



ALINE CRISTINA TEIXEIRA MALLET

**UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
CONDIMENTOS NA CONSERVAÇÃO DE
QUEIJOS TIPO QUARK**

LAVRAS-MG

2011

ALINE CRISTINA TEIXEIRA MALLET

**UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS NA
CONSERVAÇÃO DE QUEIJOS TIPO QUARK**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora

Dra. Maria das Graças Cardoso

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Mallet, Aline Cristina Teixeira.

Utilização de óleos essenciais de condimentos na conservação de
queijos tipo Quark / Aline Cristina Teixeira Mallet. – Lavras :
UFLA, 2011.

131 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Queijo. 2. Contaminantes. 3. Condimentos. 4. Análise
sensorial. 4. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 637.3

ALINE CRISTINA TEIXEIRA MALLET

**UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS NA
CONSERVAÇÃO DE QUEIJOS TIPO QUARK**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 23 de Fevereiro de 2011.

Dra. Adelir Aparecida Saczk UFLA

Dra. Josefina Aparecida de Souza UFLA

Dr. Luiz Ronaldo de Abreu UFLA

Dra. Sueli Ciabotti IFET

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS-MG

2011

*Aos meus pais Valmir Mallet e Mara Mallet, pela confiança, amor e
preocupação.*

*Aos meus irmãos Alan, Alex e Max (in memoriam), pelo apoio ainda que de
longe.*

*Aos meus amigos Karol, Wander e Milene, pela companhia ao longo das
intermináveis jornadas de trabalho.*

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela proteção e a vida e por todas as bênçãos.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, pela orientação, credibilidade, amizade e confiança durante todo o tempo.

Ao professor Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pelo apoio durante todo o experimento, pelos ensinamentos e pela amizade formada.

À professora Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, por todo carinho e gentileza.

A todos os professores do Departamento de Ciência dos Alimentos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários das secretarias de graduação e pós-graduação do Departamento de Ciência dos Alimentos, pela paciência.

Aos funcionários das secretarias de graduação e pós-graduação do Departamento de Química, pela paciência e atenção disponibilizada.

Às funcionárias responsáveis pela limpeza em especial a Heloísa, pelos momentos de descontração.

À funcionária Cleuza do Laboratório de Laticínios, pela força e ajuda dada durante toda a fase de experimento e, sobretudo pela amizade.

À amiga Milene Aparecida Andrade, pela amizade e companheirismo em todos os momentos, principalmente nas “horas extras” de trabalho, que durante algum tempo tornaram-se rotina. Muito obrigada!

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica, a todos, por contribuírem para a realização deste trabalho. Em especial, à Maria Luisa Teixeira, Marcos Souza e Jorge Bispo, pela amizade e pelos momentos de ajuda durante a fase final do doutorado. Obrigada!

Aos demais colegas, Gustavo, Masson, Leonardo, Paula, Rafaela, Shirley, Cleusa e Hebe, que passaram por lá, mas deixaram o carinho e a saudade.

À Ana Carolina Lemes (Calolxinha), pela amizade, companheirismo, alegria, pelos momentos bons e ruins que passamos juntas. Muito obrigada.

Ao Wander Arantes, pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo. Obrigada.

À amiga Ana Maria de Machado Resende, pela alegria, pelos ensinamentos e pela convivência excelente.

Aos amigos de pós-graduação Lívia Martinez, Janine França, Belami Silva, que tanto me ajudaram nessa caminhada com muita alegria, diversão e trabalho.

Ao meu pai, que me deu o início da formação e ensinou a respeitar ao próximo, sendo sempre incentivador ativo da minha carreira. Obrigada!

À minha mãe, por todo amor, por ter sido a disciplinadora de minha vida, sabendo incentivar com ternura e firmeza, com confiança e certeza de que não havia o obstáculo que tantas vezes criei. Obrigada!

E àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho.

RESUMO

A atual tendência adotada pelos órgãos legisladores da produção de alimentos e pelos consumidores tem exigido uma progressiva retirada de aditivos químicos na produção destes. Esta tendência tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos alternativos para alcançar suas metas relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos finais à ação de micro-organismos, bem como em desenvolver novos produtos que atendam a este nicho de mercado. Entre os produtos de origem vegetal, os óleos essenciais, vêm se destacando por suas atividades biológicas e possíveis realçadores de sabor. Nesse contexto, objetivou-se neste estudo determinar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais de *Allium sativum* (alho) e *Origanum vulgare* (orégano), avaliar a sua atividade antioxidante e antibacteriana, desenvolver um queijo tipo quark com a adição destes óleos (inovação tecnológica), realizar análises sensoriais para se conhecer o nível de aceitação dos queijos, bem como avaliar o tempo de vida útil dos mesmos sob refrigeração. A obtenção do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado, e a identificação e quantificação dos constituintes, pelas análises em GC-MS e GC-FID. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica Difusão cavidade em Agar e por vapor, utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e o método de sequestro de radicais DPPH. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de orégano foram o 4-terpineol (27,03%), γ -terpineno (20,04%), β -cimeno (6,34%), carvacrol (4,22%), linalol (4,61%), α -terpineol (3,34%), o-cimeno (2,77%), terpineno (2,09%), e para óleo essencial de alho foram o dialil trissulfeto (38,81%), dialil dissulfeto (25,23%) e o metil alil trissulfeto (12,52%). Os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana satisfatória, tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas. A atividade antioxidante foi evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoleico para *O. vulgare* e *A. sativum*, respectivamente, e pelo teste do DPPH, foi observada apenas para *O. vulgare*. A produção de queijos tipo quark com óleo essencial de orégano e alho é viável, tendo em vista a boa aceitação dos consumidores.

Palavras-chave: Óleo essencial. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Quark.

ABSTRACT

The current tendency adopted by the foods production legislating agencies and by the consumers has been demanding a progressive removal of chemical additives from their production. This tendency has been driving the foods industry to look for alternative compounds to reach their goals related to the microbial stability of their final products to the action of microorganisms, as well as in developing new products to enter this market niche. Among the products of plant origin, the essential oils can be highlighted for their biological activities and as possible flavor enhancers. In that context, the objective of this study was determine the yield and chemical composition of the essential oils of *Allium sativum* (garlic) and *Origanum vulgare* (oregano), to evaluate their antioxidant and antibacterial activity, to develop a quark type cheese with the addition of these oils (technological innovation), to conduct sensorial analyses to determine the acceptance level of such cheeses, as well as to evaluate their useful life under refrigeration. The obtaining of the essential oil was accomplished by the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of the constituents, by GC-MS and GC-FID analyses. The evaluation of the antibacterial activity was conducted through the Agar Well Difusion technique and by vapor, using the microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. The antioxidant activity was evaluated using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH radical sequestering method. In the chromatographic analyses, the majority constituents found in the essential oil of oregano were the 4-terpineol (27.03%), γ -terpinene (20.04%) β -cymene (6.34%), carvacrol (4.22%), linalool (4.61%) α -terpineol (3.34%), o-cymene (2.77%), terpinene (2.09%), and for garlic essential oil were diallyl trisulfide (38.81%), diallyl disulfide (25.23%) and allyl methyl trisulfide (12.52%). The essential oils presented satisfactory antibacterial activity, for Gram-negative bacteria as well as for Gram-positive. The antioxidant activity was observed by the β -carotene/linoleic test for *O. vulgare* and *A. sativum*, respectively, and for the DPPH test, it was only observed for *O. vulgare*. The production of quark type cheeses with essential oil of oregano and garlic is viable, keeping in mind good consumer acceptance.

Keywords: Essential oil. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Quark.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas metabólicas dos metabólitos secundários.....	20
Figura 2	Biossíntese de terpenos via mevalonato.....	24
Figura 3	Biossíntese de terpenos via DXPS.....	25
Figura 4	Biossíntese de fenilpropanoides.....	26
Figura 5	Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria.....	30
Figura 6	Aspecto geral da espécie orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	40
Figura 7	Aspecto geral do bulbo de alho (<i>Allium sativum</i>).....	41
Figura 8	Fluxograma do processo de produção do queijo quark.....	55
Figura 9	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	64
Figura 10	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo de <i>Allium sativum</i>	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito inibitório do óleo essencial de <i>O. vulgare</i> frente às bactérias testadas através da análise univariada.....	69
Gráfico 2	Efeito inibitório do óleo essencial de <i>A. sativum</i> frente às bactérias testadas através da análise univariada.....	70
Gráfico 3	Mapa de Preferência Interno para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (<i>O. vulgare</i>) nas diferentes concentrações.....	80
Gráfico 4	Mapa de Preferência Interno para o atributo aspecto global para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (<i>O. vulgare</i>) nas diferentes concentrações.....	81
Gráfico 5	Mapa de Preferência Interno para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (<i>A. sativum</i>) nas diferentes concentrações.....	82
Gráfico 6	Curva de densidade de preferência para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (<i>A. sativum</i>) nas diferentes concentrações.....	82
Gráfico 7	Mapa de Preferência Interno para o atributo aspecto global para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (<i>A. sativum</i>) nas diferentes concentrações.....	83
Gráfico 8	Curva de densidade de preferência para o atributo aspecto global para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (<i>A. sativum</i>) nas diferentes concentrações.....	84
Gráfico 9	Mapa de Preferência Interno para o atributo intenção de compra para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (<i>O. vulgare</i>) nas diferentes concentrações.....	85
Gráfico 10	Mapa de Preferência Interno para o atributo intenção de compra para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (<i>A. sativum</i>) nas diferentes concentrações.....	86
Gráfico 11	Representação gráfica (spiderweb plot) dos atributos pH, acidez, umidade, gordura, proteína total e cinzas do queijo quark adicionado de OEO e OEA nas diferentes concentrações ao longo do tempo.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores médios dos rendimentos dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Allium sativum</i> , expressos em p/p BLU (base livre de umidade).....	62
Tabela 2	Compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	64
Tabela 3	Compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>A. sativum</i>	66
Tabela 4	Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> e <i>Allium sativum</i> encontrada para os micro-organismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella Choleraesuis</i>	69
Tabela 5	Concentração mínima inibitória do óleo essencial de <i>Allium sativum</i> encontrada para os micro-organismos <i>E.coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. Choleraesuis</i>	73
Tabela 6	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> e <i>A. sativum</i> e dos padrões, Timol e Ácido ascórbico, pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)....	76
Tabela 7	Valores médios dos atributos sensoriais sabor, aspecto global e intenção de compra para os queijos produzidos com óleo essencial de orégano nas diferentes concentrações.....	78
Tabela 8	Valores médios dos atributos sensoriais sabor, aspecto global e intenção de compra para os queijos produzidos com óleo essencial de alho nas diferentes concentrações..	79
Tabela 9	Média geral dos atributos pH, acidez, umidade, gordura, proteína total e cinzas ao longo do tempo.....	88

LISTA DE SIGLAS

ANAVA	Análise de variância univariada
BHA	Butil-hidróxi-anisol
BHI	Caldo-infusão de cérebro e coração
BHT	Butil-hidróxi-tolueno
BPA	Ágar Baird Parker
CMI	Concentração inibitória mínima
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
DXPS	Via 1-deoxi-D-xilulose
EC	Caldo Escherichia coli
FAL	Enzima fenilalanina amonialiase
GC/MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
HMGC _o A	3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA
IPP	Isopentenilpirofosfato
NMP	Número mais provável
OEA	Óleo essencial de alho
OEO	Óleo essencial de orégano
PG	Galato de propila
RTIQ	Regulamento técnico de identidade e qualidade
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
TSA	Triptic Soy Agar
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UNIPAC	Universidade Presidente Antônio Carlos
VB	Caldo verde brilhante
WHO	WORLD HEALTH ORGANIZATION

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Substâncias naturais.....	17
2.2	Metabolismo secundário.....	18
2.3	Óleos essenciais.....	21
2.3.1	Biossíntese de terpenoides.....	23
2.3.2	Biossíntese de fenilpropanoides.....	25
2.4	Método de extração por hidrodestilação de óleos essenciais.....	26
2.5	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	27
2.6	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	30
2.7	Contaminantes de alimentos.....	34
2.7.1	<i>Escherichia coli</i>	34
2.7.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.7.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
2.7.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	37
2.7.5	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	38
2.8	Condimentos.....	39
2.8.1	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	39
2.8.2	Alho (<i>Allium sativum</i>)	40
2.9	Queijo Quark.....	42
2.10	Análise sensorial.....	43
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Obtenção do material vegetal.....	45
3.2	Extração do óleo essencial.....	45
3.2.1	Determinação da umidade.....	45
3.3	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	46
3.4	Atividade biológica dos óleos essenciais.....	47
3.4.1	Manutenção e ativação das culturas bacterianas.....	47
3.4.2	Padronização dos inóculos.....	48
3.4.3	Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias.....	48
3.4.3.1	Teste de difusão cavidade em ágar.....	48
3.4.3.2	Difusão por vapor (disco).....	50
3.4.3.3	Análise estatística.....	50
3.5	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	51
3.5.1	Padrões utilizados.....	51
3.5.2	Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).....	51
3.5.2.1	Análise estatística.....	52

3.5.3	Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico.....	52
3.5.3.1	Análise estatística.....	54
3.6	Fabricação do queijo.....	54
3.7	Amostragem e tratamentos utilizados.....	56
3.8	Determinação da vida de prateleira.....	56
3.8.1	Análises microbiológicas.....	56
3.8.1.1	Preparo das amostras.....	56
3.8.1.2	Determinação de coliformes a 35 °C e termotolerantes (45 °C).....	57
3.8.1.3	Determinação de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
3.8.1.4	Determinação de <i>Salmonella</i> sp.....	58
3.8.2	Análises físico-químicas.....	58
3.8.2.1	Preparo das amostras.....	58
3.8.2.2	pH.....	58
3.8.2.3	Umidade.....	59
3.8.2.4	Acidez titulável.....	59
3.8.2.5	Gordura.....	59
3.8.2.6	Cinzas.....	59
3.8.2.7	Proteína total.....	60
3.8.2.8	Análise estatística.....	60
3.9	Análise sensorial.....	60
3.9.1	Teste de aceitação.....	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1	Rendimento.....	62
4.2	Constituintes químicos dos óleos essenciais.....	63
4.2.1	<i>Origanum vulgare</i> (orégano).....	63
4.2.2	<i>Allium sativum</i> (alho).....	66
4.3	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	68
4.4	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	74
4.5	Análise sensorial.....	78
4.6	Análise da vida útil.....	86
4.6.1	Análises físico-químicas.....	87
4.6.2	Análises microbiológicas.....	89
5	CONCLUSÃO	92
	REFERÊNCIAS	93
	ANEXOS	108

1 INTRODUÇÃO

A atual tendência do mercado de alimentos é a busca pelos consumidores por produtos diferenciados, com alto valor nutricional, saudáveis e isentos, ou com o mínimo possível, de aditivos químicos. Esta tendência tem conduzido a indústria de alimentos a buscar compostos alternativos para alcançar suas metas relacionadas à estabilidade microbiana dos seus produtos finais à ação de micro-organismos causadores de deterioração e/ou patgênicos, bem como no desenvolvimento de novos produtos que atendam a este nicho de mercado.

É crescente o interesse das indústrias de alimentos, por matérias-primas de origem natural o que vem impulsionado à pesquisa de produtos naturais, em especial os óleos essenciais, objetivando o seu isolamento, caracterização e o estudo das suas propriedades.

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, também conhecidos como óleos voláteis, etéreos ou simplesmente essências. Pesquisas com óleos essenciais têm recebido maior atenção tanto de indústrias quanto de círculos acadêmicos devido ao crescente aumento na demanda pelos consumidores por alimentos nutritivos e saudáveis, e a necessidade de técnicas alternativas para assegurar a qualidade e segurança de alimentos

Seu uso em alimentos vem ganhando importância por apresentarem componentes naturais, evitando-se o uso de aditivos sintéticos, deteriorações, oxidações e o ataque de micro-organismos, apresentando eficiência nas funções antioxidantes e antimicrobianas em alimentos. Assim, sua utilização tem interessado as indústrias, em especial as alimentícias, tornando o estudo dos seus efeitos em micro-organismos uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos, e possibilitando a criação de tecnologias de fabricação

de alimentos empregando-se os óleos essenciais, minimizando ao máximo sua influência negativa sobre o aroma e sabor do produto.

No entanto, quando trata-se de trabalhos que relacionem o poder inibitório ao uso destes óleos em alimentos e, a sua influência nas características sensoriais, há evidências da escassez de publicações e da necessidade de estudos nesse sentido. A determinação da concentração ideal que exerça, simultaneamente, efeito antimicrobiano e realçador de sabor e aroma, é fundamental para a utilização dos óleos essenciais de plantas, em substituição aos aditivos sintéticos.

O segmento da área de laticínios vem sendo marcado nos últimos anos por um aumento na variedade de produtos. O leite e seus derivados, fontes de cálcio, são produtos conceituados como de alto valor nutricional. Os consumidores estão cada vez mais exigentes na seleção de produtos alimentícios, por isso é importante que a inovação tecnológica atenda às expectativas destes consumidores, no intuito de oferecer produtos diferenciados, saudáveis e com qualidade.

