controle positivo utilizou-se água destilada. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas e após esse período, os halos de inibição formados foram medidos com o auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado com três repetições e os resultados expressos como a

média e o desvio padrão das médias dos três valores. A atividade inibitória foi caracterizada pela medida do halo de inibição.

Para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o método de microdiluição em placas de Elisa. Nas placas de Elisa de fundo U foram depositados na fileira A 100 µL de BHI duplo concentrado com 0,1% de tween 80®, 100 µL de óleo essencial de pimenta rosa e 100 µL do inóculo diluído a $1,0 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Na fileira B transferiram-se 100 µL da fileira A, 100 µL do caldo BHI concentração normal com 0,1% de tween 80® e 100 µL do inóculo, na fileira C transferiram-se 100 µL da fileira B, o caldo BHI de concentração normal com 0,1% de tween 80® e 100µL do inóculo, dessa forma transferindo-se para a fileira seguinte até a fileira H os mesmos compostos, ou seja, reduziu-se a concentração de óleo essencial de uma fileira para outra em 50%. Após completar os poços com caldo BHI e óleo essencial foi adicionado o inóculo de *S. aureus* de forma que cada poço ficasse com uma concentração de 5×10^5 UFC.mL⁻¹. Para leitura do branco, os poços foram adicionados apenas de meio de cultura e óleo essencial. Foram feitos controles positivos para o crescimento de microrganismo e controles para verificar a esterilidade dos meios de cultura. As leituras foram feitas em leitor de Elisa Thermo Scientific®, a 600 nm, nos intervalos de trinta minutos nas quatro primeiras leituras, nas 12 seguintes foram feitas de hora em hora. Ao final da análise a menor concentração que apresentou atividade inibitória observada pela medida de absorbância foi definida como CIM.

4.3 Microencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa

Antes da sua utilização nos queijos, o óleo essencial de pimenta rosa foi microencapsulado segundo adaptação do método descrito por Ascheri; Marquez; Martucci, (2003) utilizando o método físico de secagem por spray dryer. Essa etapa ocorreu no Laboratório de Operações Unitárias do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre.

Os materiais escolhidos para utilização neste experimento foram a goma arábica, amido modificado e maltodextrina, devido às suas propriedades como excelentes agentes microencapsulantes de óleos essenciais. A solução do

material de parede (goma arábica, maltodextrina, amido modificado e água), nas suas devidas proporções (Tabela 1), foi preparada no dia anterior do preparo da emulsão e mantida por 8-12 horas, à temperatura ambiente, para assegurar saturação das moléculas dos polímeros. Para o preparo da emulsão, o óleo essencial de pimenta rosa foi adicionado progressivamente à solução do material de parede sob agitação constante (3500 rpm/ 10 minutos) utilizando um liquidificador Walita® RI2044. A emulsão foi utilizada como líquido de alimentação no processo de secagem por pulverização.

Foram utilizadas três combinações de goma arábica; maltodextrina e amido modificado conforme Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Formulações utilizadas para microencapsulação.

Ingrediente (%)	Fo1	Fo2	Fo3
Goma arábica	10		5
Maltodextrina	10	10	10
Amido modificado	-	10	5
Óleo essencial	5	5	5
Água	75	75	75

Fonte: adaptado Ascheri et al. (2003)

A secagem ocorreu nas seguintes condições: temperatura de entrada do ar de 175 °C, temperatura de saída do ar menor que 60 °C e vazão do líquido de alimentação de 0,8 L/h. A quantidade de óleo nas emulsões foi de 5%. Foram realizadas análises para caracterização físico-química e morfológica das microcápsulas conforme descrito no item abaixo, 4.4.

4.4 Caracterização físico-química das microcápsulas

Foram realizadas as seguintes análises nas microcápsulas obtidas: umidade, atividade de água, higroscopicidade, microscopia eletrônica de varredura, difração de raio x e cor.

4.4.1 Atividade de água

A atividade de água (A_w) foi mensurada por meio de leitura direta no equipamento Labmaster, Novasina, com temperatura controlada de $25 \pm 0,5$ °C.

4.4.2 Umidade

A determinação da umidade das microcápsulas foi realizada pelo método gravimétrico (perda por dessecação à temperatura em 105°C, até obtenção de massa constante segundo AOAC, 2005).

4.4.3 Higroscopicidade

A higroscopicidade foi determinada segundo adaptação do método proposto por Fernandes; Borges; Botrel, 2013. As amostras de pó de cada tratamento (aproximadamente 1 g) foram colocadas em dessecador com uma solução saturada de NaCl (75,29% de umidade relativa) a 25 °C. Após uma semana, as amostras formam pesadas, e a higroscopicidade expressa como g de umidade absorvida por 100 g de sólidos secos (g/100 g).

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Microscopia do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

As análises microscópicas foram conduzidas com algumas modificações do método descrito por Binning et al. (1986), citado por Ferreira (2006). Os pós (microcápsulas) foram fixados em uma fita adesiva dupla-face, montada em bases com 1 cm diâmetro e 1 cm de altura, revestidos com ouro sob vácuo e examinados no microscópio eletrônico de varredura. O microscópio foi operado a 20 KV e foram feitas ampliações de 800-20.000 vezes.

4.4.5 Difração de raios x

As análises de difração de raios x foram realizadas no Laboratório de Difração de raios X do Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

Para obter informações acerca da estrutura (cristalina ou amorfa) das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa, foi utilizado o difratômetro de raios X da marca Bruker , modelo D8 Discover , com radiação de cobre a 40 KV, 30 mA, velocidade de varredura de 1°/seg sob ângulo 2 Θ variando de 4 a 45°.

4.4.6 Cor

Devido à importância da cor para aceitação dos produtos pelos consumidores foram realizadas análises de cor nas microcápsulas com auxílio de um colorímetro KONICA MINOLTA® (modelo: CM-5) em sistema tridimensional L*, a* e b*, em que L* indica a luminosidade, que varia do preto (I* = 0) ao branco (I* = 100), a* consiste no eixo que varia do vermelho ao verde, e b* varia do amarelo ao azul. Além disso, foram observados os valores de h (ângulo de tonalidade 'cromática), c* (saturação de cor).

As amostras de cada formulação (Fo1, Fo2 e Fo3) foram devidamente colocadas em placas de acrílico e levadas à porta de reflectância do colorímetro para leitura. As leituras foram realizadas em duplicata.

4.5 Elaboração do queijo Minas Frescal

A elaboração e a caracterização físico-química, sensorial e microbiológica do queijo Minas Frescal foi realizada nos laboratórios de Tecnologia de Produtos Agrícolas (TPA), Química de Alimentos, Análise Sensorial e Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em Alegre, ES.

O leite utilizado no processamento foi proveniente da área experimental do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado em Rive-Alegre, ES. O leite, ao ser recebido no Laboratório de Tecnologia de Produtos Agrícolas (TPA), passou por análises físico-químicas de determinação da acidez titulável e pH. Foi coletada uma amostra para realização posterior das análises de proteínas, gordura, extrato seco total (EST) e cinzas.

O leite foi então pasteurizado (65 °C por 30 minutos). O queijo foi fabricado por coagulação enzimática do leite com adição de cloreto de cálcio (0,02% em relação ao volume de leite), ácido láctico (0,04%) e coalho (0,1%).

Os queijos foram salgados após a dessoragem, antes da enformagem. Para o queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado, a adição ocorreu juntamente com o sal. Foi utilizada a concentração de óleo essencial de pimenta rosa que teve preferência no teste de ordenação descrito no item 4.6.1. Na Figura 4 é apresentado o fluxograma do processo de fabricação do queijo.

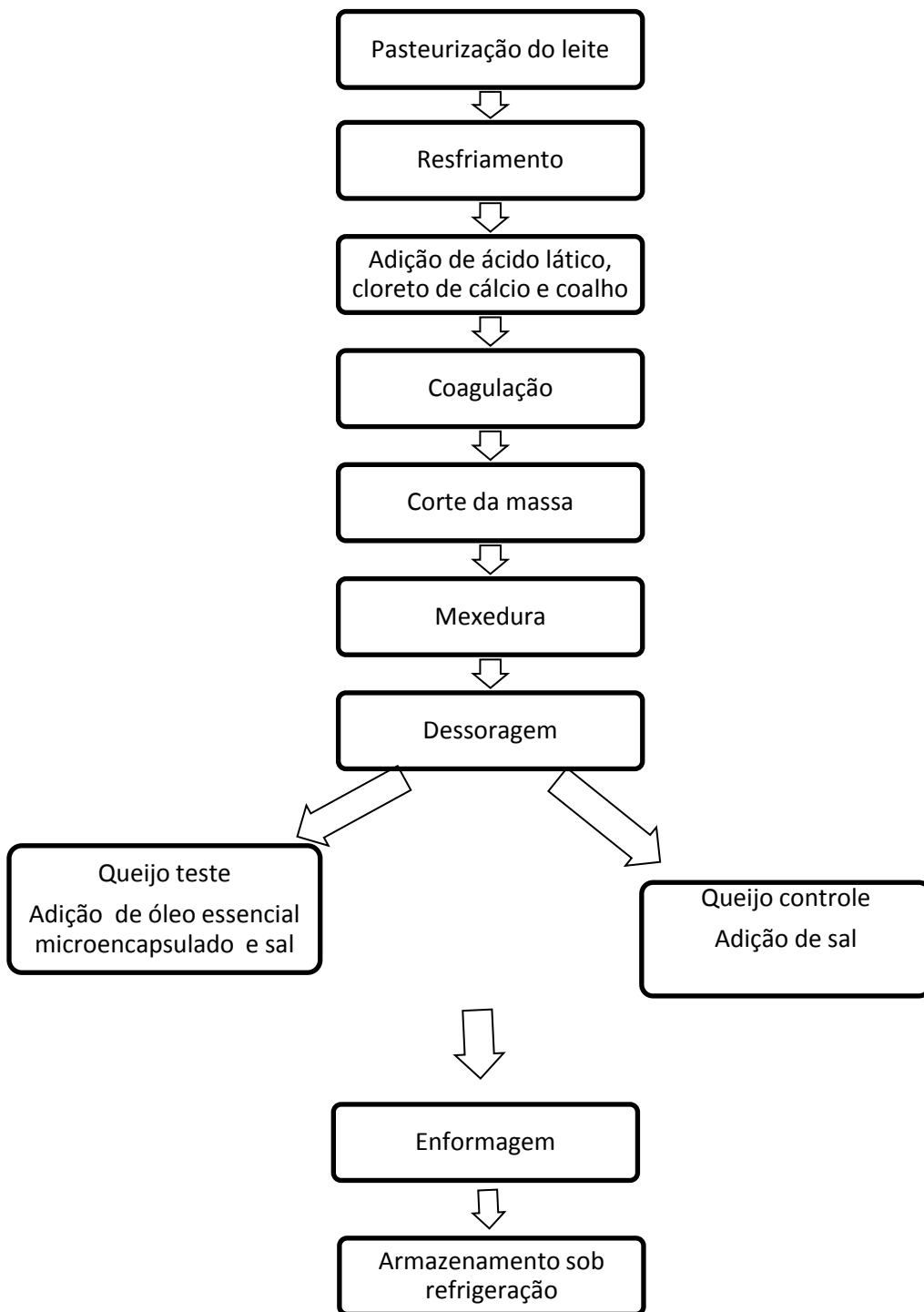


Figura 4: Fluxograma da fabricação do queijo Minas Frescal com e sem adição de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.

4.6 Caracterização do queijo Minas Frescal

4.6.1 Análises físico-químicas

Foram realizadas no leite utilizado nos três processamentos e nos queijos produzidos análises de acidez titulável e pH e composição centesimal para sua caracterização.

4.6.1.1 Acidez titulável e pH

A acidez titulável foi determinada com a titulação da amostra de leite, utilizando solução Dornic (solução de hidróxido de sódio na concentração de 0,111N) como titulante, na presença do indicador fenolftaleína (solução de fenolftaleína na concentração de 1 %). O resultado foi expresso em porcentagem de ácido láctico (AOAC, 2005).

O pH foi medido em pHmetro digital de bancada ION LAB® (modelo: pH B500), segundo metodologia indicada pela AOAC (2005).

4.6.1.2 Composição centesimal do leite e queijo Minas Frescal

Para determinação da composição centesimal do leite utilizado no processamento dos queijos foram realizadas as análises de: extrato seco total, teor de gordura, proteína, cinzas e carboidratos.

A análise de extrato seco total do leite e umidade do queijo Minas Frescal foram determinadas com a secagem em estufa a 105 °C (± 2 °C) até massa constante. Para a análise do leite, foram utilizados 5 mL da amostra misturado a 10 gramas de areia purificada, e para a análise do queijo, foram utilizados 5 g da amostra (AOAC, 2005).

O teor de gordura do leite e dos queijos foi determinado pelo Método de Gerber, o qual se baseia na digestão total dos componentes orgânicos, exceto a gordura, por meio da adição de ácido sulfúrico, álcool isoamílico; utilizando para o leite butirômetro de leite e para o queijo butirômetro de queijo, com sua posterior centrifugação. A leitura da camada amarelo-clara, obtida após a centrifugação, foi feita dentro da escala graduada dos butirômetros que corresponde à porcentagem de gordura da amostra (AOAC, 2005).

O teor de proteína foi determinado segundo o teor de nitrogênio total da amostra, obtido pelo método de Kjeldahl, que se baseia na digestão com ácido sulfúrico do nitrogênio da amostra, transformando-se em sulfato de amônio, o qual segue para a etapa de destilação com liberação da amônia. A amônia liberada é fixada em uma solução ácida e, posteriormente, titulada. O valor total de proteína na amostra de leite é determinado pela multiplicação da porcentagem de nitrogênio total pelo fator de correção 6,38 (AOAC, 2005).