Face ao exposto, objetivou-se com o presente trabalho determinar o rendimento e a composição química dos óleos essenciais de *Allium sativum* (alho) e *Origanum vulgare* (orégano), avaliar a sua atividade antioxidante e antibacteriana, desenvolver um queijo tipo quark com a adição destes óleos (inovação tecnológica), realizar análises sensoriais para se conhecer o nível de aceitação dos queijos, bem como avaliar o tempo de vida útil dos mesmos sob refrigeração.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A indústria de alimentos vem buscando técnicas alternativas para substituir os métodos tradicionais de controle de micro-organismos nos alimentos, como o uso do calor, acidificação, congelamento, desidratação, adição de sal e agentes químicos. Nos últimos anos, as tecnologias mais estudadas são as de inativação de micro-organismos por métodos não térmicos, como o uso de alta pressão, sistemas de embalagens ativas ou com atmosfera modificada e bioconservação e utilização de compostos antimicrobianos naturais. Dentre estes últimos, merecem destaque os óleos essenciais (ERNANDEZ; GARCIA-CRUZ, 2007).

2.1 Substâncias naturais

Nos últimos anos os consumidores passaram a exigir alimentos com mais qualidade, sem conservantes químicos e com longa vida útil. Assim, a utilização dos mesmos para a preservação de alimentos não é compatível com a imagem de produtos frescos/saudáveis.

Os compostos de natureza vegetal, em especial as especiarias e seus produtos derivados (óleos essenciais e extratos), apresentam um potencial relevante como agentes de inibição do crescimento de micro-organismos, mostrando que elementos que se apresentavam apenas como vetores de aromas e gostos característicos, atualmente apresentam uma nova perspectiva de emprego (SOUZA; LIMA; NARAIM, 2003).

Desta forma, tem-se observado uma crescente busca por produtos naturais com atividades biológicas que minimizem o impacto ambiental e na saúde causado por diversas substâncias sintéticas. As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, embora os vegetais

contenham milhares de constituintes químicos, as propriedades relacionadas a eles estão especialmente ligadas aos chamados metabólitos secundários.

2.2 Metabolismo secundário

Uma das características dos seres vivos é a presença de atividade metabólica. No caso das células vegetais, o metabolismo é dividido em primário e secundário. Os compostos envolvidos no metabolismo primário possuem uma distribuição universal nas plantas. Em contrapartida, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal, pois não são necessários para todas as plantas (SANTOS, 2007).

Durante muito tempo, acreditou-se que os metabólitos secundários fossem produzidos sem uma função específica, simplesmente como produtos finais das reações. Chegaram a ser considerados até como anomalias; porém, com o surgimento de estudos relacionados com as plantas, tem-se descoberto cada vez mais sobre a função dessas substâncias, sua utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seu papel como mediadores das interações entre as plantas e outros organismos (SIMÕES et al., 2007).

Embora o metabolismo secundário nem sempre seja necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, ele desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Um dos principais componentes do meio externo cuja interação é mediada por compostos do metabolismo secundário são os fatores bióticos (BAKKALI et al., 2008). Desse modo, Simões et al. (2007) afirmam que os produtos secundários possuem um papel contra a herbivoria, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microorganismos simbiotes. Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com

mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais.

De fato, os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é freqüentemente afetada por condições ambientais (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Estudos mostram que determinadas plantas podem variar a concentração de óleo dentro de uma mesma espécie, influenciadas por fatores hereditários, que dizem respeito às interferências quantitativas e qualitativas, e por fatores ontogênicos, como solo, clima e micro-organismos (CARDOSO et al., 2001).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários, os terpenos, os compostos fenólicos e os alcalóides. Os terpenos são formados a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou do ácido chiquímico junto com o ácido mevalônico, e os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina) e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (BAKKALI et al., 2008).

A origem de todos esses metabólitos pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos e os fenilpropanóides. Os derivados do acetato podem ser originados pela via do ciclo do ácido cítrico, dando origem aos alcalóides, aos glicosídeos e glicosinolatos; pela via do mevalonato, originam os derivados isopreno e, pela condensação da acetil-coA, formam-se os ácidos graxos e acetogênicas (SIMÕES et al., 2007). Na Figura 1 encontra-se um esquema ilustrativo da rota metabólica do metabolismo secundário.

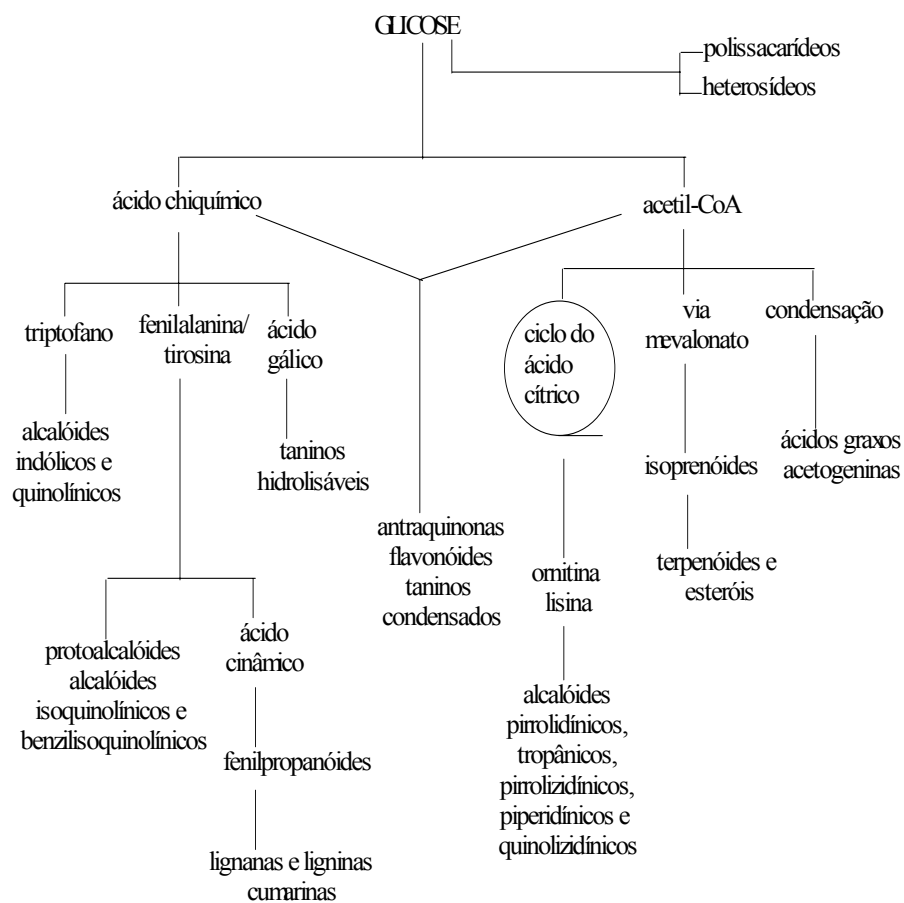


Figura 1 Rotas metabólicas dos metabólitos secundários
 Fonte: Simões et al. (2007)

Dentre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com maior atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais (PEREIRA et al., 2007).

2.3 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos complexos naturais, voláteis, caracterizados por um forte odor e constituído por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Conhecido pela sua atividade anti-séptica, ou seja, bactericida, fungicida e virucida e propriedades medicamentosas e flavorizantes, são usados em embalsamentos, conservação dos alimentos, analgésicos, sedativos, antiinflamatório, antiespasmódico e anestésico local. Essas características não se alteraram muito, exceto que agora são mais conhecidos alguns de seus mecanismos de ação, particularmente para o efeito antimicrobiano (BAKKALI et al., 2008).

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas mediante destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Bandoni e Czepak (2008) são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; poucos são os óleos que apresentam cor, em geral, são muito instáveis, principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais.

Quimicamente, a maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, preponderando esses últimos. Apresentam de 20 a 60 compostos em mistura, sendo um, dois ou três deles majoritários em termos de porcentagem (BAKKALI et al., 2008).

Simões et al. (2007) afirmam que dependendo da família, os óleos essenciais podem ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização.

No ambiente natural, os óleos essenciais estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros, e também na atração de alguns insetos e outros agentes de fecundação, como pássaros e morcegos (BAKKALI et al., 2008).

De acordo com Bandoni e Czepak (2008) a composição dos óleos essenciais está constantemente em transformação, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando-se uns constituintes em outros, segundo a parte da planta, o momento do seu desenvolvimento ou o momento do dia podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores da natureza e o procedimento de cultivo das plantas e de obtenção.

Por suas propriedades já observadas na natureza, ou seja, pelas atividades antibacteriana, antifúngica e inseticida os óleos essenciais têm sido largamente utilizados. São empregados na indústria de alimentos como flavorizantes, conservantes e aditivos; de cosméticos como perfumes, bem como na indústria farmacêutica, pelas suas propriedades farmacológicas (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004).

2.3.1 Biossíntese de terpenoides

De acordo com Simões et al. (2007) os terpenoides são sintetizados via mevalonato no citoplasma, o qual é formado por condensação de uma unidade da acetoacetil-CoA com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA). Posteriormente, o HMG-CoA sofre uma redução por um processo que depende de NADPH e é catalisado pela HMGCoA-redutase a mevalonato que, por sua vez, é convertido em isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalilpirofosfato (DMAPP). O IPP e o DMAPP condensam-se formando o transgeranilpirofosfato, que dará origem aos monoterpenos e sesquiterpenos. Com a polimerização, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, conforme a Figura 2.

Segundo Dewick (2009) a produção do IPP pode também ocorrer no cloroplasto (plastídios), pela via 1-deoxi-D-xilulose conhecida como via DXPS, iniciando com a condensação de uma molécula de piruvato e outra D-gliceraldeído-3-fosfato, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; após reações sucessivas, a molécula de IPP e de DMAPP são formadas (Figura 3). As moléculas de IPP e DMAPP formadas em ambas as vias condensam-se e originarão o trans-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpenos. Devido à polimerização do trans-geranilpirofosfato com IPP, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, que dará origem aos monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos) e assim por diante.

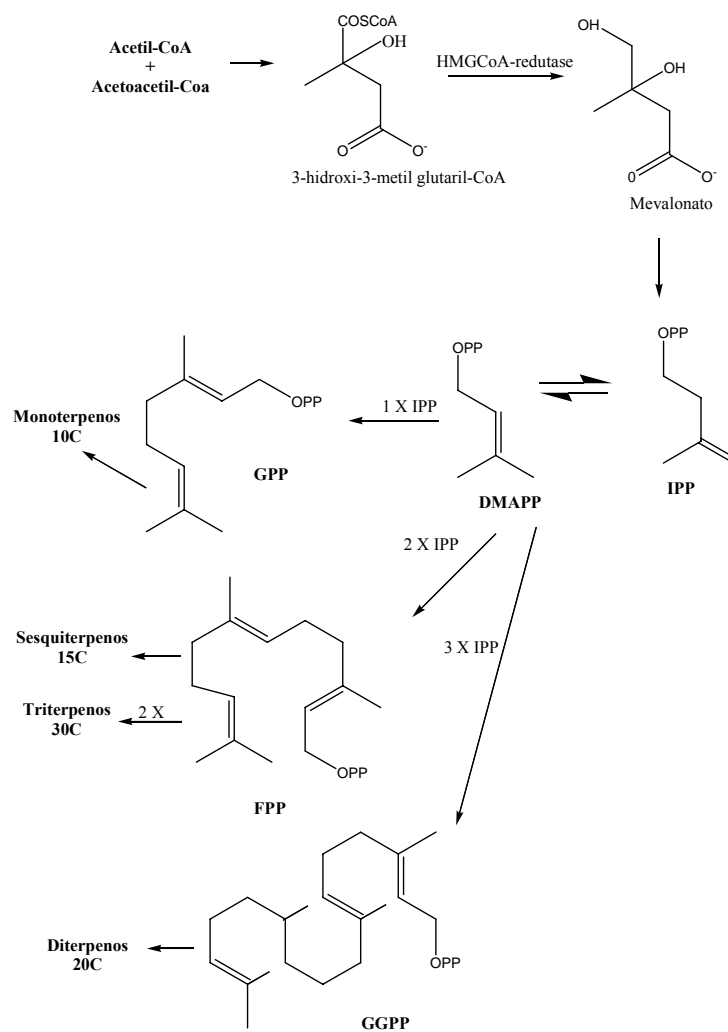


Figura 2 Biossíntese de terpenos via mevalonato
 Fonte: Simões et al. (2007)

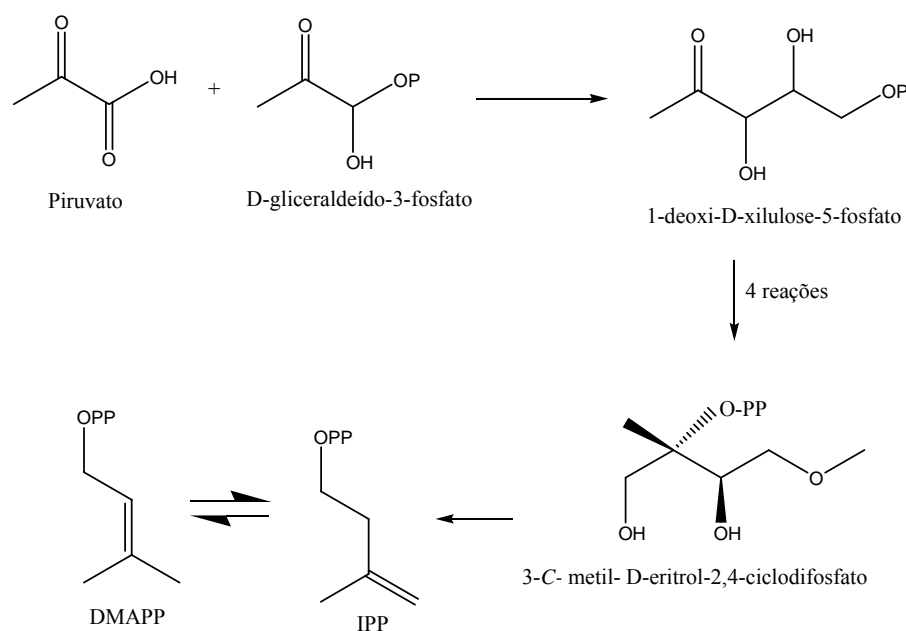


Figura 3 Biossíntese de terpenos via DXPS
 Fonte: Dewick (2009)

2.3.2 Biossíntese de fenilpropanóides

Os fenilpropanóides derivam da rota que inicia com a formação do ácido chiquímico, dando origem à fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), perde uma molécula de amônia resultando na formação dos ácidos cinâmico e p-cumárico, respectivamente (Figura 4). Portanto, por meio de várias reações são formados os fenilpropanóides, tais como eugenol e aldeído cinâmico, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

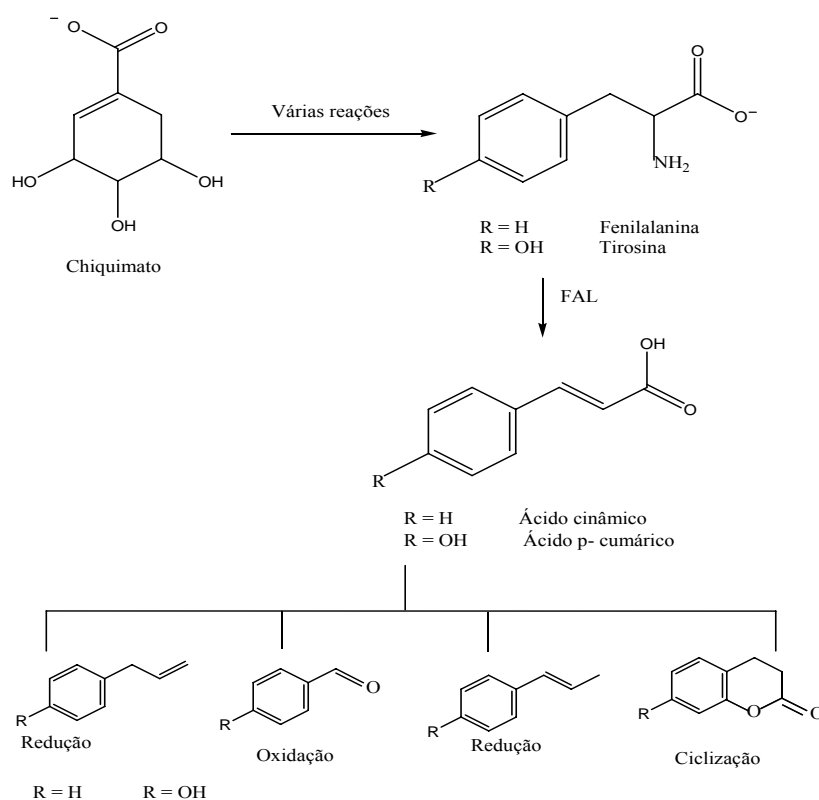


Figura 4 Biossíntese de fenilpropanoides
 Fonte: Simões et al. (2007)

2.4 Método de extração por hidrodestilação de óleos essenciais

Existem inúmeras técnicas utilizadas para a extração de óleos essenciais que são escolhidas de acordo com a necessidade e o material disponível. Dentre estas podem ser citadas a enfloração, extração por CO_2 supercrítico, prensagem, destilação por arraste a vapor de água e hidrodestilação, que estão cada vez mais aperfeiçoadas e viabilizam a produção com uma determinada composição e pureza desejada (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). No entanto, a

mais usada, em laboratório, é a hidrodestilação, e na indústria as mais empregadas são o CO₂ supercrítico e a prensagem. Tal fato justifica-se pela facilidade, simplicidade e, o bom rendimento obtido.

Para a obtenção dos óleos essenciais por hidrodestilação, o material vegetal entra em contacto com a água e, juntos, são levados à ebulição; os vapores gerados são condensados e o óleo essencial que é imiscível na água, é posteriormente separado. O equipamento recomendado para esse tipo de extração em escala laboratorial é o aparelho de Clevenger modificado (SIMÕES et al., 2007; BANDONI; CZEPAK, 2008).

2.5 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Os óleos essenciais possuem grande potencial na moderna nutracêutica, uma vez que estes materiais, além de serem utilizados em alimentos e fármacos, têm sido usados na prevenção e tratamento de diversas doenças (ÁVARO et al., 2008; DEMIRCI et al., 2008). Além disso, muitos óleos essenciais e compostos isolados destes têm sido recentemente reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais, os quais poderiam ser utilizados como substitutos potenciais aos antioxidantes sintéticos (BOZIN et al., 2006; MIMICA-DUKIC et al., 2004; RUBERTO; BARATTA, 2000).

Desta forma, muitas plantas aromáticas têm sido atualmente consideradas como importantes fontes para a extração de compostos com atividades antioxidante e antimicrobiana.

De acordo com Cansian et al. (2010) substâncias antioxidantes são aquelas que inibem e/ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diferentes substâncias antioxidantes que podem ser endógenas, como a enzima superóxido dismutase ou podem ser provenientes

da dieta alimentar, como ácido ascórbico, α -tocoferol, carotenóides e polifenóis. Quando ocorre limitação na disponibilidade de antioxidantes, podem ocasionar lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUSA et al., 2005).

As espécies reativas são formadas continuamente durante os processos metabólicos, normais ou patogênicos ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Tais espécies atuam como mediadores da transferência de elétrons e em vários processos bioquímicos, como a fagocitose, fenômeno em que espécies reativas de oxigênio, H_2O_2 , ClO^- e 1O_2 , são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação (CANSIAN et al., 2010). Porém, quando em concentração excedente ao normal, essas espécies podem causar duas categorias de efeitos potencialmente importantes: danos celulares, ao atacar membranas, proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos, com consequente alteração funcional e prejuízo das funções vitais em diversos tecidos adiposo, vascular e cerebral, e órgãos, como músculo e fígado, ocasionando eventualmente algumas doenças, e ativação de caminhos de sinalização (MULLER et al., 2007).

O oxigênio (O_2) envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em espécies reativas do oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), 1O_2 (oxigênio singlete), radical hidroxila (OH^{\cdot}), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical lipídico (L^{\cdot}), entre outros (GUTIERREZ, 2002; WICKENS, 2001).

De acordo com Andrade et al. (2007) os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células. Os radicais formados a partir de antioxidantes não são reativos para propagar a reação em cadeia, sendo neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser captados por outro antioxidante.

Em termos alimentares, a deterioração de óleos e gorduras é responsável pelos odores e sabores rançosos, com consequente decréscimo da qualidade e

segurança nutricionais, causado pela formação de produtos secundários, potencialmente tóxicos. Assim, a adição de antioxidantes é requerida para preservar sabor e odor, além de evitar destruição de vitaminas.

Na indústria alimentícia, o processo de oxidação lipídica é inibido por substâncias sintéticas como o α -tocoferol, butil-hidróxi-tolueno (BHT), butil-hidróxi-anisol (BHA), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG), que são seqüestradores de radicais livres. Contudo, estudos têm demonstrado que estas substâncias apresentam alguns efeitos tóxicos (YESILYURT et al., 2008) (Figura 5).

No Brasil, o uso dessas substâncias antioxidantes é controlado pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da RDC Nº 64, de 16 de setembro de 2008, limitando as concentrações máximas de uso para $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$ para TBHQ, BHA, BHT e PG (BRASIL, 2008; RAMALHO; JORGE, 2006).

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos, além disso, tem se observado um aumento nas pesquisas voltadas a busca por antioxidantes de ocorrência natural.

Assim, além da promoção de saúde eles têm um papel importante nas indústrias alimentícias para evitar o processo de oxidação lipídica em alimentos responsável pelo aroma e a formação de compostos indesejáveis podendo substituir antioxidantes sintéticos (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Dentro dessa perspectiva muitos componentes produzidos por plantas têm sido objeto de pesquisas em relação ao potencial antioxidante, demonstrando resultados promissores. Entre eles têm-se os óleos voláteis (CAO

et al., 2009; WANG et al., 2008) e componentes não voláteis testados na forma de extratos (CHAN et al., 2008; SAFAEI-GHOMI et al., 2009).

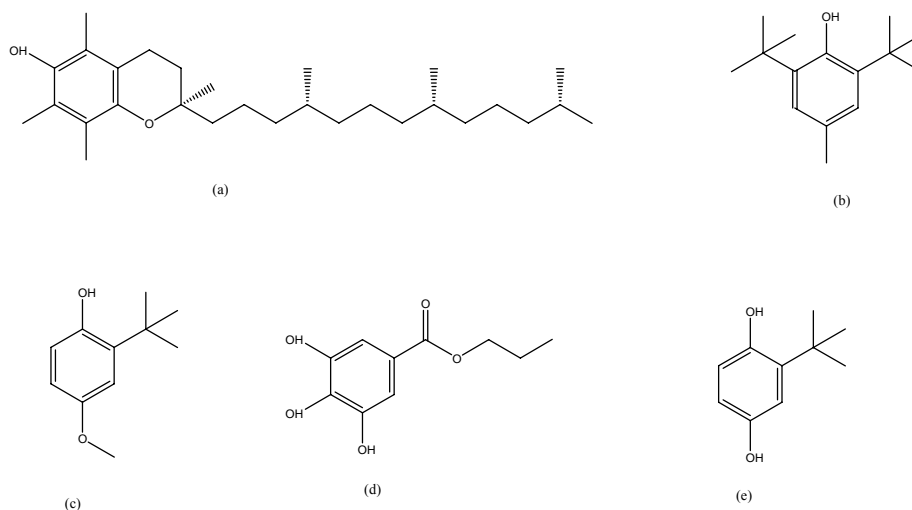


Figura 5 Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria (a) α - Tocoferol, (b) BHT, (c) BHA, (d) PG e (e) TBHQ

Desta forma, a substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens devido a implicações na área de saúde e na funcionalidade.

2.6 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

A indústria alimentícia apresenta como propósito a produção de alimentos com uma longa vida útil ligada a uma inocuidade no que diz respeito à presença de micro-organismos patogênicos e deterioradores, sobretudo suas toxinas. A pressão quanto ao uso indiscriminado de aditivos químicos cresce e tem-se tornado alvo de críticas por grande parte dos consumidores.

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido consideradas a base de várias aplicações, incluindo preservação de

alimentos e produção de fármacos alternativos. Este aspecto assume uma relevância particular devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos (CANSIAN et al., 2010).

Há registros, pela Comissão Européia, do uso de alguns componentes de óleos essenciais para utilização como aromatizantes em gêneros alimentícios. Estes são caracterizados por não apresentarem qualquer risco à saúde do consumidor e incluem o carvacrol, carvona, eugenol, limoneno, mentol e timol (OLIVEIRA et al., 2011).

No que diz respeito à atividade antimicrobiana em alimentos, estes podem servir como substrato para o crescimento microbiano e produção de toxinas e, de acordo com a forma tradicional de uso, as especiarias e ervas adicionadas aos alimentos são geralmente empregadas em quantidades insuficientes para evitar a deterioração por micro-organismos (CEYLAN; FUNG, 2004). Entretanto, os componentes ativos em baixas concentrações podem interagir sinergicamente com outros fatores (NaCl, ácidos e conservantes) aumentando o efeito conservante. Sabe-se, que a diminuição da atividade antimicrobiana de especiarias e ervas nos alimentos pode ser devido à compartimentação dos componentes ativos para a fase lipídica (CEYLAN; FUNG, 2004).

Assim, a substituição de aditivos sintéticos por naturais dependerá, fundamentalmente, da concentração ideal. Ou seja, não basta inibir o crescimento microbiano, deve haver um sinergismo entre a concentração que possua ação antimicrobiana e que, no entanto, não altere o sabor dos alimentos de forma negativa.

Os óleos essenciais de inúmeras espécies de plantas podem atuar como agentes naturais na preservação de alimentos, sendo estes acrescidos durante o

processamento, inibindo o crescimento de bactérias e fungos (ERNANDEZ; GARCIA-CRUZ, 2007).

O modo de ação que provoca a inibição de micro-organismos por óleos essenciais e seus compostos químicos envolve diferentes mecanismos, dependendo dos componentes majoritários do óleo essencial (SOUZA et al., 2005). Entretanto, além de se conhecer a ação dos componentes majoritários dos óleos essenciais isoladamente, deve-se considerar a ação sinérgica das moléculas que os compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos componentes majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, na distribuição celular e na fixação destes nas paredes e membranas (LIOLIOS et al., 2009; PROESTOS et al., 2008).

Os óleos essenciais apresentam uma complexidade química que lhes conferem uma baixa especificidade, assim sua atividade antibacteriana não pode ser explicada por um único mecanismo de ação, pois todos os componentes da célula bacteriana tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos (BAKKALI et al., 2008; CARSON; MEE; RILEY, 2002). Entretanto, poucos são os estudos que evidenciam tais mecanismos de ação.

Uma importante característica dos óleos essenciais é a lipofilicidade, o que permite que estes passem através da parede celular e membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, quebrando-os e, assim, alterando a permeabilidade dessas organelas (BAKKALI et al., 2008).

Pires (2007) estudou o efeito inibitório de óleos essenciais de citros sobre o crescimento de micro-organismos e verificou que, os halos de inibição produzidos pelos óleos essenciais, da casca e da folha, em placas contendo as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, foram medidos, revelando o efeito inibitório destes óleos sobre ambas as bactérias. De forma semelhante, Pereira et al. (2008) verificaram em testes in

vitro que os óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), orégano (*Origanum vulgare*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) promoveram efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Entretanto quando avaliaram o efeito sinérgico dos óleos sobre as mesmas bactérias, não observaram diferenças significativas.

Recentemente Pessoa et al. (2010) avaliaram os óleos essenciais de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliiana* quanto as suas propriedades antimicrobianas, frente a um painel de bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*) e Gram-positivas (*S. aureus* e *Bacillus subtilis*) e concluíram que os óleos mostraram atividade antibacteriana de largo espectro, inibindo o crescimento de todas as espécies de bactérias testadas.

A seguir, no Quadro 1, é apresentada a eficácia de alguns agentes antimicrobianos de derivados de plantas em alimentos.

Quadro 1 Eficácia dos agentes antimicrobianos naturais de plantas, quando utilizados em alimentos; (a) bactericida, (b) bacteriostático, (c) pouco ou nenhum efeito

Agente antimicrobiano	Concentração	Alimento	Micro-organismo	Efeito
Manjeriçã	1% (w/v)	Molho de espaguete	<i>Shigella spp.</i>	b,c
Óleo de manjeriçã	1%	Suco de tomate	<i>Lb. curvatus</i>	a
Carvacrol	3%	Peixe	<i>S. typhimurium</i>	a
Óleo de canela	1% (v/v)	Queijo	<i>L. monocytogenes</i>	a
Eugenol	2%	Carne cozida	<i>A. hydrophila</i>	a,b
Alho	4%	Lingüiça	Microbiota natural	b,c
Orégano	0,05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b
Óleo de orégano	0,08% (v/v)	Filé de carne	<i>S. typhimurium</i>	a
Tomilho	0,05% (v/v)	Peixe	Microbiota natural	b

Fonte: Holey e Patel (2005)

2.7 Contaminantes de alimentos

As doenças de origem alimentar, ou transmitidas por alimentos, são de vital interesse para saúde pública. Doenças transmitidas por alimentos (DTA) são definidas como qualquer doença infecciosa ou de natureza tóxica causada pelo consumo de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados. A maioria, no entanto, é de origem microbiana. (BRASIL, 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION-WHO, 2004).

De acordo com Jay (2005) as bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pois atuam sob numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como de condições do meio ambiente. Casos de DTA ocorrem diariamente em todos os países, mas como a maioria não é relatada, a verdadeira dimensão do problema é desconhecida (WHO, 2009).

2.7.1 *Escherichia coli*

A principal causa de doenças diarreicas é a ingestão de alimentos e/ou água contaminados por micro-organismos patogênicos. Um dos agentes etiológicos das infecções entéricas é a bactéria *Escherichia coli*, sendo a principal representante do grupo dos coliformes termotolerantes. Pertence à família Enterobacteriaceae, apresentam-se como bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 44,5 – 45°C (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

A espécie *Escherichia coli* inclui cepas não patogênicas que têm como habitat o trato entérico de humanos e animais sadios, e cepas altamente

patogênicas, responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. Sua presença em alimentos e água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerada o indicador clássico da possível presença de micro-organismos patogênicos (JAY, 2005; TORTORA, 2000).

Assim, contagens elevadas de *E. coli* relacionam-se à falta de higiene e falhas no processamento de alimentos. O leite e seus derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por este micro-organismo. Tem sido demonstrado que esta bactéria é capaz de sobreviver às condições de processamento de queijos, incluindo a maturação.

2.7.2 *Staphylococcus aureus*

Dentre os diversos tipos de micro-organismos que podem ser transmitidos pelo leite e seus derivados destaca-se o *Staphylococcus aureus*. Este é um patógeno contagioso da mastite sendo disseminado durante o processo de ordenha.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. Apresentam-se como cocos Gram-positivos, não esporulados, anaeróbio facultativo (JAY, 2005). É um organismo coagulase positivo, oxidase negativo e aeróbico facultativo; pode crescer em uma ampla margem de temperatura, tendo como limite mínimo e máximo 7°C e 49°C respectivamente, e a produção de toxinas ocorre na faixa de 10°C – 48°C, mas sua faixa ótima de sua produção é de 40°C - 45°C (TORTORA, 2000).

O hábitat principal de *Staphylococcus aureus* em humanos e animais é a mucosa naso-faríngea, onde forma parte da microbiota normal. Organismos presentes no nariz podem contaminar facilmente a pele, assim portadores nasais podem ser portadores cutâneos (FUEYO; MENDONZA; MARTIN, 2005).

Este micro-organismo pode causar toxinoses alimentares pela ingestão de toxinas termoestáveis produzidas nos alimentos, que são responsáveis pela sua patogenicidade. São classificadas em exo e endotoxinas, sendo as principais exotoxinas produzidas pelos estafilococos as enterotoxinas, que são as responsáveis pelas toxinoses e as maiores causadoras de surtos de toxinfecção durante diferentes etapas do processamento dos alimentos. As enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência de intoxicação (CASEY; LAMBERT; ELLIOTT, 2007).

2.7.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* tem sido a responsável pela maioria dos casos de doença infecciosa no homem, como infecções urinárias e respiratórias, pneumonias, meningites, endocardites e diversos outros tipos de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças (MALLETT et al., 2007).

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram negativa, aeróbica obrigatória, possui flagelos, não esporulada, capaz de crescer em ambientes simples e causa infecções crônicas por biofilmes em indivíduos imunocomprometidos (BOLLINGER et al., 2001; MASSAGUER, 2005). Essas infecções são notoriamente difíceis de se tratar, devido à alta resistência dos biofilmes a antibióticos (LEWIS, 2001; PARSEK; SINGH, 2003). São oxidase e catalase positiva que crescem a 37°C e a 42°C, possui o metabolismo oxidativo, tolera valores de pH relativamente altos e é capaz de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes (BERGEY'S Manual, 1994; MAC FADDIN, 1980; TRABULSI, 2002).

O gênero *Pseudomonas* é extremamente importante na indústria leiteira, por ser constituído por espécies capazes de se desenvolverem a uma temperatura igual ou menor a 7°C, independente da sua temperatura ótima de crescimento (ROBINSON, 1987).

2.7.4 *Listeria monocytogenes*

Segundo Jay (2005), a *L. monocytogenes* está representada por 13 sorovares, alguns dos quais são compartilhados por *L. innocua* e por *L. seeligeri*. Embora *L. innocua* esteja representada somente por três sorovares, muitas vezes esta é considerada uma variante não patogênica de *L. monocytogenes*. A grande heterogeneidade antigênica desta última espécie pode estar relacionada com o grande número de hospedeiros animais nos quais é capaz de multiplicar-se.