O teor de cinzas obtido por incineração foi determinado com a transferência de 5g (massa exata) da amostra para um cadinho, previamente aquecido a 550 °C (± 10 °C). Em seguida, o cadinho com a amostra seca foi carbonizado em chapa aquecedora e incinerado em mufla a 550 °C (± 10 °C), até que o material se tornou branco ou cinza claro. O material foi colocado em dessecador por cerca de 20-30 minutos para esfriar e pesado novamente (AOAC, 2005).

A quantificação do teor de carboidratos do leite foi realizada por diferença de acordo com a seguinte equação: Carboidrato (%) = % Extrato Seco Total – (% Gordura + % Proteína + % Cinzas) (AOAC, 2005).

4.6.1.3 Cor

Foram realizadas medidas de cor nos queijos segundo mesmo método descrito no item 4.4.6. Cada amostra de queijo Minas Frescal controle (CO) e adicionado de óleo essencial de pimenta rosa (OEPR) foi devidamente colocada em placa de acrílico e levada à porta de reflectância do colorímetro para leitura. As leituras foram realizadas em duplicata para cada processamento. Foram calculadas as médias e desvios padrão de cada parâmetro avaliado.

4.6.1.4 Perfil de textura instrumental (TPA)

O perfil de textura instrumental dos queijos CO e OEPR foi determinado com auxílio do Analisador de Textura Brookfield[®] (Modelo CT3), segundo adaptação do método descrito por Maruyama et al., 2006. As análises foram realizadas em duplicata no terceiro dia de fabricação. Foi realizado teste de dupla compressão, utilizando probe cilíndrico de acrílico com 25 mm de diâmetro, realizando compressão de 80% da altura inicial. A velocidade empregada no teste e no pré-teste foi de 2 mm.s⁻¹ e no pós teste de 10 mm.s⁻¹. Os queijos estavam

armazenados sob refrigeração até o momento da análise. Foram retirados pedaços com as seguintes dimensões: altura de 3,5 cm; comprimento 2,0 cm e largura 1,0 cm.

As amostras foram analisadas à temperatura ambiente (25 °C) e os parâmetros de textura determinados foram: dureza, coesividade, gomosidade e elasticidade. A coleta dos dados e a construção das curvas de perfil de textura foram realizadas com auxílio do software Texture Pro CT V 1.4 Build 17.

4.6.2 Análises microbiológicas dos queijos

Foi inoculado *S. aureus* nos queijos objetivando verificar o efeito do óleo essencial em inibir o seu desenvolvimento. As cepas utilizadas foram cultivadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas em B.O.D. a 37 °C. Os estoques foram iniciados a partir das culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) em caldo BHI e estriadas em ágar padrão para contagem (PCA).

As células foram coletadas por centrifugação a 3000 g por 15 minutos, lavadas em solução salina peptonada 0,1% e ressuspensas em soro de leite drenado durante a produção do queijo. Foi feita uma série de diluições seriadas em soro de leite e as bactérias foram adicionadas à massa do queijo (contagem inicial 1×10^5 UFC.g⁻¹). A massa foi homogeneizada manualmente por 2 minutos e enformada. Os queijos com aproximadamente 100 g foram para incubadora B.O.D. a 4 °C, em embalagens plásticas esterilizadas. Paralelamente, foi realizado tratamento controle, sem adição de óleo essencial.

Para a contagem de *S. aureus*, coliformes e fungos filamentosos e leveduras nos queijos controle (CO) e adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR) foram coletadas amostras de 11g de cada queijo devidamente homogeneizados em 99 mL de solução salina peptonada 0,1%. Estas amostras foram devidamente diluídas e plaqueadas.

Foi utilizado Petrifilm específico para contagem de *S. aureus* (placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem Rápida de Staphylococcus 6490), *Escherichia coli*, (placa 3M™ Petrifilm™ para contagem de *E. coli*/coliformes 6404) e coliformes totais (placa 3M™ Petrifilm™ para contagem de coliformes 6416). Para a contagem de fungos e leveduras foi utilizado o meio de cultura ágar batata glicose

2%, acidificado até pH próximo a 3,5. A incubação foi de 25 ± 1 °C por 7 dias. Para acidificação foi utilizado ácido tartárico 10%.

A contagem de coliformes totais, *Escherichia coli* e fungos e leveduras ocorreu no tempo 0. A contagem de *S. aureus* ocorreu nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias. Os resultados foram expressos em UFC.g⁻¹ de queijo.

4.6.3 Análises sensoriais

4.6.3.1. Teste de ordenação-preferência

O teste de ordenação foi realizado para verificar a formulação mais preferida pelos julgadores, a fim de definir a concentração de óleo essencial de pimenta rosa do queijo Minas Frescal. Foi realizado segundo método descrito por Carneiro e Minim (2010), no Laboratório de Análise Sensorial do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, em cabines individuais à temperatura ambiente.

Para o teste de ordenação-preferência, participaram 73 julgadores não treinados. Foi apresentada aos julgadores, uma bandeja com uma série de 4 amostras codificadas com números aleatórios de três dígitos, de maneira casualizada e balanceada juntamente com uma ficha de avaliação conforme Figura 5. Estas amostras tiveram as seguintes concentrações de óleo essencial: 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%, denominadas FA, FB, FC e FD, respectivamente. As amostras foram servidas em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta e colocados em pratos descartáveis. Foi solicitado aos julgadores que analisassem sensorialmente as amostras e as ordenassem de acordo com a sua preferência, marcando sua resposta na ficha de avaliação. A amostra mais preferida deveria receber o número 1; 2 para a segunda mais preferida, e assim sucessivamente.

NOME: _____ DATA: ____/____/____

SEXO: () F () M

Por favor, prove as amostras codificadas da esquerda para a direita. Ordene-as de acordo com a sua preferência, colocando o número 1 para a preferida, o número 2 para a segunda preferida etc., em frente ao código da amostra. Após experimentar cada amostra coma um pedaço de biscoito e enxague a boca com água. Espere trinta segundos entre cada avaliação.

CÓDIGO	ORDEM DE PREFERÊNCIA
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Comentários: _____

Figura 5: Ficha para o teste de ordenação-preferência (adaptação Minim, 2010)

4.6.3.2. TESTE DE ACEITAÇÃO

Os queijos produzidos foram submetidos a testes de aceitação sensorial. Participaram 69 julgadores não treinados que avaliaram os seguintes atributos: aparência, sabor, textura e impressão global.

Os testes de aceitação foram realizados segundo metodologia descrita por Reis e Minim (2010) no Laboratório de Análise Sensorial da Universidade Federal do Espírito Santo, em cabines individuais à temperatura ambiente.

As amostras foram servidas individualmente, em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta em pratos descartáveis e codificadas com 3 dígitos, sendo servidas as duas amostras de forma aleatória e balanceada entre os consumidores. Junto com cada amostra foi apresentada uma ficha de avaliação conforme Figura 06.

A aceitação do queijo foi avaliada por meio de escala hedônica de nove (9) pontos sendo a menor nota 1 (desgostei extremamente), e a maior nota 9 (gostei extremamente).

ESTUDO SOBRE O PRODUTO

Você irá receber amostras de queijo Minas Frescal, por favor, prove as amostras e preencha a ficha abaixo.

Amostra: 115

- **Por favor, marque na escala abaixo quanto à APARÊNCIA da mesma.**
 - () Gostei extremamente
 - () Gostei muito
 - () Gostei moderadamente
 - () Gostei ligeiramente
 - () Indiferente
 - () Desgostei ligeiramente
 - () Desgostei moderadamente
 - () Desgostei muito
 - () Desgostei extremamente
- **Por favor, marque na escala abaixo o quanto você gostou do SABOR do queijo.**
 - () Gostei extremamente
 - () Gostei muito
 - () Gostei moderadamente
 - () Gostei ligeiramente
 - () Indiferente
 - () Desgostei ligeiramente
 - () Desgostei moderadamente
 - () Desgostei muito
 - () Desgostei extremamente
- **Por favor, marque na escala abaixo quanto à TEXTURA do queijo.**
 - () Gostei extremamente
 - () Gostei muito
 - () Gostei moderadamente
 - () Gostei ligeiramente
 - () Indiferente
 - () Desgostei ligeiramente
 - () Desgostei moderadamente
 - () Desgostei muito
 - () Desgostei extremamente
- **Por favor, prove-a (o) e marque na escala abaixo o quanto VOCÊ GOSTOU do produto.**
 - () Gostei extremamente
 - () Gostei muito
 - () Gostei moderadamente
 - () Gostei ligeiramente
 - () Indiferente
 - () Desgostei ligeiramente
 - () Desgostei moderadamente
 - () Desgostei muito
 - () Desgostei extremamente
- **O que você mais gostou neste produto?**

- **O que você mais desgostou neste produto?**

- **Você compraria este produto?**
 - () Certamente compraria
 - () provavelmente compraria
 - () Tenho dúvidas se compraria
 - () Provavelmente não compraria
 - () Certamente não compraria
- **Comentários:**

Figura 6: Modelo de Ficha de avaliação utilizada no teste de aceitação sensorial (adaptação de Minim, 2010)

Juntamente com a aceitação sensorial, foi solicitado aos julgadores que verificassem a intenção de compra do produto. Foi utilizada escala hedônica de cinco (5) pontos, sendo a menor nota 1 (certamente não compraria) e a maior nota 5 (certamente compraria).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração do óleo essencial de pimenta rosa

Na Tabela 2, estão apresentados dados médios de extração do óleo essencial de pimenta rosa. Todas as extrações foram feitas por um período de três horas. A partir dos dados de extração calculou-se a densidade do óleo. O rendimento foi calculado comparando a quantidade de óleo essencial de pimenta rosa extraído da massa de pimenta rosa moída.

Tabela 2: Dados médios de extração de óleo essencial de pimenta rosa.

Pimenta moída (g)	Volume óleo (cm ³)	Massa do óleo (g)	Densidade g/cm ³	Rendimento %
466,67 ± 19,66	19,93 ± 2,47	17,21 ± 1,91	0,87 ± 0,05	4,08 ± 0,39%

Clemente (2006), ao extrair óleo essencial de frutos maduros de pimenta rosa, obteve 4,65% de rendimento em relação à matéria seca, valor muito próximo ao encontrado no presente estudo. Já nos estudos realizados por Bertoldi (2006) foram encontrados valores médios em torno de 7%. Com isso, pode-se concluir que a composição da pimenta rosa varia, influenciando no rendimento da extração do seu óleo. Além disso, o método de extração também pode afetar o seu rendimento.

5.2 Caracterização do óleo essencial de pimenta rosa

5.2.1 Composição química

De todo o óleo essencial extraído, devidamente homogeneizado, foi retirada uma amostra para determinação de sua composição química. Na Tabela 3 estão apresentados os dados de composição química do óleo essencial de pimenta rosa.

Foram determinados os componentes majoritários do óleo essencial, com identificação de 95,36 % dos constituintes (Tabela 3). Podemos verificar que o δ -careno, um monoterpene, foi encontrado em maior concentração. Este composto

se caracteriza pelo sabor doce, pungente, encontrado no óleo essencial (BERTOLDI, 2006).

Tabela 3: Composição do óleo essencial de pimenta rosa

Componente	tR	% (área)
δ-careno 3	12,578	42,49
d-limoneno	13,433	15,37
β-felandreno	12,257	14,68
α-pireno	9,049	10,29
β –mirceno	11,737	5,70
acetato de benzila	13,223	1,64
Cariofileno	31,854	1,39
δ-cardineno	36,331	1,29
α-terpinoleno	16,326	1,17
Naftaleno	34,353	0,80
β-pireno	10,902	0,55
Total	95,36	

tR: Tempo de retenção

A composição química do óleo essencial depende diretamente da composição dos frutos utilizados para extração do óleo. Lloyd et al. (1977) caracterizaram os terpenos dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi), concluindo que os componentes majoritários são: α-pireno, β-pinene, sabinene, careno, felandreno, limoneno, cymeno e torpinoleno. Pode-se verificar que estes componentes também foram encontrados no presente estudo. A concentração de cada componente pode variar de acordo com a região, época do ano, horário de coleta dos frutos entre outros fatores.

Clemente (2006), ao avaliar ao caracterizar frutos e óleo essencial de pimenta rosa, verificou que a composição varia de acordo com o estado de

maturação dos frutos, sendo bastante diferente entre frutos verdes e maduros. Portanto este é outro fator a ser considerado na determinação da composição dos óleos essenciais. Ao determinar a composição do óleo essencial de pimenta rosa Pawlowski et al. (2012) também encontraram resultados bastante similar aos encontrados neste trabalho. Portanto as características do óleo essencial encontrado neste estudo estão relacionadas com os frutos utilizados neste experimento, seu estágio de maturação, época de colheita dos frutos e tempo de secagem.

A atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial depende da sua composição. Ao analisar a atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta (*Piper nigrum*), Baghe et al. (2014) constataram que os componentes como β -cariofileno, limoneno, sabinene, β -pinene, 3-careno, α -pireno estão relacionados com o potencial antioxidante deste óleo. A presença destes componentes no óleo extraído no presente estudo justifica a avaliação de sua capacidade antioxidante.

5.2.2 Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizada diluição de 0,5 mL do óleo essencial de pimenta rosa em 10 mL álcool etílico absoluto, e a leitura foi realizada em duplicata. Na Tabela 4 são apresentados os valores médios de μ mols de trolox por mL de óleo essencial das três repetições, assim como o desvio padrão.

Tabela 4: Valores médios e respectivos desvio padrão da atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa.

Atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa (média e desvio padrão)	
(μ mols de trolox por mL - mM trolox)	2,53 \pm 0,28
mg/L	991,09 + 232,87

O trolox é um análogo da vitamina E que age como doador de elétrons aos radicais livres, bloqueando assim a reação de oxidação. Portanto é um composto que vem sendo usado na determinação de características antioxidantes “*in vitro*”.

Ao analisar os resultados, pode-se observar que o óleo essencial de pimenta rosa apresentou atividade antioxidante nas três repetições realizadas. Portanto o óleo essencial de pimenta rosa apresenta atividade antioxidante “*in vitro*”.