A espécie *Listeria monocytogenes* apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos, sendo não formadora de esporos, móveis (com flagelos peritríquios), catalase positiva, oxidase negativa, halotolerantes, desprovida de cápsula. É amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada do solo e fezes de humanos e de outros animais (ADAMS; MOSS, 2004; JAY, 2005). Crescem em temperatura de 1 a 45°C, sendo a faixa ótima de 30 a 37°C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0°C. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos. (FRANCO; LANDGRAF, 1996; MANTILLA et al., 2007).

De acordo com Jay (2005), das espécies de *Listeria*, a *L. monocytogenes* é o patógeno de importância para os humanos. Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, pode vir afetar principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes e recém-nascidos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 25 a 30% dos casos (KHELEF et al., 2005; SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

Segundo Silva e Junqueira (2007) a dose infectiva é desconhecida, mas, acredita-se variar conforme a cepa e a susceptibilidade do indivíduo atingido. O período de incubação é variável, havendo casos de surtos com períodos que vão de três a setenta dias após a exposição ao produto contaminado.

Os mecanismos pelos quais causa listeriose ainda não estão bem definidos. Sabe-se, entretanto, que a bactéria produz algumas toxinas, destacando-se as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas; responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos (MANTILLA et al., 2007).

2.7.5 *Salmonella Choleraesuis*

Salmonella é o principal agente de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo (WHO, 2005) e também no Brasil (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bastonetes, Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. O organismo apresenta crescimento ótimo a 37°C, sendo o pH 7 ideal, variando entre 4 e 9 (SILVA; JUNQUEIRA, 2007). Oficialmente o gênero apresenta duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorotipos, respectivamente (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004).

A *salmonella* é uma bactéria de ampla ocorrência em animais e, no ambiente, as principais fontes são a água, o solo e fezes de animais. A doença geralmente é contraída através do consumo de alimentos contaminados de origem animal, principalmente a carne bovina e de aves, ovos e o leite (JAY, 2005).

A *Salmonella enterica* causa gastrinterite, diarreia, dores abdominais, náusea, febre, calafrios e dores de cabeça. A febre tifoide é a mais grave de todas as doenças causadas por salmonelas, incluindo *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* e *C.* (JAY, 2005; KAKU et al., 1995). Complicações decorrentes das salmoneloses não são incomuns e, no caso das febres tifóide e paratifoide, pode atingir vários órgãos, provocando lesões.

2.8 Condimentos

Os condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Além desta utilidade, os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais.

2.8.1 Orégano (*Origanum vulgare*)

A espécie *Origanum vulgare* pertencente à família Lamiaceae é uma planta perene, aromática e condimentar. Também é conhecida como orégano, manjerona-silvestre ou manjerona-rasteira. É amplamente utilizado na culinária e na medicina popular. O seu óleo essencial apresenta alta estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e o timol, com atividade antimicrobiana comprovada (BAYDAR; SAGDÇ; OZKAN, 2004; CLEFF et al., 2008) (Figura 6). Segundo Burt (2004), o óleo essencial de orégano é composto, principalmente, por carvacrol, timol, γ -terpineno e p-cimeno.



Figura 6 Aspecto geral da espécie orégano (*Origanum vulgare*)

Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, diferentes espécies e biótipos de *Origanum* são utilizados como insumo na indústria farmacêutica e cosmética, como erva culinária, como flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria (SOUZA et al., 2005). Estudos têm mostrado que espécies de *Origanum* possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, e enfatizam que as suas propriedades biológicas podem variar de acordo com a técnica de cultivo, origem, estágio vegetativo e a estação de coleta do material vegetal.

2.8.2 Alho (*Allium sativum*)

O alho é uma erva bulbosa, perene, cujo bulbo fornece óleo essencial (0,1 a 0,2%). O princípio ativo, a alicina, encontra-se na droga fresca sob a forma de um precursor inativo, a aliina. A trituração dos bulbos provoca rápida reação enzimática por ação da enzima aliinase que converte a aliina em alicina cujo odor característico do alho é imediatamente reconhecido (KATZUNG, 2006).

Originário da Ásia Ocidental e Europa, o alho, *Allium sativum* L., da família Liliaceae, é uma planta herbácea, podendo atingir até 60 cm de altura; Apresenta-se com folhas pontiagudas, longas e achatadas, bulbo dividido em bulbilhos compridos e reunidos em um involúcro comum de várias túnicas esbranquiçadas que são facilmente destacáveis. Cada dente, com coloração variando de branco a violeta, é envolvido por uma túnica própria; flores pequenas em cachos, de cor rosada ou branca (Figura 7).

Sua composição química destaca-se pela presença de óleos essenciais, compostos sulfurados (aliina e alicina), sais minerais e vitaminas.

Segundo Zanúncio et al. (2007) entre os usos terapêuticos do alho, destacam-se bactericida, antisséptico, laxante suave, vermífugo, antiparasitário intestinal, diurético, indicado na arteriosclerose, prevenção da trombose e na hipertensão arterial, expectorante e combate manifestações gripais.



Figura 7 Aspecto geral do bulbo de alho (*Allium sativum*)

2.9 Queijo Quark

Entre os produtos alimentícios, o leite e seus derivados são os que apresentam maior crescimento nos últimos anos. O consumidor brasileiro está reaprendendo a comer, e trazendo para seu hábito diário de consumo, iogurtes, leites, queijos, e outros.

O quark é um queijo fresco de coagulação ácida, originário da Europa oriental que se tornou muito popular nos países ocidentais, sobretudo os europeus (JELEN; RENZ-SCHAUEN, 1987).

Segundo Fox et al. (1996) este é produzido a partir de leite integral ou desnatado que pode ser tanto pasteurizado como tratado termicamente a temperaturas mais elevadas como 90°C por até 10 minutos. A fabricação envolve a adição de cultura láctica acidificante para promover um abaixamento do pH e pequena quantidade de coalho para auxiliar a formação da coalhada, seguida de incubação até que se tenha a coagulação e um pH em torno de 4,6.

O queijo tipo “quark”, que dá origem ao queijo tipo “petit suisse”, faz parte do grupo de queijos de massa fresca, que consiste de produtos lácticos acidificados, não maturados, consumidos logo após a fabricação e conservados obrigatoriamente sob refrigeração. As condições de produção e de conservação destes produtos devem ser estritamente higiênicas e muito bem controladas. Na Europa, onde são de grande importância comercial e fabricados com tecnologia avançada, o queijo tipo “quark” e similares, além de consumidos ao natural, são comercializados em vários sabores com adição de frutas ou de misturas balanceadas de condimentos. Também pode ser transformado em produto aerado pela mistura com creme de leite batido, açúcar, aromatizantes e estabilizantes (VAN DENDER et al., 2005).

Na fabricação de queijos, a qualidade do produto é diretamente proporcional à qualidade da matéria-prima. O tema, qualidade do leite, é um dos

mais debatidos e, no entanto, continua sendo ainda um dos pontos mais fracos, dos elos de uma cadeia de eventos que determinam a qualidade do queijo.

No Brasil não há um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) para queijo tipo quark. O único queijo fresco obtido de coalhada ácida com RTIQ é o tipo Petit Suisse que muitas vezes é fabricado com a tecnologia do quark (BRASIL, 2001).

2.10 Análise sensorial

A análise sensorial é uma ciência utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (MINIM, 2006).

Por meio da análise sensorial, as características ou propriedades sensoriais de interesse em um alimento são identificadas e estudadas, utilizando metodologias sensoriais de coleta de dados e métodos estatísticos de avaliação e interpretação dos resultados obtidos no estudo sensorial (CHAVES, 2000; MINIM, 2006).

Os métodos sensoriais são baseados na resposta aos estímulos sensoriais e podem ser divididos em Métodos Discriminativos, Descritivos e Afetivos. Os métodos discriminativos são, em geral, de fácil interpretação, requerem pouco tempo, são relativamente baratos e estabelecem a diferença qualitativa e, ou quantitativa entre as amostras. O método descritivo caracteriza e descreve as propriedades sensoriais de um produto, empregando uma linguagem técnica. Os métodos afetivos não requerem treinamento dos consumidores e são importantes por expressar a opinião por parte dos mesmos (MINIM, 2006).

Os métodos afetivos são utilizados para verificar o desempenho de produtos junto ao mercado consumidor. Estes, quantitativamente, dividem-se em duas categorias: de preferência e de aceitação. Neste trabalho utilizou-se o teste

de aceitação cujo objetivo é avaliar se os consumidores gostam ou desgostam do produto. Existem várias escalas para medir a aceitação, sendo as mais utilizadas a escala hedônica, a de atitude e a do ideal. Minin (2006) afirma que com o teste da escala hedônica o indivíduo expressa o grau de gostar ou desgostar de um determinado produto, de forma globalizada ou em relação a um atributo específico, sendo as escalas mais usadas as de 7 e 9 pontos, que contêm os termos definidos variando de “gostei muitíssimo” a “desgostei muitíssimo”.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

As espécies selecionadas para o estudo, *Origanum vulgare* e *Allium sativum*, foram adquiridas, a varejo, no Mercado Central da cidade de Belo Horizonte – MG em março de 2008. As partes utilizadas do alho foram os bulbos desidratados laminados e para o orégano as folhas secas.

3.2 Extração do óleo essencial

As extrações foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras. O método de extração foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, com duração de 2 horas, partindo-se de uma massa de 700 g de alho desidratado laminado e de 300 g de orégano desidratado, realizadas em triplicata. Em seguida, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando-se uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965,36 g por 5 min. Este foi coletado com o auxílio de micropipeta, pesado e acondicionado em frasco de vidro envolto em papel alumínio, ao abrigo de luz, e armazenado sob temperatura de refrigeração (GUIMARÃES et al., 2008).

3.2.1 Determinação da umidade

Paralelamente às extrações, realizou-se o teste de umidade, de acordo com Pimentel et al. (2006). Utilizaram-se 5g de material vegetal imersos em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL, o qual foi acoplado a um condensador com coletor volumetricamente graduado. O

aquecimento do balão foi realizado por meio de manta aquecedora. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (% p/p BLU).

3.3 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

A análise qualitativa do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS - Shimadzu, modelo QP 5050A), na Universidade Federal de Sergipe, sob as seguintes condições experimentais: coluna capilar de sílica fundida (30m x 0,25mm) com fase ligada DB5 (0,25 μ m de espessura de filme); hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, a temperatura foi programada mantendo 50 °C por 1 minuto e meio, seguindo de um aumento de 4 °C min⁻¹ até atingir 200 °C, depois a 10 °C, até atingir 250 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 5 min.; temperatura do injetor: 250 °C e temperatura do detector (ou interface) de 280 °C; volume da amostra injetada 0,5 μ L em acetato de etila; taxa de partição do volume injetado: 1:100 e pressão na coluna de 64.20 kPa. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Para o índice de retenção, utilizou-se a equação de Van den Dool e Kratz 1963 em relação à série homóloga de n-alcenos (nC₈-nC₁₈). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes na biblioteca.

A análise quantitativa foi realizada no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras, utilizando-se cromatógrafo gasoso

Shimadzu CG – 17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC), nas seguintes condições experimentais: coluna capilar DB5; programação da coluna: temperatura inicial de 40 °C até 240 °C; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura de detector: 240 °C; gás carreador: nitrogênio (2,2 mL min⁻¹); taxa de split 1:10; volume injetado: 1 µL (1% de solução em diclorometano) e pressão na coluna de 115 KPa, sendo a quantificação de cada constituinte obtida por meio de normalização de áreas (%).

3.4 Atividade biológica dos óleos essenciais

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As bactérias utilizadas foram *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

3.4.1 Manutenção e ativação das culturas bacterianas

Durante o experimento, os micro-organismos foram mantidos, em eppendorfs contendo meio de congelamento, sob refrigeração (4 °C). Para ativação das culturas, as cepas foram repicadas em caldo-infusão de cérebro e coração (BHI), e ficaram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a ativação, foram realizados os plaqueamentos em meios específicos para cada espécie.

3.4.2 Padronização dos inóculos

As culturas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 foram padronizadas empregando-se a escala de McFarland de 0,5 de BaSO₄. A cultura ativa foi repicada para caldo infusão de cérebro (BHI) e incubada a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, uma alíquota de 10 µL foi transferida para caldo Tryptic Soy (TSB) e novamente incubada nas mesmas condições, sendo monitorado de meia em meia hora o aumento do número de inóculo pelo espectrofotômetro com densidade óptica a 625 nm, de acordo com a escala de McFarland de 0,5 de BaSO₄, até a concentração de 10⁸ UFC mL⁻¹. Esta foi diluída até que alcançasse uma concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹. Paralelamente, realizou-se o plaqueamento em Ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para a espécie *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, em Ágar Müeller-Hinton, para a confirmação da concentração do inóculo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003).

3.4.3 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias

O efeito inibitório dos óleos essenciais foi determinado utilizando-se as metodologias de difusão cavidade em ágar e difusão por vapor.

3.4.3.1 Teste de difusão cavidade em ágar

A metodologia utilizada foi a de difusão cavidade em ágar, empregando-se, para tal, o ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para a espécie *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, ágar Müeller-Hinton (PEREIRA et

al., 2008). Inicialmente, uma fina camada de ágar foi adicionada em placas de Petri (140 mm de diâmetro). Após a solidificação, esferas de vidro estéreis com 4 mm de diâmetro foram posicionadas sobre o meio sólido. Aliquotas padronizadas de culturas de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, foram transferidas para erlemeyers contendo 200 mL de ágar Mueller-Hinton ou TSA, obtendo-se concentração de 10^6 UFC mL⁻¹ na cultura reveladora. O meio ainda líquido foi vertido sobre a camada anterior. Após a solidificação do ágar, as esferas de vidro foram retiradas com auxílio de pinças estéreis, com posterior deposição dos óleos essenciais nos poços formados. As diluições foram realizadas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) acrescida de solução detergente TWEEN 80 (0,5% v/v), sendo utilizadas proporções de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128 e 1:256 partes de solução adicionada de partes de óleos essenciais como diluição, obtendo-se as concentrações 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 μ L mL⁻¹. Foram aplicados nos poços 10 μ L dos óleos essenciais diluídos. Para cada óleo essencial utilizado realizou-se o controle constituído de solução de DMSO a 1%. As placas foram incubadas em BOD 37 °C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 μ L de DMSO; como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 μ g mL⁻¹ do antibiótico cloranfenicol (CL) (OGUNWANDE et al., 2005).

A partir dos diâmetros obtidos, que evidenciaram a sensibilidade do micro-organismo, pode-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações dos óleos essenciais. A concentração inibitória mínima (CMI) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.4.3.2 Difusão por vapor (disco)

O método utilizado foi o bioanalítico “in vitro” avaliando-se o efeito dos óleos essenciais de *Allium sativum* e *Origanum vulgare* sobre as bactérias *Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Para os ensaios foram empregadas placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, onde foram utilizadas as seguintes concentrações de óleo: 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 1,95 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Paralelamente, foram preparadas duas placas, uma sendo a Testemunha Absoluta (contendo apenas o micro-organismo) e outra a Testemunha Relativa (contendo apenas 0,20 mL de DMSO no disco de papel aderido a parte superior da placa de Petri). Ambos os ensaios foram realizados em três repetições. O meio de cultura empregado foi o ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para a espécie *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, ágar Müeller-Hinton. Aliquotas padronizadas de culturas foram acrescidas obtendo-se concentração de 10^6 UFC mL^{-1} na cultura reveladora. Em seguida foram adicionadas às respectivas soluções de óleo essencial, em um filtro de papel de diâmetro de 4 cm, posteriormente incubadas em BOD a aproximadamente 25°C por 24 horas (LINDSEY; STANDEN, 2004).

3.4.3.3 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, sendo os tratamentos dispostos em esquema fatorial $5 \times 2 \times 10$, e constituídos por cinco micro-organismos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*), dois óleos (orégano e alho) e dez concentrações (500; 250; 125;

62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90; 1,95 e 0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de óleos essenciais. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi determinada perante os ensaios que avaliam a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e a redução do radical estável DPPH.

3.5.1 Padrões utilizados

Todos os padrões empregados foram de grau P. A; ácido ascórbico (Acrôs – 99%) e timol (Acrôs – 99%).

3.5.2 Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Preparou-se uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações (500; 300; 100; 50; 25; 10; 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco, contendo todos os reagentes, com exceção do óleo essencial. Após 60 minutos, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) no comprimento de onda de 515 nm (TEPE et al., 2005). A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de DPPH inibido, empregando a Equação 1:

$$\%I = 100 - [(DPPHam/DPPHbran)/100]$$

em que:

DPPHam: concentração de DPPH na concentração da amostra analisada;

DPPHbran: concentração de DPPH do branco.

Para a obtenção da CI_{50} , foram plotados gráficos como os valores de %I do DPPH versus as concentrações analisadas.

Para fins de comparação, foram testados os padrões timol, ácido ascórbico, por já possuírem atividade antioxidante reconhecida. A curva analítica foi construída utilizando as concentrações 50; 25; 10; 5; 2,5; $1\mu\text{g mL}^{-1}$ para o ácido ascórbico e, para o timol utilizaram-se as mesmas concentrações dos óleos essenciais.

3.5.2.1 Análise estatística

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi realizado com o esquema fatorial de 4×7 (2 padrões + 2 óleos essenciais x 7 concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5.3 Ensaio com β -caroteno/ácido linoléico

O ensaio com β -caroteno/ácido linoléico foi realizado, segundo metodologia descrita por Wang et al. (2008) adaptada.

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 µL de ácido linoléico, 600 mg de Tween 20 e 75µL de uma solução clorofórmica de β-caroteno a 2mg mL⁻¹. Estes foram dissolvidos em 1,5 mL de clorofórmio que, posteriormente, foi retirado utilizando rota-evaporador (Büchi Rotavapor R114) a 50 °C. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com 150 mL de água destilada oxigenada sob vigorosa agitação.

Alíquotas de 2,8 mL dessa emulsão foram transferidas para tubos de ensaio e, em seguida, foram adicionadas 0,2 mL das diluições do óleo essencial em metanol, obtendo as seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹, sendo o controle composto apenas de metanol. A absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) a 470 nm. Os tubos foram incubados a 50 °C para a reação de oxidação e a leitura da absorbância foi medida em um intervalo de 60 minutos. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição após 60 minutos de incubação utilizando a Equação 2:

$$AA = 100. (Drc - Drs)/Drc$$

em que:

AA = Porcentagem de inibição;

Drc = Razão de degradação do controle $[(\ln(a/b))/60]$;

Drs = Razão de degradação na presença da amostra $[(\ln(a/b))/60]$;

a = Absorbância no tempo zero;

b = Absorbância no tempo 60 minutos.

Para a obtenção da CI₅₀, foram plotados gráficos como os valores de %I da degradação do β-caroteno versus as concentrações analisadas.

Para fins de comparação, foram testados os padrões timol e ácido ascórbico, por já possuírem atividade antioxidante reconhecida. A curva analítica foi construída utilizando as mesmas concentrações dos óleos essenciais.

3.5.3.1 Análise estatística

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi realizado com o esquema fatorial de 4 x 6 (2 padrões + 2 óleos essenciais x 6 concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2003). Os dados foram submetidos à análise de variância e regressão, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.6 Fabricação do queijo

Os queijos foram produzidos no Setor de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos, seguindo tecnologia descrita por Ordoñez (2005) (Figura 8). O leite cru desnatado foi pasteurizado a 90 °C por 5 minutos. Posteriormente, procedeu-se o ajuste de temperatura para 35 °C, quando, então acrescentou-se o fermento mesofílico (2%) e o coalho. A fermentação foi conduzida até que o pH da coalhada atingisse entre 4,5 e 4,6. Em seguida realizou-se o dessoramento. A massa formada foi misturada com os ingredientes (creme de leite, sal e óleo essencial) e envasada em potes plásticos estéreis com capacidade para 250 g. O produto foi mantido sob refrigeração durante todo o período de vida útil. O óleo essencial de orégano foi adicionado aos queijos nas concentrações de 0%, 0,015%, 0,03%, 0,06% e 0,1%, e o óleo essencial de alho nas concentrações 0%, 0,015%, 0,03%, 0,045% e 0,06%.

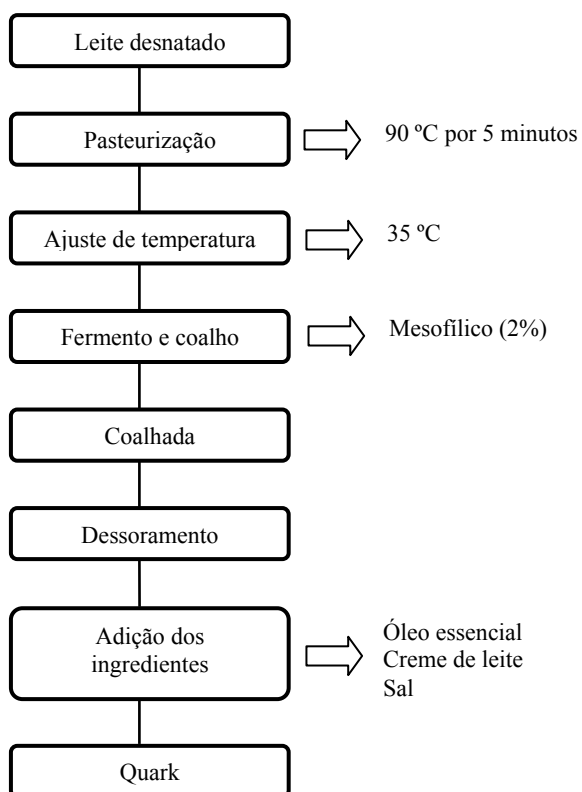


Figura 8 Fluxograma do processo de produção do queijo quark

3.7 Amostragem e tratamentos utilizados

Após elaboração, os queijos foram divididos em porções de 100 gramas por tratamento. As amostras de queijo foram acondicionadas em potes plásticos esterilizados em autoclave.

Tratamentos:

Tratamento 1: queijo adicionado com óleo essencial de orégano;

Tratamento 2: queijo adicionado com óleo essencial de alho;

Tratamento 3: queijo sem a adição de óleos essenciais (controle).

3.8 Determinação da vida útil

O estudo da vida útil foi realizado nos queijos, através das análises físico-químicas e microbiológicas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

3.8.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos de Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras - MG.

3.8.1.1 Preparo das amostras

As amostras de 25 g de cada tratamento foram retiradas, em seguida, foi realizada a homogeneização em 225 mL de água peptonada a 0,1% (p/v) esterilizada e realizadas diluições decimais em séries consecutivas, para proceder às análises microbiológicas. Todos os tratamentos foram homogeneizados em sacos plásticos estéreis. Em seguida, foram feitas as diluições para a inoculação nos diferentes meios de cultura utilizados.

3.8.1.2 Determinação de coliformes a 35 °C e termotolerantes (45 °C)

Os coliformes a 35 °C e termotolerantes foram determinados pela técnica do número mais provável (NMP), utilizando três séries de três tubos. O teste presuntivo constituiu-se pela homogeneização de 10 g de cada amostra em 90 mL de citrato de sódio a 2% em homogeneizador tipo Stomacher. Em

seguida, foram realizadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1%. Aliquotas de 1 mL das diluições apropriadas foram semeadas em caldo lauril sulfato triptose e incubadas a 35 °C por 24-48 horas. Após esse período, os tubos positivos, com apresentação de gás e turvação, foram transferidos para tubos contendo caldo verde brilhante (VB) e incubados a 37 °C por 24-48 horas, constituindo-se essa etapa no teste confirmativo dos tubos positivos. Para o teste confirmativo, alíquotas de cultura dos tubos positivos em caldo VB foram transferidas com auxílio de alça de níquel cromo para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC), as quais foram incubadas a 45 °C por 24-48 horas, constituindo o teste para a determinação do NMP de coliformes termotolerantes presentes na amostra (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

3.8.1.3 Determinação de *Staphylococcus aureus*

Semeou-se 0,1 mL do homogenato de cada diluição preparada, em superfície de meio ágar Baird Parker (BPA), que foi incubada a 37 °C por 24-48 horas. Posteriormente realizou-se a contagem das colônias típicas crescidas, ou seja, colônias negras, pequenas e brilhantes, com a presença de halo (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

3.8.1.4 Determinação de *Salmonella* sp.

Foram pesados 25 g de amostra e adicionados em Erlenmeyers contendo 225 mL de água tamponada, e incubados, a 37 °C, por 18 horas. Posteriormente, realizou-se o enriquecimento da amostra utilizando-se os caldos tetrationato e rapaport, com incubação, a 37 °C, por 24 horas. Para o plaqueamento, foi utilizado o meio Rambach, incubado a 37 °C, por 24 horas (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

3.8.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) - Lavras - MG.

3.8.2.1 Preparo das amostras

As amostras de queijos foram homogeneizadas para posteriores análises, seguindo protocolo de Brasil (2006).

3.8.2.2 pH

As medidas de pH foram obtidas utilizando-se pHmetro portátil Tecnal TC-2P, previamente calibrado, com inserção do eletrodo diretamente na solução do queijo a ser analisada (BRASIL, 2006).

3.8.2.3 Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, em estufa de secagem (102°C), seguindo técnica descrita por Brasil (2006).

3.8.2.4 Acidez titulável

Para a análise da acidez foi utilizado o método titrimétrico Dornic. O filtrado foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 M em presença de fenolftaleína, sendo o resultado expresso em gramas de ácido láctico por 100 gramas da amostra, conforme descrito por Brasil (2006).

3.8.2.5 Gordura

A gordura foi determinada pelo método butirométrico de Van Gilik (BRASIL, 2006).

3.8.2.6 Cinzas

Após a dessecação, a amostra foi submetida à incineração, no qual a fração orgânica da amostra volatilizou-se sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas no recipiente. O cálculo do resíduo mineral fixo foi realizado com base na Equação 3:

$$\% \text{RMF} = (P_f - T) / (P_i - T) \times 100;$$

sendo:

%RMF – Resíduo Mineral Fixo (cinzas)

P_f - Última pesagem

P_i - Pesagem inicial

T - Tara do cadinho de porcelana

3.8.2.7 Proteína total

A proteína total foi determinada conforme Instrução Normativa nº 68, pela determinação de nitrogênio total através do método de Kjeldahl (BRASIL, 2006).

3.8.2.8 Análise estatística

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com três repetições, em que os tratamentos foram arrançados segundo um esquema de parcelas divididas, sendo os tratamentos das parcelas constituídos pelas cinco concentrações e os tempos de vida de prateleira (0, 7, 14, 21 e 28 dias) nas subparcelas.

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada com base nas sugestões apresentadas por Yassin e Moraes (2002).

3.9 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada, por meio do teste de aceitação, no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras – MG.

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Presidente Antônio Carlos (UNIPAC) – Barbacena –MG, e aprovado com o número de protocolo 766/2010.

3.9.1 Teste de aceitação

O teste de aceitação foi realizado de forma monádica para os queijos acrescidos dos óleos essenciais e o controle.

Os produtos foram avaliados por provadores não treinados, ou seja, consumidores, os quais utilizaram escala hedônica estruturada de 9 pontos, ancorada nos seus extremos, pelos termos: gostei muitíssimo (9) e desgostei muitíssimo (1); os atributos analisados foram: sabor e aspecto global dos produtos. Foi avaliada, ainda, a intenção de compra por meio de escala

estruturada mista de 5 pontos, expressa pelos termos: certamente não compraria (1) e certamente compraria (5), segundo Minim (2006). Para os queijos adicionados com óleo essencial de alho utilizaram-se 67 provadores e para o óleo essencial de orégano 81.

As amostras foram servidas em copos plásticos descartáveis de 50 mL codificados com números aleatórios de 3 dígitos com temperatura de 8°C aproximadamente.

O estudo foi realizado seguindo um delineamento em blocos casualizados completos (cada provador constitui um bloco), com 5 tratamentos, separado em alho e orégano.

Os resultados do teste de aceitação foram interpretados pela análise de variância univariada (ANAVA), seguida pelo teste de Tukey de comparação múltipla de médias, a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR versão 4.6 (FERREIRA, 2003) e pela análise multivariada por meio de mapa de preferência utilizando-se o software MATLAB.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os valores médios dos teores de óleos essenciais apresentados pelas espécies estudadas estão dispostos na Tabela 1.

Pelos dados da Tabela 1, observa-se que o rendimento do óleo essencial foi de 0,75% para o orégano (folhas secas) e 0,34% para o alho (laminado e desidratado). Sahin et al. (2004), pesquisando o óleo essencial de orégano (OEO), observaram um teor de 2,31% de rendimento, valor superior ao encontrado nesse estudo. Estes corroboram com os encontrados por Pereira et al. (2008), em que verificaram um rendimento de 1,47%. Shaath e Flores (1995) avaliando o rendimento do óleo essencial de alho (OEA) em três épocas do ano evidenciaram uma variação de 0,09 a 0,11% para o mesmo, valores inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

Tabela 1 Valores médios dos rendimentos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum*, expressos em p/p BLU (base livre de umidade)

Planta	Massa (g)	Umidade (%)	Óleo essencial (% p/p BLU)
<i>O. vulgare</i> (Orégano)	300	10,67	0,75
<i>A sativum</i> (Alho)	700	2,00	0,34

De acordo com Blank et al. (2007), mudanças sazonais apresentam efeito significativo sobre o rendimento dos óleos essenciais, explicando assim, as diferenças encontradas nos resultados para este experimento. Para Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção de metabólitos secundários pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, como sazonalidade, índice pluviométrico, ritmo circadiano, altitude, temperatura, ciclo vegetativo da planta, tipo de solo, entre outros. Nesse contexto, em vários trabalhos relatam-se variações quantitativas e qualitativas na composição química e no rendimento dos óleos essenciais de diversas plantas.

4.2 Constituintes químicos dos óleos essenciais

Os resultados dos constituintes químicos dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *A. sativum* são apresentados a seguir.

4.2.1 *Origanum vulgare* (orégano)

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas do OEO identificou cerca de 30 compostos, totalizando 86,46% da composição do mesmo. Na Tabela 2 encontram-se os compostos majoritários presentes no OEO com seus respectivos tempos de retenção, índices de Kovats calculados e os seus teores expressos em porcentagem (calculados por normalização de áreas).

Tabela 2 Compostos majoritários presentes no óleo essencial de *O. vulgare*

Picos	Tempo de retenção	IKcal*	Composto	Teor médio (%)
1	7,742	1119	α -terpineno	10,51
2	9,235	1061	γ -terpineno	20,04
3	10,717	-	β -cimeno	6,34
4	14,060	1187	4-terpineol	27,03
5	19,000	1295	Carvacrol	4,22

* IKcal – Índice de Kovats calculado

Os principais constituintes do OEO identificados e quantificados foram o 4-terpineol (27,03%), γ -terpineno (20,04%), β -cimeno (6,34%), carvacrol (4,22%), α -terpineol (3,34%), o-cimeno (2,77%), terpineno (2,09%) (Figura 9).

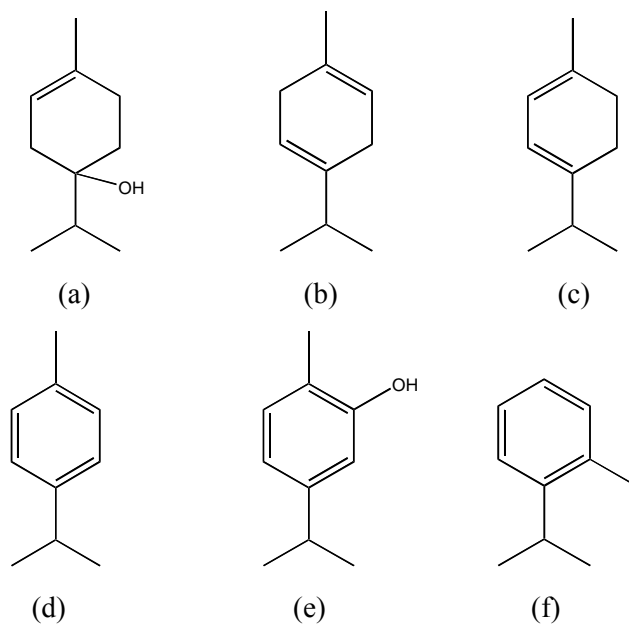


Figura 9 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Origanum vulgare*
 (a) 4-terpineol, (b) γ -terpineno, (c) α -terpineno, (d) β -cimeno, (e) carvacrol e (f) o-cimeno

Mechergui et al. (2010) encontraram resultados similares aos deste trabalho, embora com graus variados de importância, o p-cimeno (36-46%), o timol (18-39%), o γ -terpineno (12-24%) e o carvacrol (2-15%) foram os principais componentes do OEO em um total de 38 compostos identificados. Em concordância com os resultados anteriores, embora em concentrações diferenciadas, Ozkan et al. (2010) avaliando os constituintes químicos do OEO nos diferentes meses do ano observaram a presença de seis compostos principais, carvacrol (83,97-88,65%), timol (0,00-7,48%), γ -terpineno (2,63-6,15%), p-cimeno (1,52-3,16%), α -pineno (0,00-1,88%) e α -terpineno (0,00-1,05%). Entretanto, o carvacrol, o p-cimeno e o α -terpineno apresentaram o valor mais elevado no mês de julho, enquanto que o timol foi maior em junho, e o α -pineno maior em setembro. Essas variações na composição e na concentração dos componentes dos óleos essenciais de plantas de mesma espécie podem ocorrer devido a fatores ecológicos e as condições edafoclimáticas (BLANK et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; OZKAN et al., 2010).

Pereira et al. (2008), pesquisando os constituintes do OEO, identificaram um total de 19 compostos. Entre eles estão 0,7% de α -pineno, 1,1% de α -felandreno, 2,7% de mirceno, 6,9% de α -terpineno, 4,6% de p-cimeno, 2,3% de β -felandreno, 16,6% de o-cimeno, 16,0% de γ -terpineno, 1,8% de terpinoleno, 12,3% de linalol, 26,3% de 4-terpenol, 3,8% de α -terpineol, 0,8% de timol metil éter, 1,6% de carvacrol metil éter, 7,2% de carvacrol e 1,3% de trans-cariofileno, confirmando alguns dos compostos identificados em quantidades diferenciadas no OEO utilizado. Resultados similares foram relatados por Cleff et al. (2008), que encontraram como constituinte majoritário o 4-terpineol, seguido do γ -terpineno, timol, α -terpineno, linalol, p-cimeno, α -terpineol e carvacrol. No entanto, observaram uma maior concentração do timol em relação ao carvacrol.