Existem estudos que avaliam a atividade antioxidante de óleo essencial determinada pelo método ABTS, utilizando ácido ascórbico (vitamina C) como referência. Bendaoud et al. (2010), pesquisando a atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa, encontraram $24,1 \pm 0,8$ mg/L. A atividade antioxidante do óleo essencial de pimenta rosa encontrado no presente estudo é bem superior a este valor, porém os padrões utilizados não foram os mesmos. A escolha do padrão é muito importante para a representatividade dos resultados (BERTOLDI, 2006). Basile et al. (2006), ao avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial extraído de flores de *Sideritis itálica*, encontraram $1,98 \pm 0,01$ mg/mL, valor superior ao encontrado no presente estudo ($0,99 \pm 0,23$ mg/mL).

Novos estudos se fazem necessários para avaliar este potencial no alimento. Verificando sua real capacidade de bloquear as reações de oxidação de lipídios, inibindo a formação de peróxidos e radicais livres.

5.2.3 Atividade antimicrobiana

Na Tabela 5 estão apresentados o valor médio e desvio padrão referentes ao halo de inibição para o teste de difusão em ágar para *S. aureus* medido em centímetros. A água destilada foi utilizada como controle positivo e não apresentou halos de inibição para o *S. aureus*. Como controle negativo foi utilizado uma mistura de antibióticos (sulfato de neomicina, sulfato de paromicina, ácido nalidíxico).

Tabela 5: Valores médios e desvio padrão (\pm) do halo de inibição (cm) do óleo essencial de pimenta rosa e antibióticos para *S. aureus*.

Antimicrobiano	Halo de inibição (cm) ¹ <i>S. aureus</i>	
Óleo essencial de pimenta rosa	1,33 \pm 0,322 ^a	Teste t P = 0,02*
Antibióticos ²	2,18 \pm 0,157 ^b	

¹ média das repetições \pm desvio padrão.

² Antibióticos (sulfato de neomicina, sulfato de paromicina, ácido nalidíxico).

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ($p \geq 0,05$); * significativo

De acordo com a Tabela 5, os dois tratamentos apresentaram diferença significativa entre os halos formados pelos antibióticos e o óleo essencial de pimenta rosa (OE), segundo teste t ao nível de 95% de probabilidade ($p < 0,05$), no teste de difusão em ágar. Tanto o óleo essencial de pimenta rosa quanto os antibióticos (sulfato de neomicina, sulfato de paromicina, ácido nalidíxico, utilizados como controle positivo) apresentaram efeito inibitório no desenvolvimento de *S. aureus*.

O óleo essencial e os metabólitos secundários de plantas têm se mostrado uma alternativa viável à substituição ao uso de antibióticos devido ao seu potencial antimicrobiano. O uso de antibióticos não é permitido em alimentos devido à possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana cruzada em humanos, seleção de microrganismos resistentes, e devido à exigência pelos consumidores e órgãos de fiscalização de produtos isentos de resíduos de antibióticos (TRAESSEL et al., 2011).

Santos et al. (2007), ao estudar atividade antimicrobiana do extrato obtido de casca de pimenta rosa, verificaram os resultados por meio dos halos de inibição formados, em relação ao diâmetro apresentado pela zona de inibição classificaram como: $< 0,9$ cm, inativo; $0,9 - 1,2$ cm parcialmente ativo; $1,3 - 1,8$ cm ativo e $> 1,8$ cm muito ativo. De acordo com a classificação de Santos (2007) a atividade antimicrobiana do óleo essencial de pimenta rosa para *S. aureus* seria ativo e a mistura de antibióticos testados seria muito ativo.

No presente estudo, os resultados obtidos da análise da concentração inibitória mínima (CIM) mostraram que em todas as concentrações do óleo

essencial de pimenta rosa houve algum efeito inibitório para *S. aureus*, no entanto, após algumas horas de incubação ocorreram perdas desse efeito em algumas concentrações. A maior concentração testada foi de 50% de óleo essencial e a menor 0,39%.

A curva de crescimento para *S. aureus* em diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta rosa está apresentada na Figura 7.

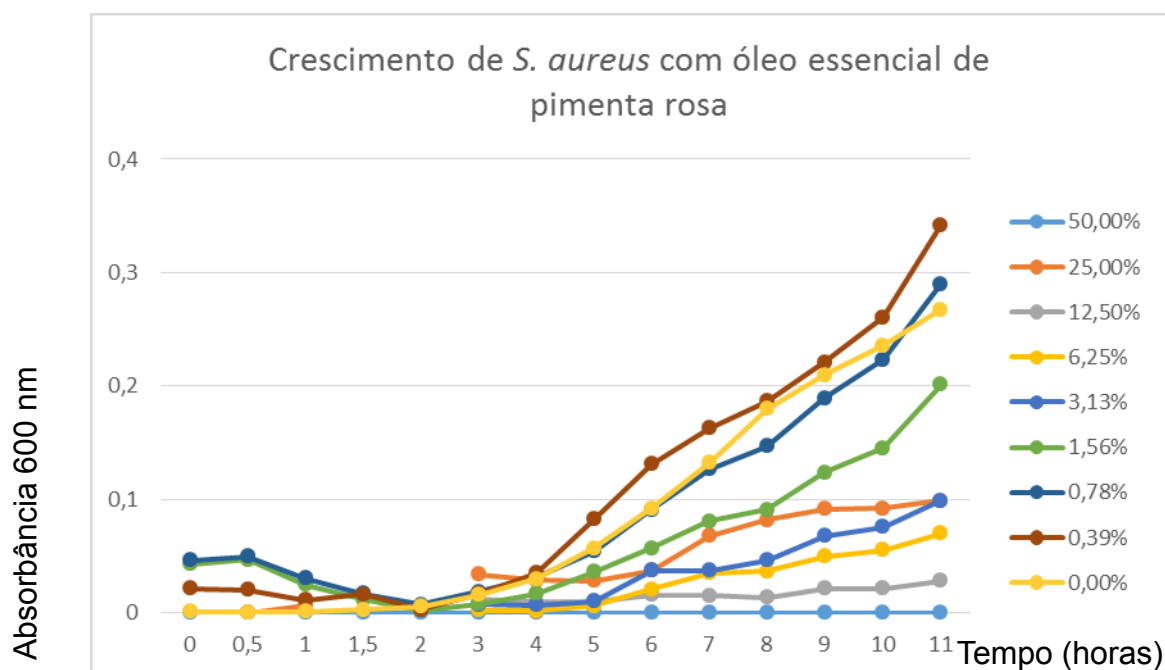


Figura 7: Crescimento de *S. aureus* diferentes concentrações (50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0%) de óleo essencial de pimenta rosa após 11 horas de incubação.

Pelo controle, pode-se observar que o tempo de lag é de aproximadamente 2 horas. Após a fase de adaptação, nas concentrações abaixo de 3,13% pode-se notar que houve desenvolvimento microbiano semelhante ao controle. Assim a CIM do óleo essencial de pimenta rosa para *S. aureus* foi de 3,13% (v/v).

Ao avaliar o efeito de óleo essencial de sálvia (*Salvia officinalis*) contra duas cepas de *S. aureus*, Pesavento et al. (2015) encontraram a CIM de 3,125%, o mesmo valor encontrado no presente estudo.

Ao estudar o perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil, Bertini et al. (2005) obtiveram maior sensibilidade de *S. aureus*, bactéria gram positiva, em comparação à sensibilidade de *E. coli*, gram negativa, para todos os óleos essenciais testados.

Este resultado se deve ao fato das bactérias gram negativas possuírem parede celular composta por peptidoglicano, lipoproteínas, membrana externa e lipopolissacarídeos. A presença desta membrana externa dificulta o acesso de antimicrobianos ao citoplasma da célula tornando-os menos efetivos (JAY, 2005).

5.3 Microencapsulação do óleo essencial de pimenta rosa

5.3.1 Caracterização físico-química e morfológica das microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa

Estão apresentadas na Tabela 6 as médias e respectivos desvios padrão da caracterização das três formulações de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado.

Tabela 6: Caracterização físico-química das 3 formulações de microcápsulas de óleo essencial de Pimenta Rosa

Formulação	Aw	Umidade	Higroscopicidade
Fo1	0,47 ± 0,03 ^a	7,64 ± 1,15 ^{ab}	6,04 ± 1,73 ^a
Fo2	0,48 ± 0,04 ^a	9,40 ± 1,77 ^a	5,22 ± 1,26 ^a
Fo3	0,47 ± 0,08 ^a	6,57 ± 1,12 ^b	5,20 ± 2,66 ^a

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem entre si segundo Tukey ($p \geq 0,05$).

Fo1: 10% de goma arábica e 10% de maltodextrina

Fo2: 10% de maltodextrina e 10% de amido modificado

Fo3: 5% de goma arábica, 10% de maltodextrina e 5% de amido modificado.

Conforme Tabela 6, as três formulações testadas não apresentaram diferença significativa em relação à atividade de água. Para a umidade, de acordo com a Tabela 6, houve diferença significativa entre as formulações Fo2 e Fo3.

Costa (2013), ao avaliar a influência de diversos fatores nas características de microcápsulas de bioaroma de queijo suíço, conclui-se que o teor de amido modificado é um dos fatores que mais afetam a umidade de microcápsulas formadas por secagem em spray dryer, o que pode também ser constatado no presente estudo.

Pode ser observado pela Tabela 6 que as três formulações não apresentaram diferença significativa em relação à higroscopicidade. A higroscopicidade é uma das mais importantes características a serem observadas nas microcápsulas, pois está relacionada à solubilização das microcápsulas e à formação de “cake” (FERNANDES et al. 2014). São chamadas de “cake” as pedras formadas em produtos desidratados pela absorção de água. Estas formações irão aumentar a umidade do produto deixando o produto em condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos e dificultando a solubilização do material encapsulado no produto final (WALSTRA, 2006; FOX, 1988).

5.3.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das microcápsulas foi observada através da microscopia eletrônica de varredura. Foram feitas algumas medidas a fim de se obter o tamanho médio das partículas. As médias e seus respectivos desvios padrão estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Diâmetro médio (μm) das partículas das 3 formulações de microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa

	Fo1 (μm)	Fo2 (μm)	Fo3 (μm)
Diâmetro	4,08 \pm 1,64 ^a	6,23 \pm 3,39 ^b	4,45 \pm 1,98 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, segundo Tukey ($p \geq 0,05$).

Segundo Castro-Cislagh et al. (2012) o diâmetro das microcápsulas obtido na secagem por spray dryer pode variar até 100 μm . Valores maiores que este, podem afetar a textura do alimento que elas são adicionadas. Todas as microcápsulas do presente estudo apresentaram valores menores que 100 μm . A formulação 02 (Fo2) apresentou os maiores valores médios de diâmetro das partículas.

A seguir, são discutidos os resultados das análises de microscopia eletrônica de varredura e de espectroscopia de energia dispersiva (EDS) de cada uma das três formulações.

Na Figura 8, pode-se observar as imagens da formulação 01 (Fo1). Para determinação dos valores médios de diâmetro das partículas da formulação 01, apresentados na Tabela 7, foram utilizadas 23 medidas e foi utilizado o software Image J.

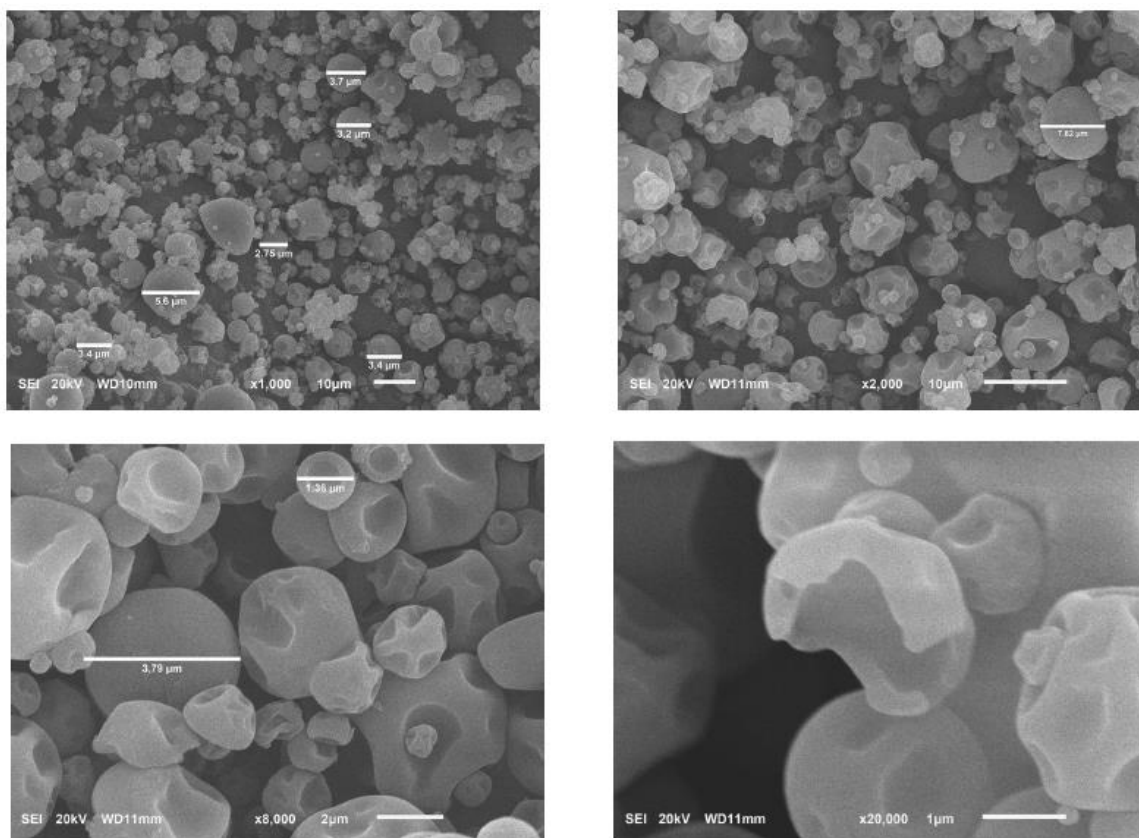


Figura 8: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 01 (Fo1), aumento 1000, 2000, 8000 e 20000 vezes.