4.2.2 *Allium sativum* (alho)

Na Tabela 3 encontram-se os compostos majoritários presentes no OEA com seus respectivos tempos de retenção, índices de Kovats calculados e os seus teores expressos em porcentagem (calculados por normalização de áreas).

Pelos dados descritos na Tabela 3, os principais constituintes do OEA identificados e quantificados foram o dialil trissulfeto (38,81%), dialil dissulfeto (25,23%) e o metil alil trissulfeto (12,52%) (Figura 10).

Tabela 3 Compostos majoritários presentes no óleo essencial de *A. sativum*

Picos	Tempo de retenção	IKcal*	Composto	Teor médio (%)
1	2,071	1451	-	5,64
2	3,786	918	-	8,35
3	4,923	867	-	3,76
4	9,965	1085	dialil dissulfeto	25,23
5	12,272	1145	metil alil trissulfeto	12,53
6	19,380	1311	dialil trissulfeto	38,81

* IKcal – Índice de Kovats calculado

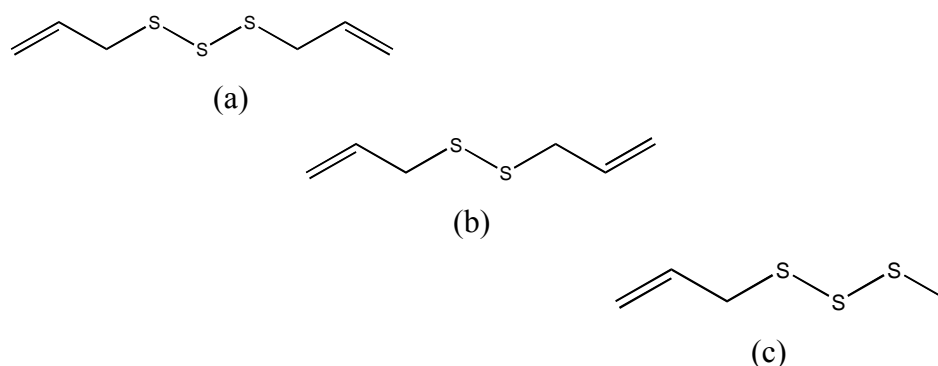


Figura 10 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo de *Allium sativum*
 (a). dialil trissulfeto, (b) dialil dissulfeto e (c) metil alil trissulfeto

Recentemente, Li et al. (2010) verificaram como principais constituintes químicos do OEA os compostos 3-vinil-4H-1,2-dithiin (31.89%), dialil trissulfeto (13.31%), dialil sulfeto (2.22%), dialil dissulfeto (6.87%), propil-alil-dissulfeto (13.89%) e o dimetil dissulfeto (7.05%), corroborando com alguns dos compostos encontrados neste trabalho. Resultados similares àqueles foram encontrados por Lagos, Serrano e Lopez (1995) em que evidenciaram como compostos majoritários do óleo de alho o 2-vinil-4(H)-1,3-dithiin, dialil dissulfeto, 3-vinil-4(H)-1,2-dithiin, metil-alil-trissulfeto, sendo o menos abundante o dimetil trissulfeto, mostrando que alguns constituintes químicos se assemelham aos encontrados no presente estudo, como o dialil dissulfeto e o metil-alil-trissulfeto. Shaath e Flores (1995) pesquisando a composição química do OEA encontraram como principais constituintes o dialil-trissulfeto (29,22 – 39,77%), o dialil-dissulfeto (23,95 – 34,25%) e o metil-alil-trissulfeto (11,02 – 17,68%) coincidindo com os resultados encontrados nesta pesquisa.

4.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Em geral, as atividades biológicas dos óleos essenciais são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Vários estudos têm sido realizados avaliando suas atividades frente a diversos tipos de micro-organismos, que são deterioradores de alimentos e patógenos, revelando o potencial de determinados óleos essenciais no controle de tais micro-organismos.

Um dos métodos para avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é o método de difusão em ágar. O princípio deste método baseia-se na difusão, através do ágar, de um antimicrobiano impregnado em uma cavidade. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano, cujo diâmetro é diretamente proporcional à concentração inibitória mínima (CRUZ; PEREIRA, 2010; MONDELLO et al., 2003).

Na Tabela 4 estão expressos os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos óleos essenciais obtidas no experimento para as bactérias em estudo. Nesta, verifica-se que o OEO apresentou efeito inibitório satisfatório, tanto para bactérias Gram-positivas como para as Gram-negativas, com valores de CMI semelhantes, com exceção para a *L. monocytogenes* ($31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$), ao passo que o OEA apresentou inibição apenas para a *S. choleraesius* ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os Gráficos 1 e 2 mostram o efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano e alho sobre as bactérias testadas, respectivamente. Na cavidade controle, a qual continha somente o diluente dimetilsulfóxido (DMSO) não observou-se a formação de halo de inibição, demonstrando a não interferência do diluente empregado sobre a atividade do óleo frente aos micro-organismos.

Tabela 4 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *A. sativum* encontrada para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Choleraesuis*

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
		<i>O. vulgare</i>	<i>A. sativum</i>	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	15,62	NI	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	31,25	NI	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	15,62	NI	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	-	15,62	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	15,62	125	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.

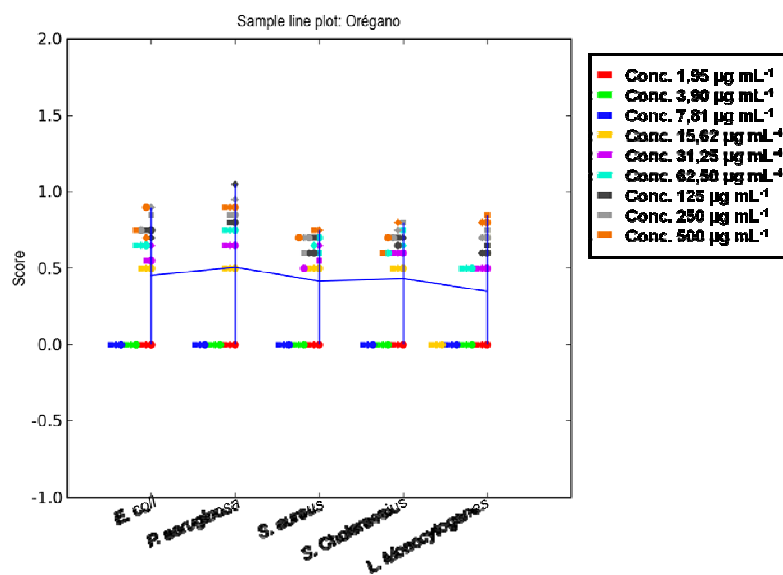


Gráfico 1 Efeito inibitório do óleo essencial de *O. vulgare* frente às bactérias testadas através da análise univariada

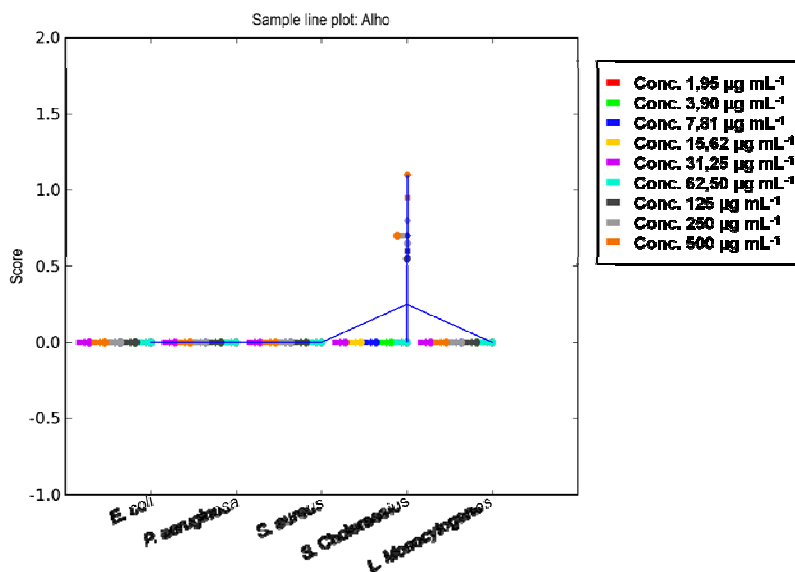


Gráfico 2 Efeito inibitório do óleo essencial de *A. sativum* frente às bactérias testadas através da análise univariada

Em vários trabalhos relata-se que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à atividade de óleos essenciais que bactérias Gram-negativas.

As bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, a qual faz com que elas tenham uma superfície hidrofílica devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeos. Porém, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar por essa membrana externa por meio de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas. Dessa maneira, considera-se que a membrana externa sirva como uma barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, e é por essa razão que bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas hidrofóbicas, assim como os óleos essenciais (MANN; COX; MARKHAM, 2000). No entanto, a atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas apresentadas por compostos, como o carvacrol, pode ser justificada pela

capacidade desses compostos hidrofóbicos de chegarem ao citoplasma dessas bactérias, passando pelos poros de proteínas presentes em sua membrana externa (HELANDER et al., 1998). Neste estudo a atividade frente às bactérias mostrou-se similar, tanto para as Gram negativas quanto para as Gram positivas.

A inibição do crescimento microbiano promovida pelo OEO foi evidenciada frente a todas as espécies testadas. Os componentes bioativos desse condimento têm atividade antimicrobiana bem documentada, com atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (NAZER et al., 2005; SEYDIM; SARIKUS, 2006).

Os principais componentes antimicrobianos presentes no OEO são o carvacrol e o timol com comprovado efeito inibitório no controle *in vitro* da multiplicação de *Salmonella* (NAZER et al., 2005; RHAYOUR et al., 2003; SILVA et al., 2005). No entanto, a eficácia da atividade bactericida de OEO pode variar em função dos teores de timol e carvacrol presentes, que dependem de fatores abióticos como tipo de solo, clima, práticas agrícolas, variedade do orégano e processo de extração do óleo essencial (FALCONE et al., 2005; FALEIRO et al., 2003; OUSSALAH et al., 2006).

Diferentemente de outros autores, no presente estudo os compostos majoritários do OEO não foram o carvacrol e o timol. Entretanto, de acordo com Liolios et al. (2009), além de se conhecer a ação dos constituintes prioritários isolados, é importante considerar a ação sinérgica, aditiva ou antagônica, entre as moléculas que o compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos compostos majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo.

Baydar, Sagdiç e Ozkan (2004) testaram um OEO com 53% de mistura de carvacrol e timol e outro OEO com 87% desses mesmos componentes e, como resultado, verificaram que o primeiro OEO, mesmo tendo menores teores de carvacrol e timol, apresentou uma ação antimicrobiana mais efetiva provavelmente devido a presença de p-cimeno e γ -terpineno. Segundo Ultee et

al. (2000), o p-cimeno e o γ -terpineno não tem efeito antibacteriano se usado sozinho, mas, quando combinado com carvacrol, ocorre sinergismo entre os dois.

Emiroğlu et al. (2010) pesquisando a atividade antimicrobiana de OEO adicionado em filmes comestíveis sobre as bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, nas concentrações que variaram de 1 a 5%, evidenciaram seu efeito inibitório sobre as mesmas. Para o *S. aureus* e *E. coli* a inibição foi dose-dependente, sendo a maior atividade encontrada na concentração de 5%, embora, em toda a ação inibitória tenha sido notada. Entretanto, a *P. aeruginosa* foi a que apresentou maior resistência frente ao óleo. Resultados similares foram encontrados por Nedorostova et al. (2009), sendo que a inibição completa promovida pelo OEO sobre a espécie. *S. aureus* foi nas concentrações de 50 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Essa relação dose-dependente também foi constatada por Burt (2004) para *E. Coli* 0157:H7. Esses dados corroboram com os encontrados por Oussalah et al. (2004) em que observaram a ação inibitória do OEO sobre *E. Coli* com a adição de 1% do mesmo em filmes comestíveis a base de proteínas do leite.

Silva et al. (2010) avaliaram a interferência da origem e do teor de compostos fenólicos de OEO de cinco marcas comerciais provenientes de diferentes regiões do mundo, na atividade inibitória frente à *Salmonella*. Concluíram que todos os OEO analisados por eles possuíam o carvacrol como componente principal e apresentaram atividade antimicrobiana frente à *Salmonella* em todas as concentrações testadas, sendo que, os óleos essenciais que possuíam o p-cimeno e o γ -terpineno, além do carvacrol, apresentaram o seu efeito antimicrobiano potencializado.

Oussalah et al. (2007) avaliando a atividade antimicrobiana de vinte e oito óleos essenciais de diferentes espécies de plantas, dentre eles o OEO, sobre quatro bactérias patogênicas, entre as quais a *L. monocytogenes*, observaram seu

efeito sobre a mesma numa concentração mínima inibitória menor que 0,05% (v/v).

Para o OEA a ação inibitória foi verificada apenas frente a *S. choleraesuis* a partir da concentração de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo método difusão cavidade ágar. No entanto, muitos estudos relatam a atividade antimicrobiana do alho, e com o intuito de comprová-la foi realizado um segundo teste em que utilizou-se o método de difusão por vapor, onde a atividade é avaliada pelo tamanho do halo de inibição formado tomando como parâmetro um filtro de papel de tamanho conhecido aderido na tampa da placa (Tabela 5). Desta maneira, pôde-se constatar o efeito inibitório total frente às bactérias *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis* e *E. coli* com uma CMI de $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, e a *L. monocytogenes* foi a que apresentou maior sensibilidade com um valor de CMI de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esse efeito foi atribuído aos vapores dos constituintes do OEA gerados.

Tabela 5 Concentração mínima inibitória do óleo essencial de *A. sativum* encontrada para os micro-organismos *E.coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa* e *S. Choleraesuis*

Bactéria	Gram	<i>A. sativum</i>	DMSO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	125	NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	31,25	NI
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	125	NI
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	-	125	NI
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	125	NI

*NI: não ocorreu inibição, DMSO: dimetilsulfóxido.

Utilizando-se da mesma técnica, Ernandes e Garcia-Cruz (2007) avaliaram o efeito inibitório de oito óleos essenciais, incluindo o OEO e o OEA, sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas. Verificaram maior porcentagem de halos de inibição formados com o óleo essencial de cravo do Brasil (45,2%), seguido pelo de cravo da Índia (43,3%), hortelã (comprado) (42,3%), canela (41,0%), gengibre (38,5%), hortelã (37,5%), menta (32,7%), alho (30,8%), cebola (29,8%) e orégano (25,0%). As bactérias Gram positivas foram mais sensíveis aos óleos essenciais com 44,2% de frequência de halos formados em relação às Gram negativas (36,7%). Avaliando a toxicidade de oito óleos essenciais vegetais, entre eles o OEA, sobre o crescimento micelial de dois isolados do grupo *Aspergillus flavus* em comparação ao fungicida sintético benomyl, Viegas et al. (2005) constataram que entre os óleos essenciais testados, com base nos diâmetros dos halos de inibição formados, que os isolados tiveram seu desenvolvimento micelial reduzido de maneira acentuada pelos óleos essenciais de alho e de canela. No entanto, estes óleos sempre apresentaram eficiência significativamente menor que o padrão fungicida.

4.4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente antioxidantes, que possam ser utilizadas como conservantes de alimentos. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de seqüestro de radicais livres, tais como DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno

induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Segundo Magalhães et al. (2008) igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH[•] de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH[•] baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* e dos padrões, ácido ascórbico e timol, pelo ensaio oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, nota-se que o OEO apresentou-se mais eficiente (CI_{50} 2,84 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que o de alho (CI_{50} 402,78 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Em relação aos padrões avaliados, o timol apresentou-se mais eficaz (CI_{50} 32,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que o ácido ascórbico (CI_{50} 65,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 6).

Pelos dados descritos na Tabela 6, observa-se que pelo método DPPH o OEO apresentou a maior atividade antioxidante (18,73 $\mu\text{g mL}^{-1}$), uma vez que, não foi observada atividade antioxidante significativa para o OEA. Porém, entre os padrões avaliados, o ácido ascórbico (CI_{50} 3,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o timol.

Tabela 6 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *O. vulgare* e *A. sativum* e dos padrões, timol e ácido ascórbico, pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

Métodos	β -caroteno/ácido linoleico	DPPH
Componentes	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>O. vulgare</i>	2,84	18,73
<i>A. sativum</i>	402,78	NI
Timol	32,3	45,43
Ácido Ascórbico	65,66	3,32

*CI₅₀ = Concentração de inibição de 50% NI = não apresentou inibição.