As imagens apresentadas na Figura 8 das microcápsulas obtidas da Formulação 01 apresentaram formas esféricas com concavidades. Estas concavidades são típicas de produtos atomizados. A temperatura de secagem é um dos fatores que vem sendo associado a estas formações. A presença destas concavidades na superfície são as principais responsáveis pelas propriedades de ruptura mecânica e difusão do soluto (CASTRO-CISLAGH et al., 2012).

Existem diversas maneiras de se caracterizar materiais, entre elas a caracterização química por Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) realizada juntamente com a microscopia eletrônica de varredura. Conforme observado na Figura 9 o espectro obtido apresentou basicamente os elementos carbono e

oxigênio. A sensibilidade do aparelho não permite a detecção de elementos químicos de número atômico inferior a 11 e concentrações inferiores a 1000 ppm. Por se tratar de uma amostra orgânica, este resultado é bastante coerente, não mostrando nenhum tipo de contaminação nas amostras. Foi possível somente a análise qualitativa das formulações, para análises quantitativas seriam necessários padrões com concentrações conhecidas dos elementos a serem quantificados.

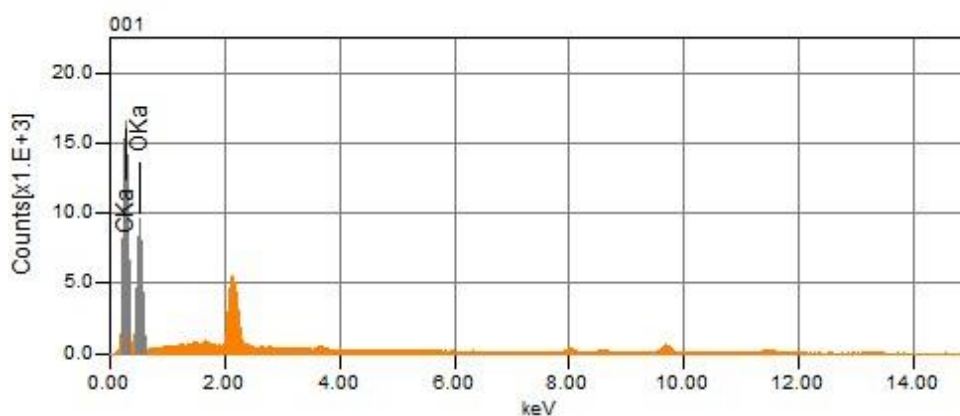


Figura 9: Espectro de Energia Dispersiva (EDS) obtido da formulação 01

As imagens de microscopia eletrônica de varredura da Formulação 02 estão apresentadas na Figura 10. Para determinação dos valores médios de diâmetro das partículas da formulação 02, apresentados na Tabela 7, foram utilizadas 18 medidas e o mesmo software (Image J).

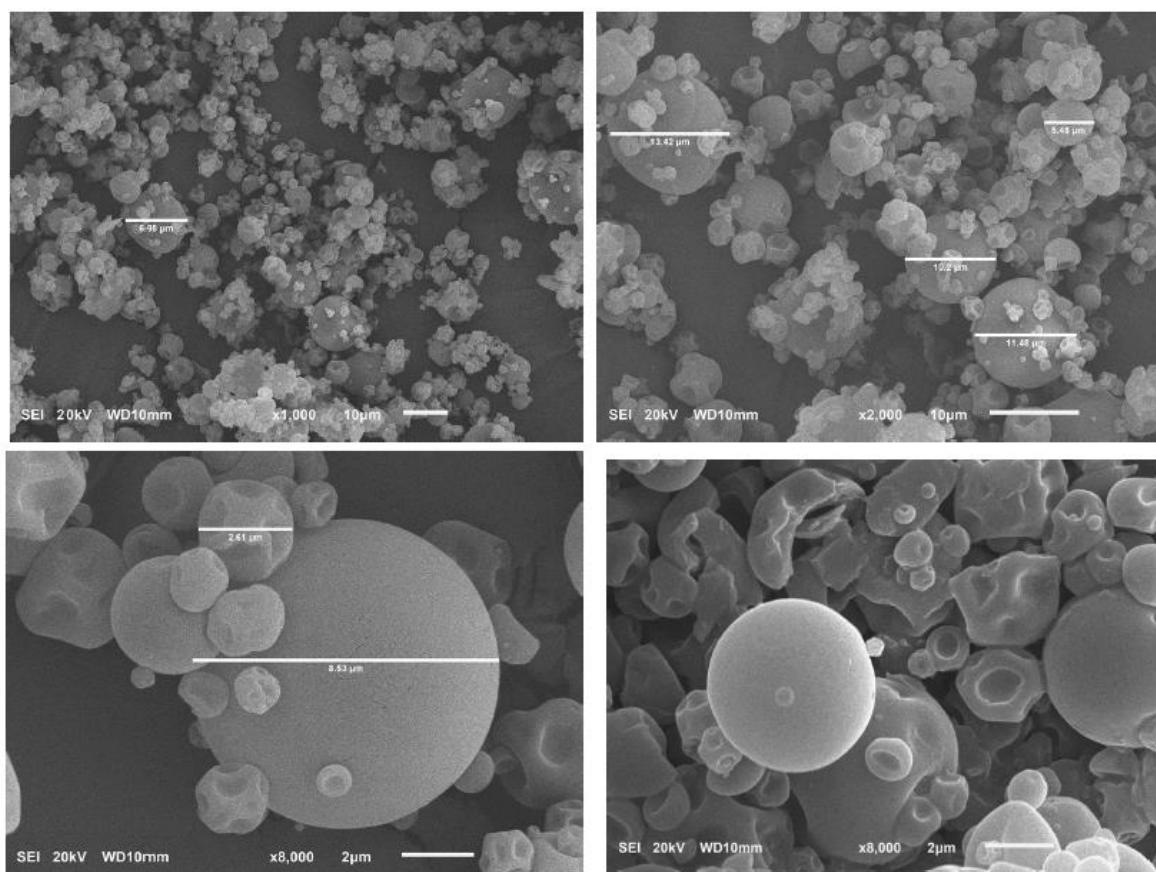


Figura 10: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 02 (aumento 1000, 2000 e 8000 vezes).

Pode-se observar pelas imagens apresentadas na Figura 10, a morfologia das microcápsulas obtidas na formulação 02 (Fo2). Estas microcápsulas também apresentaram conformações esféricas e concavidades características da secagem utilizada. Na Figura 11 está representado o espectro de energia dispersiva da formulação 02 (Fo2).

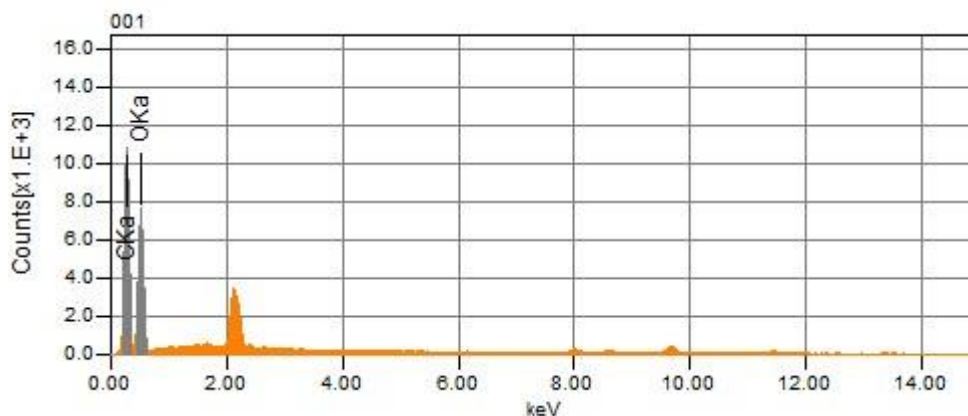


Figura 11: Espectro de energia dispersiva (EDS) obtido da formulação 02.

Conforme observado na Figura 11 o espectro obtido apresentou basicamente os elementos carbono e oxigênio, o que era esperado por se tratar de amostras orgânicas.

Na Figura 12 estão as imagens de microscopia eletrônica de varredura da formulação 03 (Fo3). Para determinação dos valores médios de diâmetro das partículas da formulação 03 da Tabela 7 foram utilizadas 35 medidas e o software Image J.

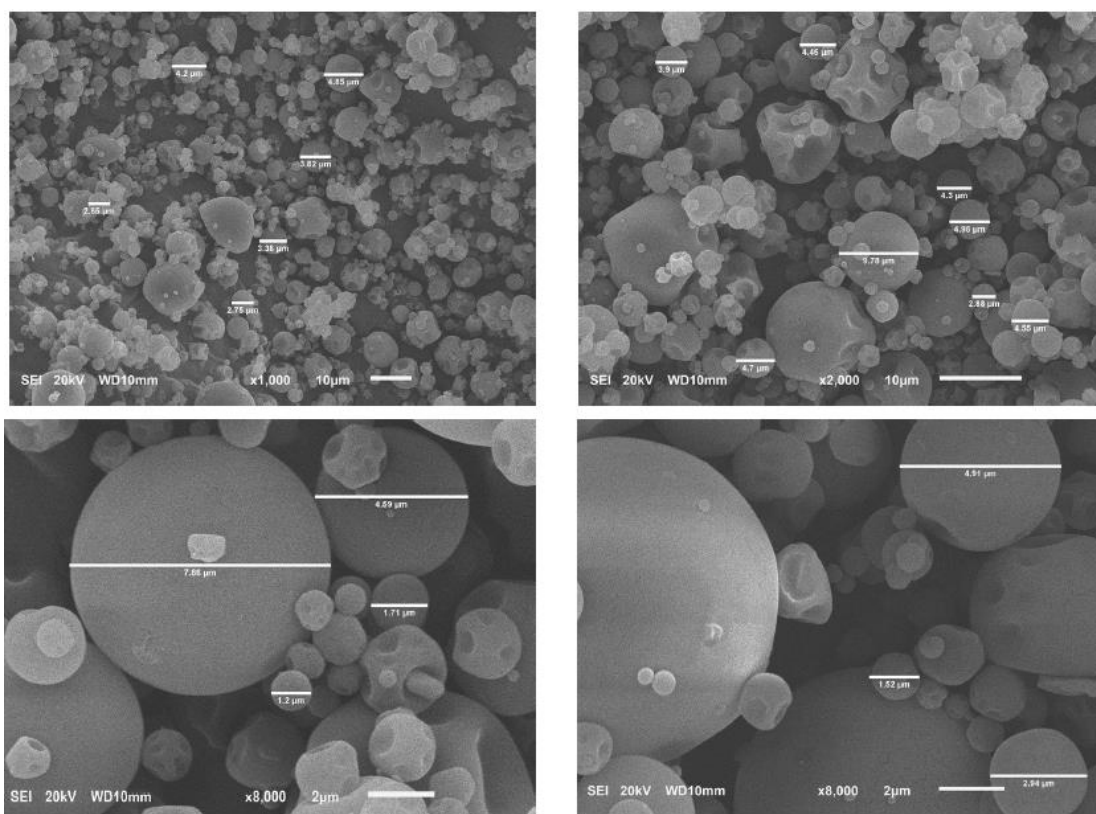


Figura 12: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da formulação 03 (aumento 1000, 2000 e 8000 vezes).

Pode-se observar que as microcápsulas obtidas na formulação 03 apresentaram as mesmas características das outras formulações, Fo1 e Fo2: conformação esférica e concavidades.

Na Figura 12 está apresentado o espectro de energia dispersiva da formulação 03 (Fo3).

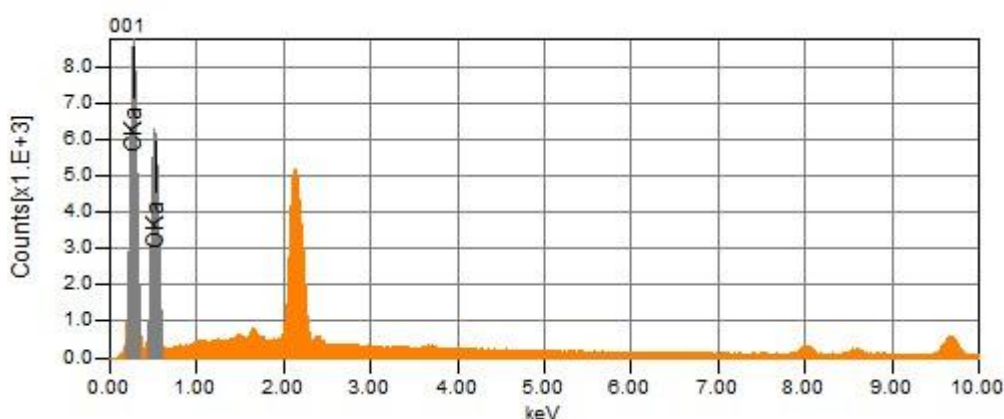


Figura 13: Espectro de energia dispersiva (EDS) obtido da formulação 03

Conforme observado na Figura 13, o espectro obtido apresentou basicamente os elementos carbono e oxigênio, assim como para as formulações 01 e 02. Este resultado era esperado por se tratar de amostras orgânicas.

5.3.3 Difração de raios x

A difração de raios x é uma técnica utilizada para avaliar a característica amorfa ou cristalina de pós. Pode-se dizer que cristais são arranjos atômicos ou moleculares cuja estrutura se repete numa forma periódica tridimensional. O padrão de difração é único para cada tipo de cristal, permitindo com isto a caracterização de materiais pela sua composição (BLEICHER; SASAKI, 2010; CAPARINO, 2012; PINTO, 2012; ROCHA, 2008).

Os grânulos de amido e a maltodextrina estão organizados em regiões cristalinas e amorfas, sendo a transição entre elas gradual. A região cristalina é constituída pelas cadeias laterais da amilopectina, enquanto os pontos de ramificação e amilose são os principais componentes das regiões amorfas. (CAPARINO, 2012; PINTO, 2012; ROCHA, 2008).

Desse modo, a cristalinidade dos grânulos, determinada por difractometria de raios x, é descrita em função das duplas hélices formadas pelas ramificações da amilopectina. As áreas cristalinas do amido mantêm a estrutura do grânulo, e controlam o seu comportamento na água. Esta estrutura cristalina depende do tipo e grau de associação intermolecular existente entre os componentes do amido (ROCHA, 2008).

Na Figura 14, são apresentados os difratogramas das formulações Fo1, Fo2 e Fo3.

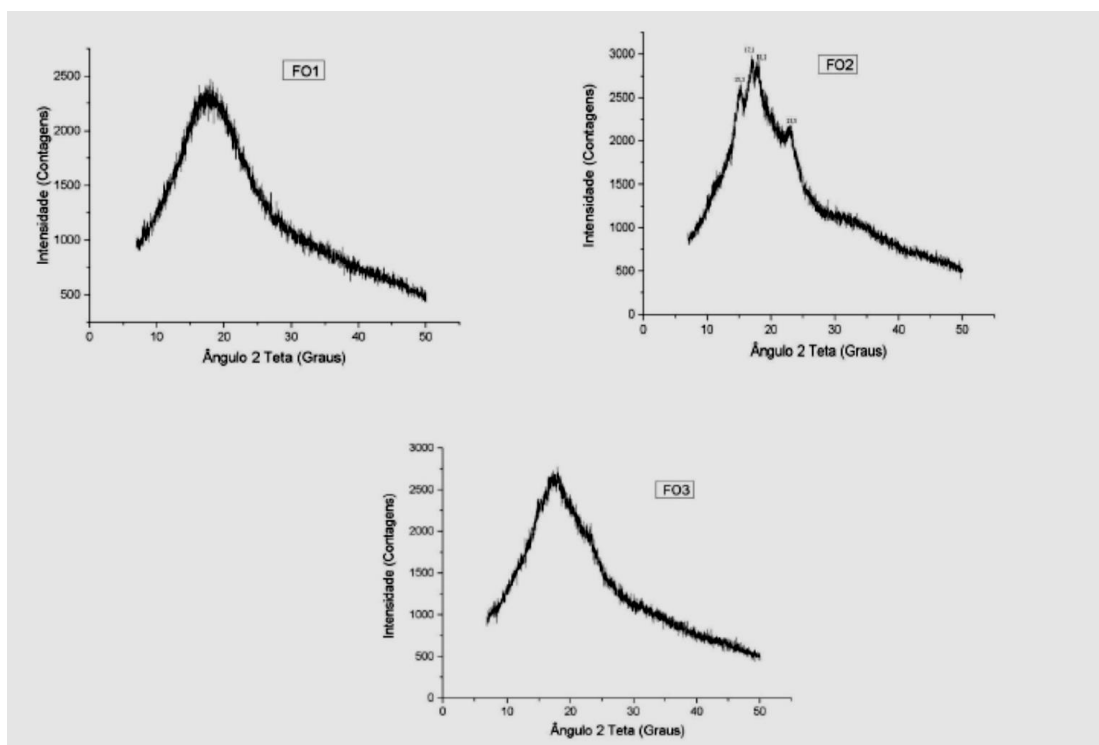


Figura 14: Difratograma das formulações 01 (Fo1), 02 (Fo2) e 03 (Fo3).

O perfil da Fo1 apresentou conformação completamente amorfa, sem a presença de cristalização ou picos de difração. O perfil da Fo3 apresentou um afinamento na região entre os ângulos de 15 graus a 24 graus, sendo muito mais visível na região em torno de 20 graus, possivelmente uma região dos picos cristalográficos do amido. A Fo1 e Fo3 obtiveram difratogramas bastante parecidos, no entanto, a largura e meia altura da curva da Fo3 são menores, mais estreitas. Isso é devido à presença do amido. O perfil F02 apresentou picos de difração com picos em 15,3; 17,1; 18,2; e 23,5 graus. Estes picos são característicos do amido, referentes ao amido classificado como tipo A.

A formação de cristais, conseqüentemente a reorganização polimórfica para mais organizado, portanto energeticamente favorável (menor energia livre de Gibbs), é considerada um problema para a encapsulação de material ativo. Este fato pode ser explicado pela expulsão de material ativo das microcápsulas devido à diferença de polaridade (núcleo polar e material de parede apolar (GAMBOA;

GONÇALVES; GROSSO, 2011). Com isso, pode-se concluir que a formulação (Fo1), que não apresentou formação de picos, é mais eficiente na proteção do material ativo.

A goma arábica e a maltodextrina presentes nas formulações Fo1 e Fo3 não contribuíram com picos de difração. A goma arábica por ter características amorfas. A maltodextrina, apesar de apresentar regiões amorfas e cristalinas, não formou picos de difração. Este fato deve-se ao tipo de equipamento utilizado para secagem (spray dryer). Neste tipo de secagem, a amostra é seca instantaneamente, portanto o tempo é insuficiente para formação dos picos.

Este mesmo resultado também foi encontrado por Pinto (2012), que constatou que a maltodextrina não apresentou picos de cristalinidade, apresentando difratograma de material completamente amorfo. Os picos encontrados são decorrentes da presença de amido nas formulações, o que confirma os resultados deste estudo. Raja et al. (1988) avaliaram vários tipos de maltodextrina, com vários graus de dextrose equivalente e constataram comportamento amorfo em todos.

5.3.4 Cor

Foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão dos parâmetros de cor que estão apresentados na Tabela 8. A goma arábica foi o componente que mais contribuiu para as alterações de cor entre as três formulações de microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa. Este componente está presente em 10 % na formulação 1 e 5 % na formulação 3.

Tabela 8: Parâmetros de cor das três formulações de microcápsulas

Parâmetro	Fo1	Fo2	Fo3
L	90,26 ± 0,92 ^a	96,82 ± 0,29 ^a	91,44 ± 2,81 ^a
A	0,44 ± 0,13 ^a	-0,16 ± 0,15 ^b	0,25 ± 0,39 ^a
B	5,21 ± 0,46 ^a	2,12 ± 0,30 ^b	4,56 ± 0,97 ^c
C	5,23 ± 0,45 ^a	2,13 ± 0,31 ^b	4,57 ± 0,97 ^c
H	85,09 ± 1,52 ^a	91,71 ± 1,58 ^b	86,82 ± 2,48 ^a

*Médias seguidas pela mesma letra numa linha não diferem entre si, segundo Tukey ; nível de 95% de probabilidade (p<0,05).

As formulações Fo1 e Fo3 só diferiram no parâmetro, todos os outros parâmetros não apresentaram diferença significativa em nível de 95 % de probabilidade. A formulação Fo2 apresentou “a” negativo, região do verde, enquanto as outras duas apresentaram “a” positivo, vermelho.

Um dos objetivos deste trabalho foi selecionar uma das três formulações de microcápsulas para ser utilizada na parte final do experimento. A atividade de água e a umidade são duas características importantes para determinação da vida de prateleira dos pós. As formulações testadas não diferiram quanto à atividade de água, mas houve diferença significativa quanto à umidade com a formulação 2 (Fo2) apresentando maiores valores. Portanto, a Fo3 foi escolhida para ser utilizada para fabricação dos queijos Minas Frescal com óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado, pois se mostrou uma alternativa viável de substituição parcial da goma arábica (50%) por amido modificado, como papel de parede. A alta disponibilidade do amido modificado e baixo custo estão entre as principais características positivas deste material. A goma arábica é considerada um excelente material de parede, porém seu custo elevado e fornecimento limitado restringem o seu uso.

5.4 Elaboração e caracterização do queijo Minas Frescal

Primeiramente foram elaboradas as quatro formulações de queijo Minas Frescal com diferentes concentrações de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%) para o teste de ordenação-preferência. Foram realizados testes preliminares que demonstraram a impossibilidade de utilização da CIM (3,13%). O óleo essencial de pimenta rosa contém os compostos aromáticos característicos da planta, portanto concentrações próximas à CIM apresentaram sabor extremamente acentuado. Deste modo, optou-se por utilizar concentrações menores e avaliar o efeito da concentração escolhida no teste de ordenação-preferência.

Os resultados obtidos no teste de ordenação preferência foram tabulados e a soma de ordem para cada formulação foi calculada e comparada com o valor de diferença mínima significativa (dms) conforme estabelecido no método de Friedman a 5% de probabilidade.

Tabela 9: Soma de ordens para as formulações A, B, C e D de queijo Minas Frescal adicionado 0,005; 0,010; 0,015 e 0,020%, de óleo essencial de pimenta rosa respectivamente e a diferença entre elas.

	FA	FB	FC	FD
Soma de ordens	158 ^a	166 ^a	221 ^b	185 ^{ab}

* notas seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si quanto à preferência segundo Friedman, a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Os valores de diferença de soma de ordens estão na Tabela 17, a dms (40,6) disponível na interpolação da Tabela 01 do anexo foi utilizada para este experimento. Diferenças entre somas de ordem iguais ou superiores à dms, mostraram preferência significativa ($p < 0,05$) entre as amostras.

As formulações FA, FB e FD com concentração de óleo essencial de 0,005 e 0,010 e 0,020%, respectivamente, não apresentaram diferenças significativas. Optou-se por utilizar no restante do experimento a formulação FB, uma das formulações preferidas no teste de ordenação-preferência, porém com maior concentração de óleo essencial de pimenta rosa que a formulação FA; com o objetivo de avaliar a capacidade desta concentração de óleo essencial, tanto no controle do desenvolvimento de microrganismos como na atividade antioxidante.

Foram coletadas amostras do leite dos três processamentos de queijo Minas Frescal para as análises físico-químicas, os resultados destas análises foram tabulados e os resultados são apresentados nos próximos itens.

Da mesma maneira foram coletadas amostras dos queijos controle (CO) e com óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR) de cada processamento para sua caracterização.

5.4.1 Acidez titulável e pH

Foram determinadas a acidez titulável e o pH do leite utilizado nos três processamentos de queijo. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 9.

Tabela 10: Médias e desvios padrão de acidez titulável e pH do leite utilizado nos três processamentos do experimento.

Parâmetro	Leite
Acidez titulável (g de ácido láctico/100 mL de leite)	0,15 ± 0,01
pH	6,89 ± 0,17

Segundo a Instrução Normativa 62 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), que estabelece padrões de identidade e qualidade para leite, o leite cru refrigerado deve estar com acidez titulável entre 0,14 e 0,18 g de ácido láctico por 100 mL de leite. O leite utilizado para produção dos queijos apresentou 0,149 g de ácido láctico/100 mL, portanto dentro do limite estabelecido (BRASIL, 2011).

Os queijos produzidos também foram analisados quanto acidez titulável e pH. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 11: Média e desvio padrão acidez titulável e pH dos queijos produzidos nos três processamentos do experimento

	Acidez titulável (% de ácido láctico)	pH
Queijo CO	0,96 ± 0,14 ^a	6,92 ± 0,17 ^a
Queijo OEPR	0,90 ± 0,01 ^a	6,89 ± 0,14 ^a

* médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si, pelo Teste t em nível de 95% de confiança ($p \geq 0,05$)

Os queijos produzidos CO e OEPR não diferiram estatisticamente quanto aos parâmetros avaliados.

5.4.2 Composição centesimal do leite e do queijo Minas Frescal

Na Tabela 12, estão apresentadas as médias e respectivos desvios padrão da composição centesimal do leite utilizado nas três repetições do experimento.

Tabela 12: Médias e desvios padrão da composição centesimal do leite utilizado no experimento.

Componente	Médias
Proteína	3,41 ± 0,13
Gordura	3,30 ± 0,23
EST	10,73 ± 0,87
Cinzas	0,99 ± 0,01
Carboidratos	3,03 ± 0,91

Segundo a Instrução Normativa 62 de dezembro de 2011, do MAPA, o leite utilizado para fabricação dos queijos deve apresentar os seguintes teores mínimos; gordura 3%; proteína 2,9 %; extrato seco total 11,4% (BRASIL, 2011).

O leite utilizado neste experimento atendeu às recomendações de gordura. Porém, o valor encontrado para o extrato seco total ficou abaixo dos limites estabelecidos. Existem vários fatores que influenciam a composição do leite, entre eles pode-se citar alimentação do rebanho, estação do ano, raça do animal, período de seca, entre outras coisas (FOX, 1988; WALSTRA, 2006). A época de coleta das amostras foi um período de seca longa, o que pode ter influenciado na qualidade do leite produzido.

De acordo com artigo 476 do RIISPOA o leite deve apresentar lactose (carboidratos) mínima de 4,3%. As médias obtidas neste trabalho estão abaixo deste valor.

Os teores de cinzas não possuem limites mínimos estabelecidos pela legislação brasileira. Segundo Fox (1988) é o componente do leite que menos sofre alteração de seus valores, variando entre 0,7- 0,9%, o que foi encontrado no presente estudo.

Os dados médios da composição centesimal dos 3 processamentos de queijo Minas Frescal, controle sem óleo essencial (CO) e com óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR), realizados podem ser observados na Tabela 13.

Tabela 13: Composição centesimal dos queijos produzidos: médias e desvios padrão dos 3 processamentos

Componente	Queijo Controle	Queijo com OEPR
Proteína	16,81 ± 0,76 ^a	17,35 ± 0,77 ^a
Gordura	16,00 ± 0,32 ^a	15,91 ± 0,49 ^a
Umidade	63,83 ± 0,56 ^a	63,63 ± 3,02 ^a
Cinzas	2,72 ± 0,21 ^a	2,58 ± 0,13 ^a
Carboidratos	0,64 ± 1,18 ^a	0,53 ± 2,70 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra numa linha não diferem entre si, segundo Teste t ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,5$).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois tratamentos nos componentes avaliados. Como foi utilizado o mesmo leite para fabricação dos queijos e todos os processamentos foram iguais, pode-se dizer que a adição das microcápsulas não alterou a composição dos queijos.