Nota-se que o OEO, por ambos os métodos, apresentou atividade antioxidante superior ao OEA e ao padrão timol. Segundo Sacchetti et al. (2005), os óleos essenciais ricos em terpenos apresentam maior atividade antioxidante perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico devido à sua especificidade por compostos lipofílicos, explicando, desta forma, os valores significantes das atividades antioxidantes encontradas para o referido óleo, o qual apresentou como componentes majoritários os monoterpênicos (4 terpineol, γ -terpineno, α -terpineno e o β -cimeno).

A baixa atividade antioxidante apresentada pelo ácido ascórbico encontra-se de acordo com os resultados apresentados por Kulisic et al. (2004), que justificam tal efeito afirmando que compostos polares ficam mais concentrados na fase aquosa da emulsão, e conseqüentemente, mais diluídos na fase lipídica, sendo, dessa forma, menos efetivos na proteção do β -caroteno. O mesmo infere que o sistema é apropriado para a investigação da atividade antioxidante de óleos essenciais. Esse fato explica a menor eficiência do ácido ascórbico, quando comparado com o timol.

Observou-se também um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, revelando uma relação dose-dependente sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos padrões.

Martos et al. (2010) avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de cinco espécies condimentares, orégano (*Origanum vulgare*), tomilho (*Thymus vulgaris*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), sálvia (*Salvia officinalis*) e cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), utilizadas na dieta mediterrânea usando o método de sequestro de radicais livres – DPPH encontraram para o óleo essencial de orégano uma CI_{50} de $3,90 \times 10^3 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nota-se que apesar deste resultado ser superior ao encontrado no presente estudo, há uma relação entre eles, uma vez que, pelo ensaio de redução do DPPH, o OEO não apresentou atividade antioxidante significativa quando comparado ao ensaio β -caroteno/ácido linoléico. Isto torna-se o suficiente para mostrar que, no ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais ricos em terpenos apresentam atividades superiores àquelas apresentadas pelos mesmos óleos, quando avaliadas pelo ensaio de redução do radical estável DPPH.

Avaliando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, Bozin et al. (2006) pelo ensaio de redução do DPPH, encontraram valores de IC_{50} para as atividades antioxidantes desses óleos iguais a 0,39, 0,17, 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, evidenciando a significativa atividade antioxidante desses óleos essenciais. Pelas análises qualitativas, destes, observaram a presença dos fenilpropanoides estragol (45,8 %) no óleo essencial de *O. basilicum*, carvacrol (61,3 %) no de *O. vulgare* e timol (47,9%) no de *T. vulgaris*, diferentemente daqueles encontrados nesta pesquisa.

Queiroz et al. (2009) pesquisando a atividade antioxidante de extratos aquosos de alho submetidos a diferentes tipos de processamento (picado, picado com sal, frito, e misto) pelos métodos DPPH e β -caroteno/ácido linoléico,

observaram uma maior proteção por parte do extrato aquoso de alho frito em relação a peroxidação lipídica quando comparados aos outros tratamentos. Os mesmos autores inferem que a atividade antioxidante evidenciada pelo alho nas suas diferentes formas é atribuída a presença de enxofre presentes em sua composição.

Diversos autores apontam a dificuldade de se avaliar a atividade antioxidante de um composto com base em um único método. A mesma pode exigir uma combinação de métodos distintos e os resultados obtidos neste estudo confirmam a dificuldade de comparação dos resultados encontrados pelos variados métodos

4.5 Análise sensorial

Os resultados do teste de aceitação em relação aos atributos sensoriais avaliados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Valores médios dos atributos sensoriais sabor, aspecto global e intenção de compra para os queijos produzidos com óleo essencial de orégano nas diferentes concentrações

Concentração (%)	<i>O. vulgare</i>		
	Sabor	Aspecto global	Intenção de compra
0,00	6,3 a	6,8 a	3,4 a
0,015	6,2 a	6,8 a	3,3 a
0,030	5,2 b	5,9 b	2,7 b
0,060	4,6 b	5,4 b	2,6 b
0,10	6,7 a	7,0 a	3,7 a

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Observa-se que, entre as amostras de queijo quark condimentado com óleo essencial de orégano, as de concentração de 0 %, 0,015% e 0,1%, obtiveram melhor aceitação em todos os atributos avaliados com médias de 6,3, 6,2 e 6,7 para o atributo sabor e 6,8, 6,8 e 7,0 para aspecto global, respectivamente, indicando a preferência dos extremos por parte dos provadores, ou seja, queijos variando do sabor mais suave ao mais intenso. No teste de intenção de compra, 50%, 54% e 67% dos provadores responderam que certamente compraria (nota 5) ou possivelmente compraria (nota 4) a amostra de concentração 0%, 0,015% e 0,1%, respectivamente.

Para as amostras de queijo quark condimentado com óleo essencial de alho, as maiores notas foram atribuídas às concentrações 0,015%, 0,045% e 0,06% (Tabela 8). Semelhante aos queijos adicionados de óleo de orégano nota-se que a preferência dos consumidores variou do sabor mais suave ao mais intenso. No teste de intenção de compra, 68%, 60% e 68% dos provadores responderam que certamente compraria ou possivelmente compraria a amostra de concentração 0,06%, 0,045% e a 0,015%, respectivamente.

Tabela 8 Valores médios dos atributos sensoriais sabor, aspecto global e intenção de compra para os queijos produzidos com óleo essencial de Alho nas diferentes concentrações

Concentração (%)	<i>A. sativum</i>		
	Sabor	Aspecto global	Intenção de compra
0,00	5,2 b	5,9 b	2,7 b
0,015	6,2 a	6,8 a	3,4 a
0,030	4,6 b	5,5 b	2,6 b
0,045	6,3 a	6,8 a	3,3 a
0,060	6,7 a	7,1 a	3,7 a

As médias seguidas das mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Com os dados obtidos no teste de aceitação das amostras de queijo quark condimentados com óleo essencial de orégano e alho, foi realizada a Análise do Mapa de Preferência Interno (MPI) ou Análise de Preferência Multidimensional para cada atributo, que apresenta como base a Análise de Componentes Principais (ACP). Neste tipo de análise é possível avaliar o quanto o produto é aceito (ou preferido) no mercado em função de suas características de qualidade, levando-se em consideração a resposta individual de cada consumidor, e não somente a média do grupo de consumidores que avaliaram os produtos.

Nos Gráficos 3 e 4 encontram-se os resultados para os atributos sabor e e aspecto global obtidos pela análise do MPI para os queijos condimentados com OEO.

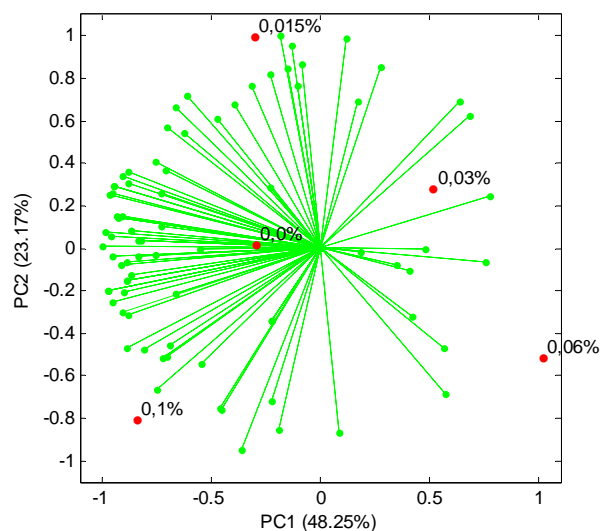


Gráfico 3 Mapa de Preferência Interno para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) nas diferentes concentrações

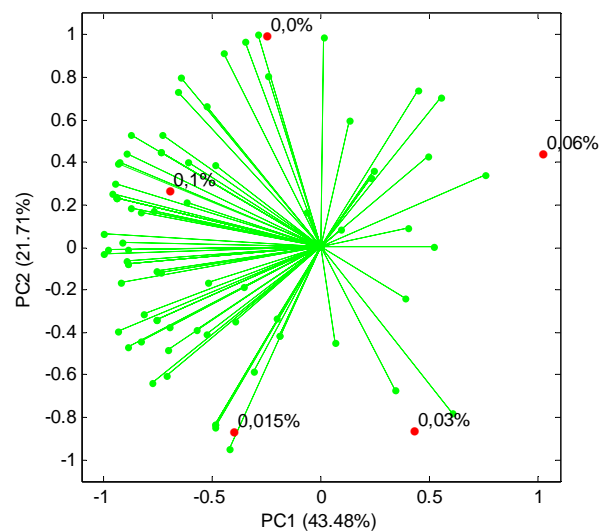


Gráfico 4 Mapa de Preferência Interno para o atributo aspecto global para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) nas diferentes concentrações

A separação espacial das amostras de queijo com óleo essencial de orégano, tanto para o atributo sabor quanto para aspecto global, sugere a existência de três grupos de acordo com a aceitação das mesmas, sendo um grupo formado pela amostra controle (0,0%) e os outros pelas amostras com 0,015% e 0,1% de óleo. Assim, pode-se sugerir que a aceitação das amostras foi evidenciada na menor e na maior concentração e que não apresentaram diferenças significativas entre elas.

No Gráfico 5, o mapa de preferência interno indica que para o atributo sabor dos queijos adicionados de OEA há uma maior aceitação pela amostra com concentração de 0,0% (controle) seguida da 0,06% e 0,015%, respectivamente. Estes dados tornam-se mais evidentes através da curva de densidade de preferência (Gráfico 6).

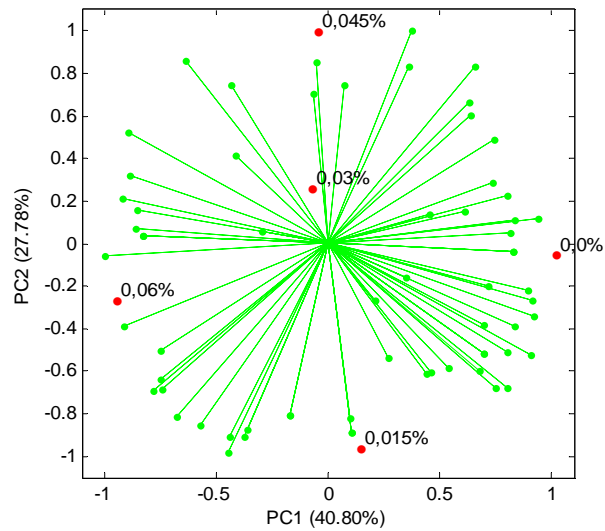


Gráfico 5 Mapa de Preferência Interno para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (*A. sativum*) nas diferentes concentrações

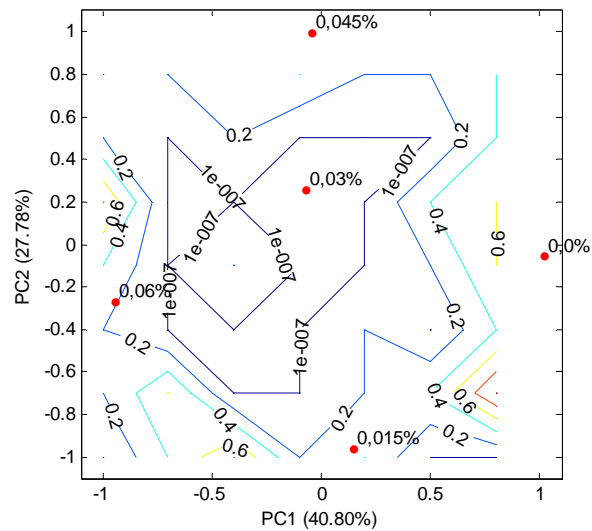


Gráfico 6 Curva de densidade de preferência para o atributo sabor para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (*A. sativum*) nas diferentes concentrações

Analisando o Gráfico 6 verifica-se que os valores das concentrações para as amostras controle, 0,06% e 0,015% apresentam-se próximas as curvas de densidade, entretanto a amostra 0,0% encontra-se numa curva com densidade 0.6, seguida da 0,06% (0,4 de densidade) e 0,015 (0,2 de densidade). Nota-se também que as concentrações de 0,045% e 0,03% não apresentam proximidade com as demais demonstrando a sua baixa aceitação por parte dos indivíduos.

Para o atributo aspecto global das amostras adicionadas de OEA, utilizando-se da mesma análise conclui-se que a preferência dos consumidores foi maior para a amostra controle, seguida das 0,06% e 0,015%, respectivamente (Gráfico 7). Estes resultados podem ser melhores visualizados através da curva de densidade de preferência (Gráfico 8).

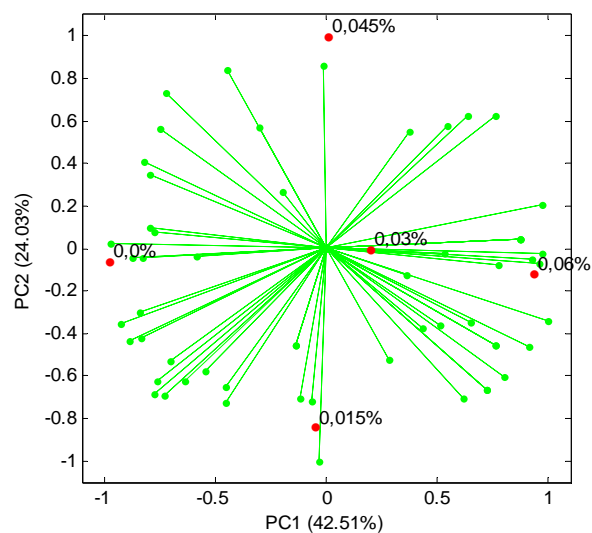


Gráfico 7 Mapa de Preferência Interno para o atributo aspecto global para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (*A. sativum*) nas diferentes concentrações

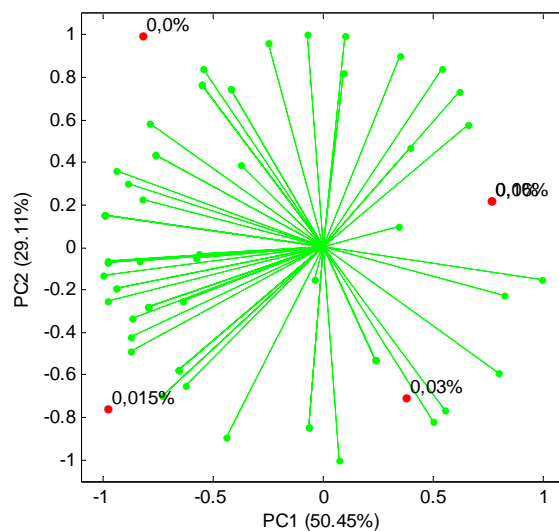


Gráfico 9 Mapa de Preferência Interno para o atributo intenção de compra para o queijo quark adicionado de óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) nas diferentes concentrações

Analisando o Gráfico acima pode-se afirmar que a intenção de compra para as amostras de queijo com OEO foi maior para o grupo controle, seguida da concentração 0,015% e 0,03%. Apesar das médias das notas para o atributo intenção de compra pelo teste de aceitação revelarem a concentração 0,1% como a mais aceita, o que se observa pelo teste de mapa de preferência interno que individualmente a intenção de compra foi maior para as concentrações 0,0%, 0,015% e 0,03%.

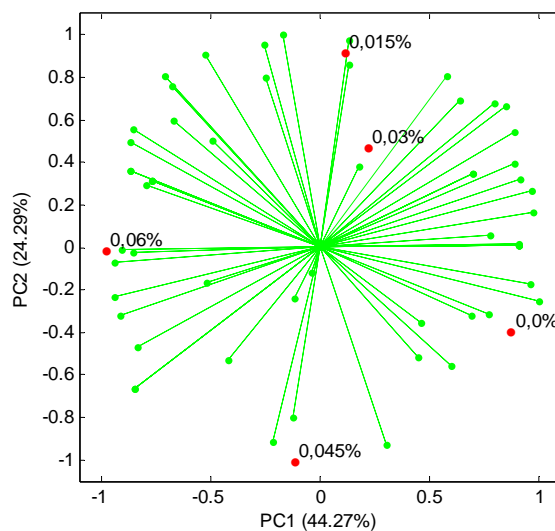


Gráfico 10 Mapa de Preferência Interno para o atributo intenção de compra para o queijo quark adicionado de óleo essencial de alho (*A. sativum*) nas diferentes concentrações

Os dados inferem que as concentrações 0,0% (controle) e 0,06% foram as que apresentaram maior intenção de compra por parte dos indivíduos. Estes resultados coincidem com os encontrados para o atributo sabor, uma vez que as melhores notas foram atribuídas a estas concentrações.

4.6 Análise da vida útil

Os resultados da análise de vida útil são apresentados a seguir.