Segundo Instrução Normativa nº 4 de 01/03/2004 (IN 04), o queijo Minas Frescal é um produto semi-gordo, de muita alta umidade, a ser consumido fresco. Em relação à umidade, os queijos produzidos neste experimento estavam de acordo com esta Instrução Normativa, uma vez que queijos de muita alta umidade possuem este parâmetro acima de 55%. No entanto, os queijos produzidos estavam com a gordura abaixo do estabelecido pela legislação, sendo classificados como magros (BRASIL, 2004).

A Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2012) estabelece os seguintes valores percentuais para queijo Minas Frescal: umidade 56,1; proteína 17,4; lipídios 20,2; carboidratos 3,2 e teor de cinzas 3,0. A umidade nos queijos produzidos foi maior que este valor, portanto todos os parâmetros estavam em menores quantidades. A legislação brasileira não fornece valores mínimos para estes parâmetros.

Zarbeli et al. (2004), ao avaliar as características físico-químicas e a composição centesimal de queijo Minas frescal (controle e com redução de gordura), encontraram os seguintes valores médios para o queijo Minas Frescal: gordura 16,0%, umidade 57,9%, cinzas 2,54%, proteína 18,3% e carboidrato

(lactose) 5,3%. Esses valores foram bastante similares aos apresentados no presente estudo. Na caracterização de queijos Minas artesanais produzidos na região do Serro, MG, foram encontrados os seguintes valores médios: gordura 29,22%, umidade 50,84%, cinzas 3,7%, proteína 17,06% e lactose 0,55% (MACHADO et al., 2004). A umidade nos queijos artesanais é bem diferente da encontrada no presente estudo, o que irá afetar toda a composição dos queijos.

Pode-se concluir que os queijos produzidos estavam dentro do padrão estabelecido para queijo Minas Frescal. A adição de óleo essencial de pimenta rosa não descaracterizou o produto quanto à sua composição centesimal.

5.4.2.3 Perfil de textura instrumental (TPA)

Os resultados obtidos no perfil de textura instrumental estão apresentados na Tabela 13. Foram calculadas as médias e seus respectivos desvios padrão e os resultados comparados pelo Teste t no nível de 95% de probabilidade.

Tabela 14: Parâmetros do perfil de textura instrumental dos queijos controle (CO) e queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR)

Parâmetro	Queijo CO	Queijo OEPR
Dureza (N)	6,30 ± 2,09 ^a	6,43 ± 13,065 ^a
Adesividade (g.mm)	27,00 ± 30,53 ^a	13,57 ± 15,925 ^a
Fraturabilidade (N)	6,25 ± 2,10 ^a	6,16 ± 3,520 ^a
Coesividade	0,18 ± 0,05 ^a	0,37 ± 0,454 ^b
Elasticidade (mm)	14,44 ± 1,55 ^a	16,29 ± 3,537 ^a
Índice Elasticidade	0,73 ± 0,08 ^a	0,82 ± 0,179 ^a
Gomosidade (N)	1,02 ± 0,285 ^a	1,38 ± 1,082 ^b
Mastigabilidade (g.mm)	1523,54 ± 480,35 ^a	2454,14 ± 2242,31 ^b

* Médias seguidas pela mesma letra, numa linha não diferem entre si pelo Teste t a 95% de probabilidade ($p \geq 0,05$).

O perfil de textura instrumental (TPA) é um teste imitativo desenvolvido para imitar as condições de degustação e mastigação do alimento. Podemos dizer que a dureza é a força máxima na compressão durante a primeira mordida, força necessária para cortar um alimento. As duas formulações de queijo CO e OEPR não apresentaram diferenças significativas neste parâmetro.

Adesividade é a quantidade de força requerida para simular o trabalho necessário que sobreponha as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este. Fraturabilidade é a força na ruptura observada no primeiro ciclo da compressão (BURITI et al., 2008 PIAIAZZON-GOMES et al., 2010). As formulações de queijo CO e OEPR não apresentaram diferença significativa nestes parâmetros.

Coesividade é a energia mecânica necessária para destruir a estrutura interna da amostra (BURITI et al., 2008 PIAIAZZON-GOMES et al., 2010). Com $p < 0,001$ as amostras apresentaram diferença estatística entre as duas formulações. O queijo OEPR apresentou uma maior resistência interna para romper as ligações da sua composição.

Elasticidade pode ser definida como a capacidade da amostra de recuperar a sua forma original depois que a força de deformação é removida (BURITI et al., 2008 PIAIAZZON-GOMES et al., 2010). As duas formulações não apresentaram diferenças significativas.

Índice de elasticidade está relacionado com a capacidade de retornar a posição inicial após deformação (BURITI et al., 2008 PIAIAZZON-GOMES et al., 2010). As duas formulações também não apresentaram diferenças significativas.

Gomosidade pode ser descrita como a energia requerida para desintegrar uma amostra semissólida ao ponto de ser engolida (BURITI et al., 2008 PIAIAZZON-GOMES et al., 2010). Com $p = 0,0038$, no Teste t as amostras apresentaram diferença muito significativa.

Buriti et al. (2008), ao avaliar o perfil de textura instrumental de queijos frescos cremoso adicionado de *Lactobacillus paracasei* e inulina não encontraram diferença significativa entre os parâmetros avaliados. Portanto firmeza, coesividade, adesividade, elasticidade e gomosidade não apresentaram alterações significativas durante os 21 dias de armazenamento.

Segundo Piaiazzon-Gomes (2010), ao avaliar o perfil de textura instrumental de queijo Minas Frescal adicionados de derivados de soja, observou que as formulações que foram testadas diferem significativamente ($p \leq 0,05$) entre si nos parâmetros dureza, fraturabilidade, elasticidade, coesividade e mastigabilidade. Essas amostras não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à adesividade. As proteínas têm um papel fundamental na formação da rede tridimensional da coalhada na produção do queijo. A adição de derivados de soja alterou a matriz proteica do queijo acarretando estas alterações.

Pode-se afirmar que a adição de microcápsulas de óleo essencial de pimenta rosa modificou alguns parâmetros do perfil de textura instrumental do queijo. Isto sugere que a matriz proteica do queijo foi alterada pela adição dos materiais de parede das microcápsulas. Porém, alguns parâmetros não foram alterados, o que pode ser explicado pela concentração de microcápsulas utilizada no queijo OEPR ser muito pequena.

5.4.2.5 Cor

Para se verificar se a adição das microcápsulas teve alguma influência nos parâmetros de cor dos queijos produzidos, foram calculadas as médias e respectivos desvios padrão destes parâmetros nos queijos CO e OEPR e estão apresentadas na Tabela 15.

Tabela 15: Parâmetros de cor na formulação de queijo controle (CO) e queijo adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado (OEPR)

Parâmetro	Queijo CO	Queijo OEPR
L	90,09 ± 0,58 ^a	90,24 ± 0,01 ^a
A	0,66 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,01 ^a
B	17,29 ± 0,20 ^a	16,52 ± 0,01 ^a
C	16,95 ± 0,06 ^a	16,85 ± 1,14 ^a
H	88,24 ± 0,68 ^a	85,6 ± 2,81 ^a

* Médias seguidas pela mesma letra numa linha não diferem entre si segundo Teste t ($p \geq 0,05$).

Todos os parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa entre si. O valor de L varia de 0 a 100, sendo o valor máximo igual a 100 onde ocorre perfeita difusão ou reflexão de luz (branco). O valor mínimo para L, zero,

representa a cor preta. Portanto duas formulações testadas, queijo CO e OEPR, estavam próximos à região do branco. Pode-se verificar que a goma arábica não teve influência no parâmetro b, conforme verificado na análise de cor das microcápsulas, uma vez que a concentração de microcápsulas adicionado ao queijo OEPR é bem pequena.

5.4.3 Análises microbiológicas

As análises de coliformes totais, *E. coli* e fungos filamentosos e leveduras nos queijos CO e OEPR foram realizadas logo após os processamentos (tempo 0) e os seus resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Médias e respectivos desvios padrão do log das contagens de coliformes totais; *Escherichia coli*; fungos filamentosos e leveduras nos queijos (log UFC.g⁻¹)

Microrganismo	Queijo CO (log UFC.g ⁻¹)	Queijo OEPR (log UFC.g ⁻¹)
Coliformes totais	0,67 ± 0,58 ^a	0,33 ± 0,58 ^a
<i>Escherichia coli</i>	< 1 ^{*a}	< 1 ^{*a}
Fungos e leveduras	1,32 ± 0,55 ^a	1,33 ± 0,58 ^a

* Valores estimados

Médias seguidas pela mesma letra numa linha não diferem entre si segundo teste t ao nível de 95% de probabilidade (p≥0,05).

Todo leite utilizado no processo passou por pasteurização e todos os procedimentos obedeceram ao Manual de Boas Práticas de Fabricação, portanto a contagem de coliformes obedeceu aos parâmetros fixados pela legislação vigente no país, Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001.

Não há parâmetros estabelecidos na legislação para contagem de *E. coli* e fungos e leveduras. Loguercio e Aleixo (2001), ao avaliar as condições higiênico-sanitárias do queijo Minas Frescal produzido artesanalmente em Cuiabá – Mato

Grosso, encontraram valores bastante diferentes aos encontrados no presente estudo. Com valores médios de contagem de coliformes de $3 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ e *E. coli* de $2 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, não atendendo aos padrões estabelecidos pela Legislação Brasileira para o produto que é de $2,69 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ para coliformes a 45°C . Araújo et al. (2001), ao determinarem o número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia, encontraram valores médios acima de $2 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, o que foi caracterizado pelos pesquisadores como processamento ou armazenamento inadequado. Esses valores também foram superiores aos encontrados neste estudo. Os valores encontrados no presente estudo indicam que a pasteurização utilizada foi eficaz para o controle microbiano e os queijos foram produzidos atendendo aos requisitos de boas práticas de fabricação.

Os dados obtidos nas contagens de *S. aureus* dos três processamentos nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 15 e 30 dias foram tabulados, transformados em log e as médias calculadas. Estes resultados foram utilizados para plotagem do gráfico de contagem de células viáveis do *S. aureus* no decorrer do tempo conforme a Figura 14.

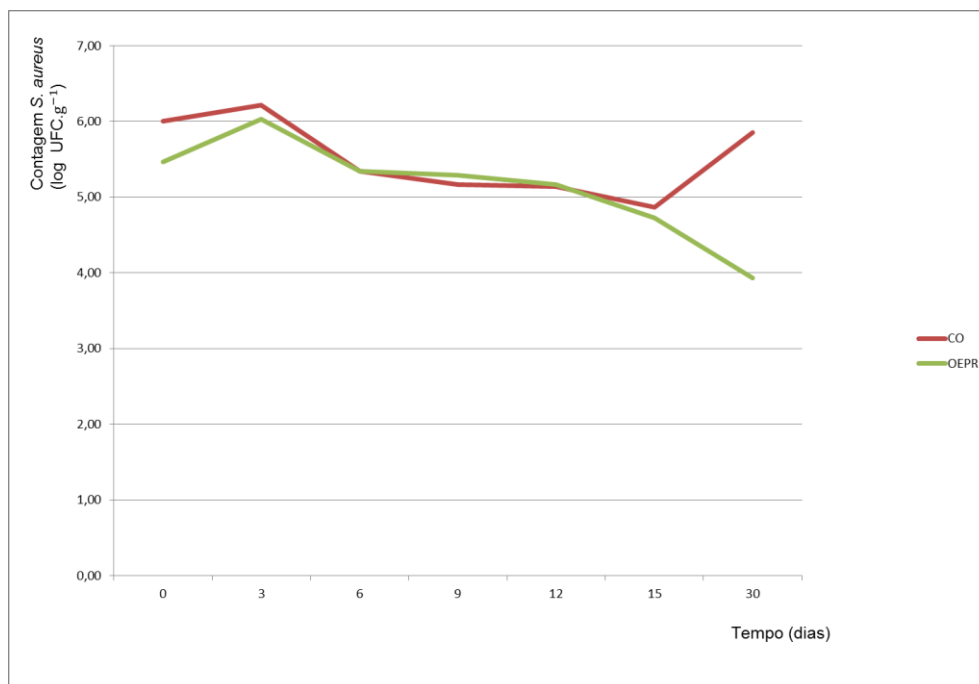


Figura 15: Contagem de *S. aureus* no queijo Minas Frescal CO e OEPR ($\log \text{ UFC.g}^{-1}$ de queijo).

Pelo comportamento das curvas pode-se observar que a contagem de *S. aureus* no queijo OEPR diminuiu com o tempo, enquanto a contagem no queijo CO diminuiu no início e aumentou após 15 dias. A pasteurização não elimina todos os microrganismos presentes nos alimentos e em geral, *S. aureus* não compete bem com a microbiota normal da maior parte dos alimentos, especialmente aqueles que contêm grande número de bactérias ácido-lácticas (BERGDOLL; ROBBINS, 1976). Sua redução no primeiro momento pode ter sido causada pela presença de enzimas específicas ou outros metabólitos destas bactérias. No último dia da contagem, 30 dias, pode-se observar comportamento bem distinto das duas formulações de queijo.

No início e no fim do experimento, foram observadas no queijo CO quantidades muito próximas de *S. aureus*; enquanto que para o queijo OEPR houve uma redução de 1,53 log UFC.g⁻¹. A diferença entre as contagens finais dos tratamentos é de 1,92 log, que é um valor considerável.

Pimentel Filho (2010), ao avaliar o efeito das bacteriocinas: bovicina HC5 e nisina combinadas sobre *S. aureus* ATCC 6538 inoculado na massa do queijo Minas Frescal, também observou redução de um ciclo log nos primeiros 15 dias de estocagem a 4 °C, porém diferente do encontrado no presente estudo, o crescimento foi reassumido após esse período.

De acordo com Senger e Bizani (2011), quando a população atinge 10⁵ UFC.g⁻¹, é capaz de produzir 1 µg de toxina e causar intoxicação alimentar. Jay (2005) afirma que são necessárias populações acima de 10⁶ UFC.g⁻¹ para detecção de enterotoxinas. Nos queijos produzidos neste experimento havia populações iniciais nestes valores, portanto capazes de causarem riscos à saúde dos consumidores. No queijo CO, havia esta concentração ao final do experimento. Já no queijo OEPR foi comprovado o efeito do óleo essencial de pimenta rosa, tendo havido inibição deste microrganismo.

O queijo Minas Frescal é um produto não maturado, que deve ser consumido fresco. Novos testes devem ser feitos em outros produtos, com tempo de estocagem maior, a fim de se verificar o comportamento do óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado em períodos de tempo maiores.

Uma maior concentração de óleo também deve ser testada em trabalhos futuros, a fim de se verificar a aceitação sensorial do produto e seu efeito

inibitório, visto que no presente trabalho, o óleo essencial não foi adicionado ao queijo na concentração mínima inibitória (CIM).

5.4.4 Teste de aceitação sensorial

Os resultados obtidos no teste de aceitação sensorial foram tabulados, as médias foram calculadas e estão apresentados na Tabela 17. Foi utilizada escala hedônica de 9 pontos, sendo 1 (desgostei extremamente) e 9 (gostei extremamente).

Tabela 17: Médias e seus respectivos desvios padrão das notas dos julgadores no teste sensorial de aceitação

Atributo	Queijo Controle	Queijo OEPR	Teste t
Aparência	7,7 ± 1,04 ^a	8,1 ± 0,71 ^b	0,03 *
Sabor	7,5 ± 1,38 ^a	7,5 ± 1,23 ^a	0,79 ^{ns}
Textura	7,6 ± 1,21 ^a	7,9 ± 1,04 ^a	0,34 ^{ns}
Impressão global	7,6 ± 1,18 ^a	7,6 ± 0,97 ^a	0,88 ^{ns}

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si, segundo teste t ao nível de 95 % de confiabilidade ($p \geq 0,05$)

*Apresenta diferença significativa; ns não apresenta diferença significativa segundo Teste t ($p \geq 0,05$)

De todos os atributos analisados apenas a aparência apresentou diferença significativa. Este fato pode ter ocorrido pelos cortes serem feitos manualmente, portanto não estarem necessariamente iguais. Tamanho diferente é um dos critérios que podem interferir na avaliação feita pelos julgadores, segundo Minim 2010. Os queijos não diferiram nos testes de aceitação sensorial para os outros atributos, este resultado mostra que a adição de óleo essencial microencapsulado no queijo Minas Frescal, não afetou a aceitação sensorial do produto, apesar de ter ocorrido modificação no sabor tradicional do queijo Minas Frescal.

A escala hedônica é bastante utilizada em testes de aceitação, pois consegue mensurar a aceitação de um produto. A escala utilizada tem o ponto 5 (indiferente) delimitando a aceitação do produto. Médias acima de 6 (gostei ligeiramente) indicam que o produto foi aceito pelos julgadores.

As médias de todos os atributos ficaram acima de 7 (gostei moderadamente) indicando que o produto foi aceito pelos julgadores. Foi feita a distribuição de frequências de cada atributo para melhor visualização dos resultados. Os resultados estão apresentados nas Figuras 15, 16, 17 e 18. Pode-se observar que houve uma concentração na distribuição nas notas 9, 8 e 7.

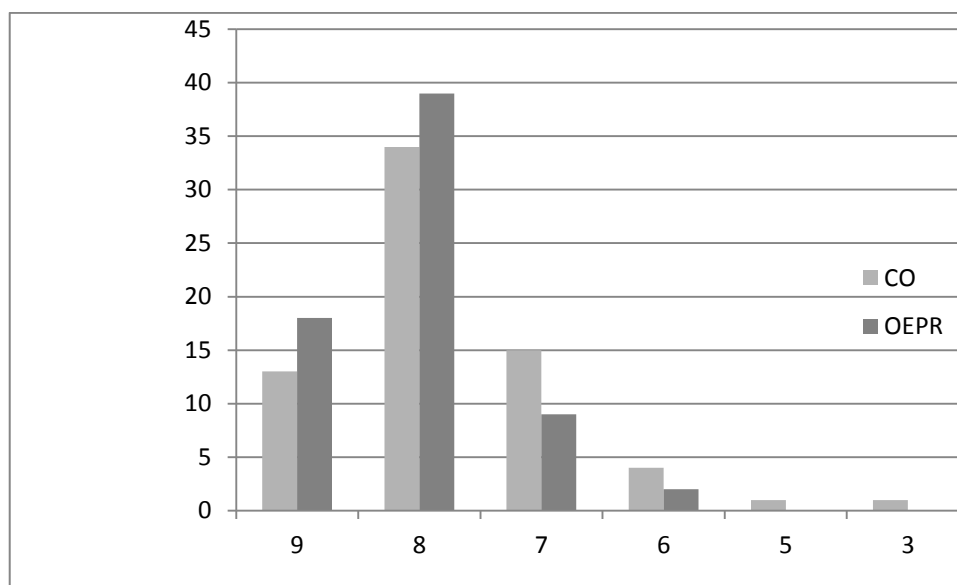


Figura 16: Distribuição de frequências para o atributo aparência

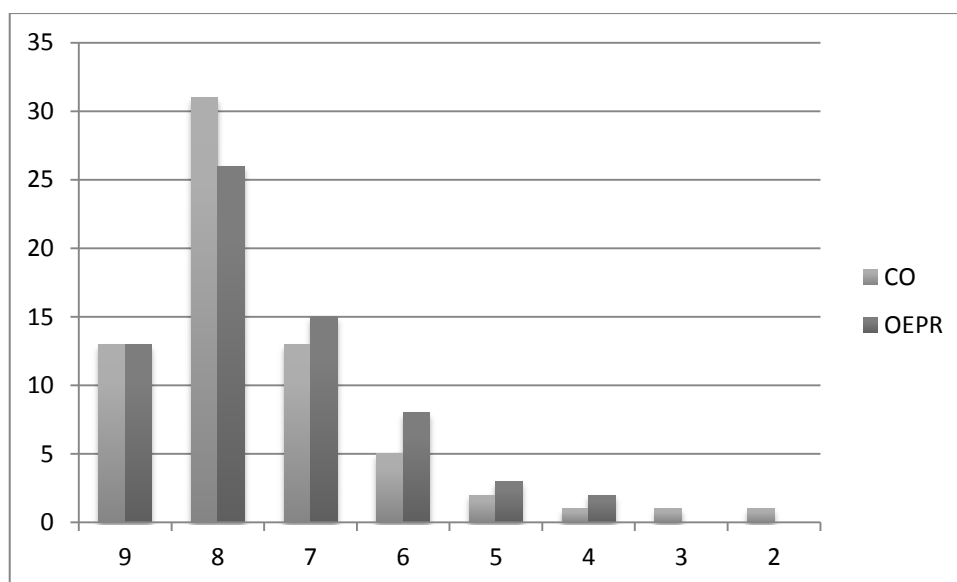


Figura 17: Distribuição de frequências para o atributo sabor.

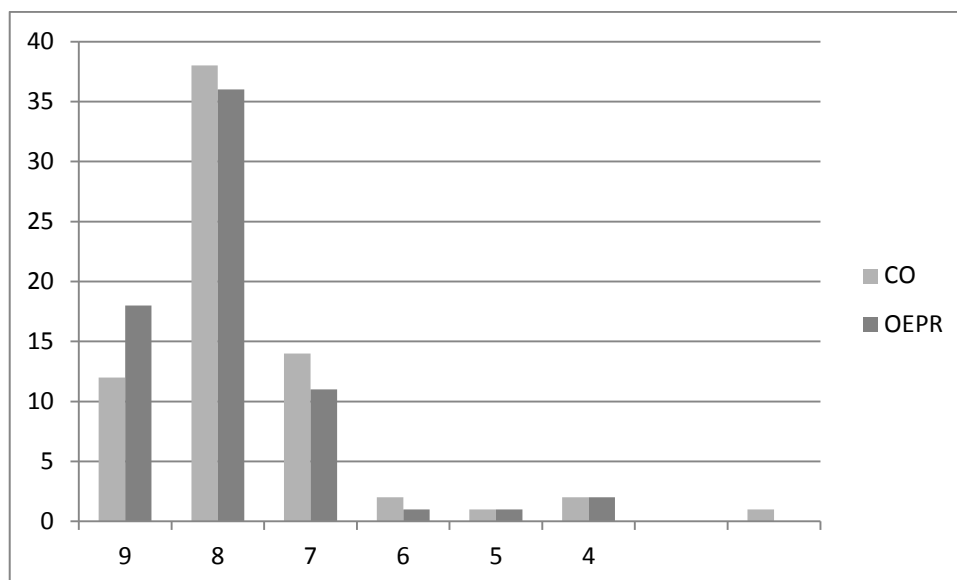


Figura 18: Distribuição de frequências para o atributo textura

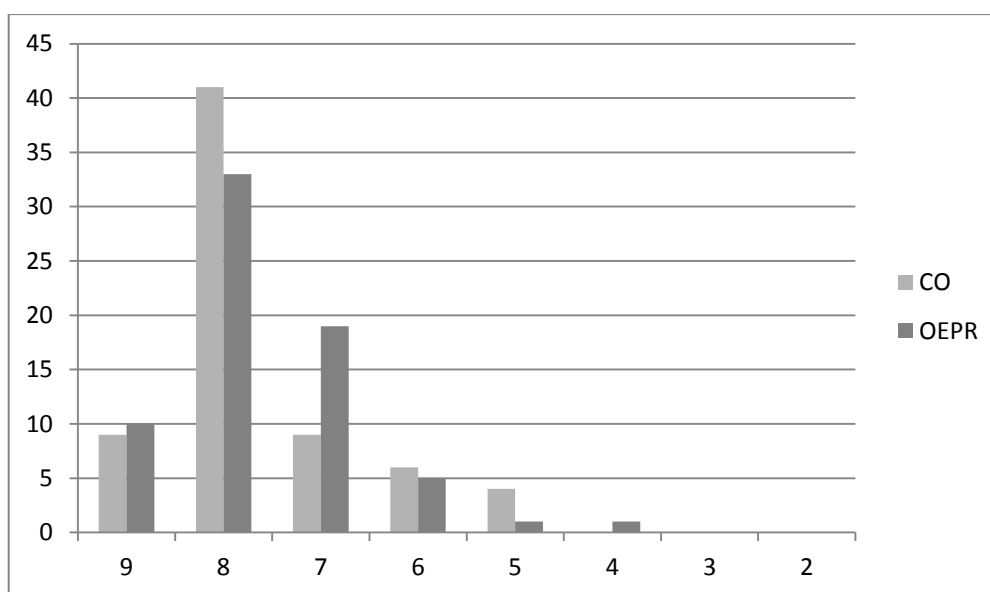


Figura 19: Distribuição de frequências para a impressão global

Bertoldi (2006), ao avaliar a aceitação sensorial de salmão e chocolate adicionados de pimenta rosa moída, também encontrou resultados satisfatórios. A média de aceitação para o salmão foi de 7,2, situada entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”. Já a média para o salmão adicionado de pimenta rosa moída teve media de 8,1, entre os termos “gostei muito” e “gostei extremamente”. Constatando que a pimenta rosa conseguiu aumentar a aceitação do salmão. A aceitabilidade da pimenta rosa no chocolate teve médias de 7,7;

entre os termos hedônicos gostei moderadamente e gostei muito, para chocolate preto; e 6,6 para chocolate branco, entre os termos hedônicos “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Com isso pode-se concluir que a pimenta rosa teve boa aceitação sensorial em todos os casos avaliados.

No presente estudo também foi solicitado aos julgadores que avaliassem a intenção de compra do produto. Foi utilizada escala hedônica de 5 pontos, sendo 1 certamente não compraria e 5 certamente compraria os produtos. Os resultados obtidos foram tabelados, as médias calculadas e estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Médias e seus respectivos desvios padrão da intenção de compra dos julgadores.

Queijo Controle	Queijo OEPR	Teste t
4,1 ± 0,86 ^a	4,3 ± 0,75 ^a	0,21 ^{ns}

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si segundo teste t ao nível de 95% de probabilidade.

ns = não significativo (Teste t; $p \geq 0,05$)

Pode-se observar na Tabela 18 que os queijos CO e OEPR tiveram médias de intenção de compra entre os valores hedônicos de “possivelmente compraria” e “certamente compraria”, indicando que os produtos tiveram boa aceitação pelos consumidores. Um dos grandes objetivos da elaboração de produtos é a aceitação de compra pelos consumidores, portanto um produto que atende este quesito vem justificar o investimento em um novo produto.

6 CONCLUSÕES

A pimenta rosa é uma alternativa viável para obtenção de óleo essencial. A extração do óleo essencial nos frutos maduros utilizados no experimento teve rendimento de 4,08%.

O óleo essencial de pimenta rosa apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana para o desenvolvimento de *S. aureus*.

A microencapsulação com o uso do spray dryer foi utilizada com êxito para o óleo essencial de pimenta rosa. A substituição de 50% da goma arábica por amido modificado, juntamente com a maltodextrina, se mostrou adequada para microencapsular óleo essencial de pimenta rosa.

No queijo Minas Frescal produzido com óleo essencial de pimenta rosa houve redução do desenvolvimento do *S. aureus* em 1,53 ciclos log no período de 30 dias. Houve uma diferença de 1,91 ciclos log nas contagens finais dos queijos produzidos com óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado e o queijo controle. Portanto a adição do óleo essencial é uma maneira de se controlar o desenvolvimento deste microrganismo no queijo Minas Frescal.

O queijo Minas Frescal com óleo essencial de pimenta rosa teve boa aceitação sensorial, indicando que este óleo essencial pode ser um diferencial positivo no sabor de alguns produtos tradicionais.

Portanto a elaboração de queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial de pimenta rosa microencapsulado se mostrou uma alternativa tecnologicamente viável para utilização das propriedades antimicrobianas do óleo essencial de pimenta rosa. Além disto, o queijo Minas Frescal adicionado de óleo essencial de pimenta rosa foi um produto inovador com características sensoriais aprovadas pelos julgadores.

5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Outros métodos de extração de óleo essencial devem ser investigados com o objetivo de se comparar a composição do óleo obtido e o rendimento de extração.

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando apenas *S. aureus*, novos estudos devem ser conduzidos a fim de se verificar o comportamento deste óleo essencial com outros microrganismos.

A otimização do processo de microencapsulação, buscando temperaturas ótimas, materiais de parede alternativos, diferentes concentrações de material de parede, é uma alternativa para a continuidade deste trabalho. Além disso, outros métodos de microencapsulação devem ser investigados a fim de se comparar processos, buscando sempre ampliar a utilização de microencapsulação em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 2007, 804p.

AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; RAFIEE, S.; MADADLOU, A. Optimization of emulsification procedure for mutual maximizing the encapsulation and energy efficiencies of fish oil microencapsulation. **Powder Technology**, v. 225, p. 107–117, 2012.

AMARAL, M. T.; VIANA, C. E. V.; ARANHA, B. C.; EPPING, N. C.; PRESTES, O. D.; AUGUSTI, P. R. Sistema Cielab para avaliação da cor de produtos cárneos. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 4, n. 1, 2012

ANTUNES, A. E. C., MOTTA, E. M. P., ANTUNES, A. J. Perfil de textura e capacidade de retenção de água de géis ácidos de concentrado protéico de soro de leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 23, p. 183-189, 2003.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed.Gaithersburg, Maryland, 2005

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos**, Viçosa: Editora UFV, 2011, 5ª Ed., 601 p.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. H. ; MARTINEZ, T. C. N. ; BANAS, S .L. B. ; SILVEIRA, V. F. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador – Bahia. **Revista Brasileira Saúde Produtos Animais**, v.2, n. 1, p. 10-14, 2001.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 10, n.4, p. 413-435, 1993.

ASCHERI, D.P.R; MARQUEZ, M.O.M.; MARTUCCI, E. T. Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.23 (supl.), p.1-6, 2003.

ASCHERI, D.P.R; **Seleção de material de parede para a microencapsulação de óleo essencial de laranja (Citrus sinensis) através da secagem por atomização**; Universidade Federal de Campinas (UNICAMP), 1997, 125 p., Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP.

ASPERGER, H.; ZANGERL, P. Pathogens in Milk / Staphylococcus aureus – Dairy, In **Encyclopedia of Dairy Sciences** Segunda Edição editado por FUQUAY; J. W.; Academic Press, San Diego, Pages 111-116, 2011.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulation: applications to food technology. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

AZEVEDO, V. M.; COSTA, J. M. G.; DOMINGO, E.; CARNEIRO, J. D. S.; PINTO, S. M.; BORGES, S. V. Potencial de aplicação de microcápsulas de óleo essencial de orégano em queijo quark. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 386 n.67, p.05-12, 2012.

BAGGIO, A. J. Aroeira como potencial para usos múltiplos na propriedade rural. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 17, p. 25-32, 1988.

BAGHE, H. N; MANAP, M. Y. B. A.; SOLATI, Z. Antioxidant activity of Piper nigrum L. essential oil extracted by supercritical CO₂ extraction and hydro-distillation. **Talanta**, v. 121, p. 220–228, 2014

BASILE, A.; SENATORE, F.; GARGANO, R.; SORBO, S.; PEZZO, M. D.; LAVITOLA, A.; RITIENI, A.; BRUNO, M.; SPATUZZI, D.; RIGANO, D.; VUOTTO, M. L.; Antibacterial and antioxidant activities in *Sideritis italica* (Miller) Greuter et Burdet essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 240–248, 2006.

BENDAOUD, H., ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J. P.; CAZAUX, S.; BOUJILIA, J. Chemical Composition and Anticancer and Antioxidant Activities of *Schinus Molle* L. and *Schinus Terebinthifolius* Raddi Berries Essential Oils. **Journal of Food Science**. Chicago, v.75, n.6, p.C466-C472, 2010.

BERGDOLL, M.S.; ROBBINS, R.N. Stability of Staphylococcal enterotoxin a to selected conditions encountered in foods. **Journal of Food Science**, v. 41, n. 4, p. 906–909, 1976.

BERTINI, L.M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Revista Infarma**, v. 17, n. 314, p.80-83, 2005.

BERTOLDI, M. C. **Atividade antioxidante “in vitro” da fração fenólica das oleorressinas e do óleo essencial de pimenta rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi)**. Viçosa- MG, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006, 96 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFRV.

BIZZO; H. R.; HOVELI, 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

BLEICHER, L.; SASAKI, J. M; introdução à difração de raios-x em cristais. Universidade Federal do Ceará, 2010

BOROSKI, M.; GIROUX, H. J., SABIK, H.; PETIT, H.V.; JESUI, V. V.; MATUMOTO-PINTRO; BRITTEN, M. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v.47, p.167-174, 2012.

BOSE, L.; BAYLES, K.W. Staphylococcus aureus, In Brenner's **Encyclopedia of Genetics**, Segunda Edição, editado por Maloy; S. e Hughes; K.; Academic Press, San Diego, p. 553-555, 2013.

BRASIL, 2011. **Instrução Normativa n. 62, de 29 de dezembro de 2011**. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade, coleta e transporte de leite. Brasília, DF: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2011, 24 p.

BRASIL, 2006. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006**. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes: métodos físicos e químicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 de dezembro de 2006, seção 1, 142 p.

BRASIL, 2004. Ministério da Agricultura e Pecuária **Instrução Normativa Nº 4, de 1 De Março De 2004**. Regulamento técnico para fixação de Identidade e qualidade do queijo Minas Frescal .

BRASIL, 2001. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

BRASIL, 1996. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Aprovam os Regulamentos Técnicos de Identidades e Qualidades de Produtos Lácteos. Diário Oficial da União de 11/03/1996 , Seção 1, p. 3977

BRASIL, 1952. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA**, decreto n. 30691, de 29 de março de 1952.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H.R.; SAAD, S. M. I. S. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de Lactobacillus paracasei e inulina, Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2008, vol. 44, n. 1, p. 75-84.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, p.223-253, 2004.

CAPARINO, O. A.; TANG, J.; NINDO, C. I.; SABLANI, S. S.; POWERS, J. R.; FELLMAN, J.K. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 135-148, 2012.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. R.; CARLISE BEDDIN FRITZEN-FREIRE, C. B.; JULIANA GOULART LORENZ, J. G. L.; SANT'ANNA, E. S. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186–193, 2012.

CHANAMAI, R.; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of gum Arabic, modified starch and whey protein isolate as emulsifiers: Influence of pH, CaCl₂ and temperature. **Journal of Food Science**, v.67, p. 120-125, 2002.

CLEMENTE, A. D. **Composição Química e Atividade Biológica do óleo essencial de pimenta rosa (Schinus terebinthifolius Raddi)**. Viçosa- MG, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2006, 50 p. Dissertação de mestrado em Agroquímica, UFV.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**, Artmed, 4 ed. 2010, 900 p.

DECKER, E. A. **Natural antioxidants in foods "Encyclopedia of Physical Science and Technology"** (3rd ed). Ed. R.A. Meyers. New York, NY: Wiley and Sons, 2002.

DICKISON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, n. 17, p. 25-39, 2003.

DOWNES, F. P., ITO, K. **Compendium Methods For The Microbiological Examination of Foods**. 4 Ed, American Public Health Association (APHA), 676 p., 2001.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-148, 1988.

FAES; SENAR. **Informativo da Federação da Agricultura e Pecuária do Estado do Espírito Santo e Serviço Nacional de Aprendizagem Rural**, 2009, Ano XIII, n. 212.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum Arabic / starch / maltodextrin / inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524–532, 2014.

FERREIRA, A. L. A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILHO, N. J. P. **Atividade das bacteriocinas bovina hc5 e nisina sobre Listeria monocytogenes e staphylococcus aureus em queijo minas Frescal**. Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2010, 70 p. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, UFV.

FOSTER, T.J. Pathogens in Milk: Staphylococcus aureus – Molecular, In **Encyclopedia of Dairy Sciences**; Segunda Edição; editado por FUQUAY; J. W.; Academic Press, San Diego, 2011, Pages 104-110.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. London: Blackie Academic, 1998, 463 p.

GAMBOA, O. D.; GONÇALVES, L. G.; GROSSO, C. F.; Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v. 1 p. 1732 – 1739, 2011.

GARTI, N. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals**. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2008, 478 p. First published.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray drying in Microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, n.9, p.1107-112, 2007.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D.; Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, p. 273–292, 2005

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Artmed: Porto Alegre, 2005, 711p. KASAPIS, S.; NORTON, I. N.; UBBINK, J. B. **Modern Biopolymer Science**, USA Academic Press, 2009, 627 p. First published.

LLOYD, H. A., JAOUNI, T. M.;EVANS, S.L.; MORTON, J. F. Terpenes of Schinus terebinthifolius. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301-1302, 1977.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de Queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063-1067, 2001.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L.F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA -JÚNIOR, F. N. Características do queijo minas artesanal na região do Serro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MARUYAMA, L. Y.; CARDARELLI, H. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Textura instrumental de queijo Petit-Suisse potencialmente probiótico: influência de diferentes combinações de gomas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 386-393, 2006.

MINIM, V. P. R. Análise sensorial: estudos com consumidores. Viçosa, 2 Ed., UFV, 2010, 308p.

MÜLLER, P. S.; **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná (UFPR), 2011, 99 p. Dissertação de mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. Universidade Estadual de Campinas. Tabela brasileira de composição de alimentos. 4 ed. Campinas, 2006. Disponível em: http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 29 jan.2015.

NILSSON, L; BERGENSTÅHL, B. Adsorption of Hydrophobically Modified Starch at Oil/Water Interfaces during Emulsification. **Langmuir**, v. 22, n. 21, p. 8770-8776, 2006.

OLMEDO, R.H.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R. Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v.53, p.409-417, 2013.

PAWLOWSKI, A.; KALTCHUK-SANTOS, E.; ZINI, C.A.; CARAMÃO, E.B.; SOARES, G.L.G. Essential oils of *Schinus terebinthifolius* and *S. molle* (Anacardiaceae): Mitodepressive and aneugenic inducers in onion and lettuce root meristems. **South African Journal of Botany**, 2012, n. 80 p. 96–103, 2012.

PESAVENTO, G.; CALONICO, C.; BILIA, A. R.; BARNABEI, M.; CALESINI, F.; ADDONA A, R.;MENCARELLI, L.; CARMAGNINI, L.; MARTINO, M.C. DI; LO NOSTRO, A. Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oils against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. **Food Control**, v. 54, p.188-199, 2015.

PIAIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. S.F. Queijo tipo Minas Frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2010, v. 30, s.1, p. 77-85.

PINTO, M. R. M. R. **Obtenção de extratos de carotenoides de polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) encapsulados pelo método de secagem em camada de espuma.** Viçosa, Universidade Federal de Viçosa (UFV), 2012, 72 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFV.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Journal of Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

REBELLO, F. F. P.; Microencapsulação de ingredientes alimentícios – Revisão. **Revista Agrogeoambiental**, v. 1, n. 3, p. 134-144, 2009.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-Minas Frescal . **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v.58, n.2, p.263-272, 2006.

RONDELLI, V.M.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V.T.; PINHEIRO, P. F.; PRATISSOLI, D. Composição química e avaliação do potencial inseticida do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* no controle de *Frankliniella schultzei*. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.15, p.2450-2458, 2012.

SAEG – Sistema para análise estatística, versão 9.1 DEMO. Fundação Arthur Bernardes – UFV – VIÇOSA, 2007.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIREDO, F. J.C.; NETO, O. G. R. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico do Ministério da Agricultura e Abastecimento**, 2004. ISSN 1517-2214

SENGER, A. E. V.; BIZAN; D; Pesquisa de Staphylococcus Aureus em Queijo Minas Frescal produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas / RS, Brasil; **Revista De Ciências Ambientais**, Canoas, v.5, n.2, p. 25-42, 2011.

SILVA-LUZ, C.L.; PIRANI, J.R. Anacardiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4401>>. Acesso em: 30 Jan. 2015.

SOARES, N. F. F.; SILVA, P. S.; SILVA, W. A. Desenvolvimento e avaliação de filme ativo incorporado com óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare* L.) no crescimento de *Listeria innocua* em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.390 n.68, p.65-73, 2008.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Artmed, 2013, 5ª Edição, 918 p. Tradução: DIVAN –JÚNIOR, A. M.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, São Paulo: Atheneu, 5ª ed., 2008, 780 p.

TRAESEL, C.K; LOPES, S. T. A.; WOLKMER, P.; SCHMIDT, C.; SANTUARIO, J. M. ALVES, S. H.; Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica **Ciência Rural**, v.41 n.2, Santa Maria, 2011.

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.

TRUBIANO; P.C. 1995. The role of specialty food starches in flavor emulsions. In: Ho CT, Tan CT, Tong CH, editors. Flavor technology: Physical chemistry, modification, and process. Washington, D.C.: American Chemical Society. p 199-209.

VALERIANO, C.; PICCOLI, R.H; CARDOSO, M. G.; ALVES, E. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

VIEIRA, K. P.; LEDESMA, M. M.; ROSA, C. M.; HASSEGAWA, R. H. Contaminação de queijo Minas Frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **ConScientiae Saúde**, n. 7, v. 2, p. 201-206, 2008.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2 ed, 2006, 808 p.

ZARBIELLI, M.; SANTIN, M.; JACQUES, R.; STUART, G.; VALDUGA, E. Formulação e caracterização de queijo Minas Light enriquecido com fonte de ferro. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, 2004, v. 15, n.3, p. 251-257.