4.6.1 Análises físico-químicas

Devido à inexistência de legislação específica no Brasil para o queijo tipo quark, os resultados foram comparados com o queijo tipo Petit Suisse, o único queijo fresco obtido de coalhada ácida com Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade no Brasil. A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos nas análises químicas do queijo tipo quark condimentado com OEO e OEA.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade de Queijo Petit Suisse, o queijo deve possuir um mínimo de 6% de proteínas lácteas, o que foi evidenciado no presente estudo (BRASIL, 2001). Este ainda estabelece que as suas características físico-químicas devam corresponder às dos queijos de altíssima umidade (BRASIL, 1996). Pelos resultados apresentados na Tabela 8 observa-se um teor de gordura de 13,03% e 12,88%, e de umidade de 73,14% e 73,17%, para os queijos condimentados com OEO e OEA, respectivamente, o que os classifica como queijos magros e de altíssima umidade. Entretanto, a legislação não estabelece limites para os outros atributos, como acidez, pH e cinzas. Azevedo et al. (2010) avaliando as características químicas do queijo quark evidenciaram que o mesmo apresentou muita alta umidade (78,37%), gordura (8,92%); cinzas (2,17%); proteínas (7,94%); acidez (0,77%) e pH (4,40), valores próximos aos obtidos neste estudo e que vão ao encontro aos preconizados conforme o regulamento técnico de identidade e qualidade no Brasil. De forma similar Gonçalves (2009) analisando a caracterização química de queijo tipo quark adicionados de diferentes probióticos, encontrou valores de acidez (0,52% - 0,58%); pH (4,38 - 4,5), proteína (6,01% - 6,22%) e umidade (79,84% - 81,11%).

Tabela 9 Média geral dos atributos pH, acidez, umidade, gordura, proteína total e cinzas ao longo do tempo

Análises	Orégano (%)	Alho (%)
pH	4,17	4,17
Acidez	1,11	1,12
Umidade	73,14	73,17
Gordura	13,03	12,88
Proteína total	9,49	9,65
Cinzas	1,20	1,19

Verificou-se pelo gráfico spiderweb plot que não foram verificadas mudanças significativas em relação às características avaliadas para as concentrações testadas em todos os tempos de análise (Gráfico 9).

No Gráfico 11 observa-se o comportamento das características físico-químicas avaliadas ao longo do tempo. A sobreposição dos pontos indica que a média dos resultados dos parâmetros não variou de forma significativa nos dias analisados.

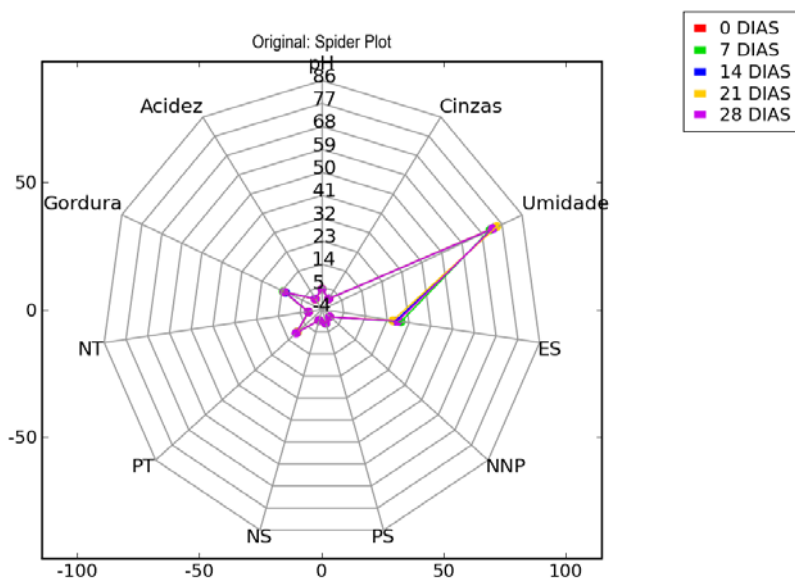


Gráfico 11 Representação gráfica (spiderweb plot) dos atributos pH, acidez, umidade, gordura, proteína total e cinzas do queijo quark adicionado de OEO e OEA nas diferentes concentrações ao longo do tempo

4.6.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram baseadas nos valores preconizados pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para queijos de muita alta umidade, temperados, condimentados ou adicionado de ervas ou outros ingredientes, que estabelece como parâmetros de qualidade a enumeração de coliformes a 45°C (10^2 UFC g^{-1}), estafilococos coagulase positivo (10^3 UFC g^{-1}) e *Salmonella* sp. (Ausência) como limites máximos permitidos. As contagens de coliformes, em todas as concentrações e tempos analisados, encontraram-se dentro dos limites estipulados, sempre abaixo de 10^2 UFC g^{-1} . Não foi verificada

a presença de *S. aureus* e *Salmonella* sp. em nenhuma das amostras analisadas. O produto, portanto, atende às exigências da legislação e os resultados comprovam o emprego das boas práticas de fabricação e higiene na manipulação de matérias-primas e utensílios.

Vale ressaltar que no tempo zero para todas as concentrações a presença de coliformes a 45 °C não tornou o produto impróprio para o consumo uma vez que os valores encontrados encontraram-se dentro do que a legislação preconiza. Entretanto, para as amostras adicionadas de OEO e OEA, nos tempos seguintes, ou seja, 7, 14, 21 e 28 dias não foi evidenciada a presença dos mesmos, inferindo um efeito antibacteriano dos óleos sobre estas bactérias, conforme já mencionado anteriormente pelos testes *in vitro*. Sabe-se que muitos estudos *in vitro* sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais são realizados, entretanto poucos envolvem a adição dessas substâncias em matrizes alimentares e como é o seu comportamento sobre a atividade antibacteriana, uma vez que fatores extrínsecos (temperatura, embalagem em atmosfera modificada e características do micro-organismo) e intrínsecos (gordura, proteína, teor de água, antioxidantes, conservantes, pH, sal e outros aditivos) dos alimentos interferem no efeito dos óleos essenciais e na conduta dos micro-organismos no alimento.

Segundo Mejlholm e Dalgaard (2002) os elevados níveis de gordura e/ou proteínas dos alimentos podem proteger as bactérias da ação dos óleos essenciais, já que o mesmo, dissolvido na fase lipídica do alimento é menos disponível para a ação sobre as bactérias presentes na fase aquosa. Este fato poderia explicar a boa atividade apresentada pelos OEO e OEA frente ao grupo dos coliformes, uma vez que o queijo em estudo apresentou-se com teores baixos de gordura (queijo magro), podendo resultar no aumento do efeito inibitório do óleo essencial testado. Neste contexto, destaca-se a adição do sal durante a formulação, já que Skandamis e Nychas (2000) afirmam que a

atividade de água e/ou altos níveis de sal facilitam a ação dos óleos essenciais, assim poderia ter potencializado o seu efeito antimicrobiano. Estes acrescentam que a as bactérias tornam-se mais susceptíveis aos óleos essenciais com a queda do pH dos alimentos e menores temperaturas de armazenagem.

Oliveira et al. (2011) avaliando a atividade do óleo essencial de segurelha (*Satureja Montana* L.) sobre *Clostridium perfringens* em mortadelas verificaram que na concentração de 1,56% (CMI nos testes *in vitro*) reduziu em apenas um ciclo logarítmico após o primeiro dia de estocagem, entretanto, esse efeito foi mais evidente com as amostras na concentração de 3,12%. Porém, concluíram que em concentrações mais elevadas o impacto sensorial era notado, fato este observado pela alteração da coloração das mortadelas, podendo resultar em rejeição por parte dos consumidores. Salimena et al. (2010) aplicaram óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-Índia) em queijos minas frescal e avaliaram seu efeito antimicrobiano *in vivo* sobre *S. aureus*, nas concentrações de 0,78%, 1,56% e 3,12%. Observaram que houve inibição total dos microorganismos inoculados em todas as concentrações e dias analisados. Apesar de neste trabalho não ter sido inoculado uma concentração específica de bactérias foi observado uma inibição do crescimento microbiano ao longo dos tempos para o grupo dos coliformes.

Assim, alguns trabalhos vêm buscando encontrar uma concentração que promova simultaneamente o efeito antimicrobiano, em concentrações inibitórias mínimas, e realçar o sabor, de forma a promover alterações sensoriais positivas, contribuindo para a elaboração de novos produtos isentos ou com o mínimo possível de aditivos sintéticos.

5 CONCLUSÃO

Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *A. sativum* apresentaram como constituintes majoritários o 4-terpineol (27,03%) e o dialil trissulfeto (38,815), respectivamente.

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais testada foi satisfatória, tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas.

Ambos os óleos essenciais apresentaram atividade antioxidante, sendo que o óleo de *O. vulgare* mostrou-se o mais eficiente.

A produção de queijos quark com óleo essencial de orégano e alho é viável, tendo em vista a boa aceitação dos consumidores e a sua vida útil estendida.

REFERÊNCIAS

ADAMS, M. R.; MOSS, M. D. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

ANDRADE, C. A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acácia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 231-235, abr./jun. 2007.

AZEVEDO, V. M. et al. Caracterização química de queijo tipo quark. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 19., 2010, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2010. p. 22-25.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Guildford, v.15, n. 3, p. 169-172, Apr. 2004.

BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. **Bacteriological analytical manual**. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 1697 p.

BLANK, A. F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.17, n. 4, p. 557-64, out./dez. 2007.

BOLLINGER, N. et al. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 6, p. 1990–1996, Mar. 2001.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, Feb. 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, June 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 53, de 29 de dezembro de 2000. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de queijo petit-suisse. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 4 jan. 2001. Seção 1, p. 3.

_____. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

_____. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 25.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 64, de 16 de setembro de 2008. Aprova o regulamento técnico sobre atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 19 set. 2008. Seção 1, p. 46.

_____. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil: 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, v. 5, n. 6, p. 2-4, dez. 2005.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essência de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 378-384, abr./jun. 2010.

CAO, L. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* maxim. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 3, p. 801-805, Aug. 2009.

CARDOSO, M. G. et al. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Lavras: UFLA, 2001. 81 p.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CASEY, A. L.; LAMBERT, P. A.; ELLIOTT, T. S. J. Staphylococci. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 23-32, May 2007.

CASTRO, H. G. de et al. **Metabólitos secundários**: contribuição ao estudo das plantas medicinais. 2. ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004. 113 p.

ÁVARO, S. et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of two *Satureja* essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 3, p. 648-653, Dec. 2008.

CEYLAN, E.; FUNG, D. Y.C. Antimicrobial activity of spices. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v. 12, n. 1, p. 1-55, May 2004.

CHAN, E. W. C. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**, London, v. 109, n. 3, p. 477-483, Aug. 2008.

CHAVES, J. B. P. **Manual de análise sensorial**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 117 p.

CLEFF, M. B. et al. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 513-516, abr. 2008.

CRUZ, P. B.; PEREIRA, C. A. M. Avaliação da presença de antimicrobianos naturais em condimentos industrializados. **Revista Simbio-Logias**, Botucatu, v. 3, n. 5, p. 125-131, dez. 2010.

DEMIRCI, F. et al. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 12, p. 1159-1164, Dec. 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products**: a biosynthetic approach. 3rd ed. New York: J. Wiley, 2009. 556 p.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

EMIROĞLU, Z. K. et al. Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. **Meat Science**, Barking, v. 86, n. 4, p. 283-288, Apr. 2010.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais em microrganismos isolados do meio ambiente. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 25, n. 2, p. 193-206, jul./dez. 2007.

FALCONE, P. et al. A study on the antimicrobial activity of thymol intended as a natural preservative. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 8, p. 1664-1670, Aug. 2005.

FALEIRO, M. L. et al. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of thymus. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 35-40, Dec. 2003.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: versão 4.6, Build 61. Lavras: UFLA/DEX, 2003. Software.

FOX, P. F. et al. Cheese: physical, biochemical and nutritional aspects. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 39, p. 163-328, Apr. 1996.

FRANCO, B. G. M. F; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FUEYO, J. M.; MENDONZA, M. C.; MARTIN, M. C. Enterotoxins and toxic shock syndrome in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetics findings. **Microbes and infection**, Paris, v. 7, n. 2, p. 187-194, Feb. 2005.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, mar./abr. 2007.

GONÇALVES, M. M. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo quark simbiótico**. 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, ago. 2008.

GUTIERREZ, J. R.V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Habana, v. 31, n. 2, p. 126-133, abr./jun. 2002.

HELANDER, I. K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Dublin, v. 46, n. 11, p. 3590-3595, Nov. 1998.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 668 p.

JELLEN, P.; RENZ-SCHAUEN, A. Quark manufacturing innovations and their effects on quality, nutritive value and consumer acceptance. **Food Technology**, Chicago, v. 2, n. 2, p. 74-81, Mar. 1987.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella Enteritidis* no noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 127-131, abr. 1995.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia**: básica e clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1068 p.

KHELEF, N. et al. **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3rd ed. New York: Springer, 2005. 959 p.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LAGOS, A. M.; SERRANO, O.; LOPEZ, R. Determination of organic sulphur compounds in garlic extracts by gas chromatography and mass spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 53, n. 3, p. 91-93, June 1995.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 4, p. 999-1007, Apr. 2001.

LI, R. et al. Extraction of essential oils from garlic (*Allium sativum*) using ligarine as solvent and its immunity activity in gastric cancer rat. **Medicinal Chemistry Research**, Boston, v.19, p. 1092-1105, Dec. 2010.

LINDSEY, K.; STANDEN, J. V. Growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of *Allium sativum* and *Tulbaghia violacea*. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 70, n. 4, p. 671-673, Oct. 2004.

LIOLIOS, C. C. et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 1, p. 77-83, Jan. 2009.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacterias**. 2nd ed. Baltimore: 1980. 527 p.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 613, n. 4, p. 1-19, Apr. 2008.

MALLET, A. C. T. et al. Quantificação e identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* de águas utilizadas em pequenas propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 4, p. 394-400, fev. 2007.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, S. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 294-297, Aug. 2000.

MANTILLA, S. S. et al. Importância da *listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 180-192, set. 2007.

MARTOS, M. V. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, p. 13-19, May 2010.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

MECHERGUI, A. et al. Essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart from Tunisia: chemical composition and antioxidant activity. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, p. 1745-1749, Oct. 2010.

MEJLHOLM, O.; DALGAARD, P. Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, n. 1, p. 27-31, Jan. 2002.

MIMICA-DUKIC, N. et al. Antimicrobial and antioxidant of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 9, p. 2485-2489, Feb. 2004.

MINIM, V. P. R. **Ánalise sensorial**: estudos com consumidores. Viçosa, MG: UFV, 2006. 225 p.

MONDELLO, F. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azole susceptible and resistant human pathogenic yeasts. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 51, n. 5, p. 1223-1229, Mar. 2003.

MULLER, F. L. et al. Trends in oxidative aging theories. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 43, p. 477-503, Oct. 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6th ed. Wayne: CLSI, 2003. 232 p.

NAZER, A. I. et al. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 4, p. 391-398, Jan. 2005.

NEDOROSTOVA, L. et al. Antimicrobial properties of selected essential oils in vapour phase against foodborne bacteria. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 157-160, Mar. 2009.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, Jan. 2005.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 144, p. 546-555, Jan. 2011.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280 p.

OUSSALAH, M. et al. Antimicrobial and antioxidant effects of milk protein based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 12, p. 5598-5605, Sept. 2004.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 3, p. 45-52, Aug. 2006.

OZKAN, G.; BAYDAR, H.; ERBAS, S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 4, p. 205-209, Apr. 2010.

PARSEK, M. R.; SINGH, P. K. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v. 57, n. 2, p. 677-701, Jan. 2003.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, R. C. B. et al. Obtenção de óleo essencial e oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por arraste com vapor e extração com solvente. **Revista Universidade Rural**: série ciências da vida, Seropédica, v. 27, n. 1, p. 10-20, jan./jun. 2007.

PESSOA, O. D. L. et al. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 3, p.584-586, fev. 2010.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

PIRES, T. C. **Efeito inibitório de óleos essenciais de Citros sobre o crescimento de microrganismos**. 2007. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (n° 46) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 155, n. 7, p. 568-570, Sept. 2004.

PROESTOS, C. et al. Natural antioxidant constituents from select aromatic plants and their antimicrobial activity against selected pathogenic microorganisms. **Food Technology and Biotechnology**, New York, v. 46, n. 2, p. 151-156, Feb. 2008.

QUEIROZ, Y. S. et al. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 18, p. 371-374, Mar. 2009.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006

RHAYOUR, K. et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherchia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, Messina, v. 15, n. 5, p. 356-362, Jan. 2003.

ROBINSON, R. K. **Microbiologia lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 320 p.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, Oxford, v. 69, n. 2, p. 167-174, May 2000.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of diferent origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, Oxford, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SAFAEI-GHOMI, J. et al. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramanicus* Jalas and its main constituent carvacrol. **Food Chemistry**, Oxford, v. 115, n. 4, p. 1524-1528, Aug. 2009.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oiland methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. Vulgare in the Eastern Anatoliaregion of Turkey. **Food Control**, Oxford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SALIMENA, A. P. S. et al. Aplicação de óleo essencial em queijo minas frescal como conservante natural: resultados preliminares. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 27., 2010, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: EPAMIG, 2010. p. 67-70.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC, p. 403-434, 2007.

SEYDIM, A. C.; SARIKUS, G. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 5, p. 639-644, Feb. 2006.

SHAATH, N. A.; FLORES, F. B. The essential oil of *allium sativum* L., liliaceae (garlic). **Developments in Food Science**, Thessaloniki, v. 37, n. 1, p. 2025-2037, Jan. 1995.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 3. ed. 2007. 552 p.

SILVA, V. F. et al. Rendimento do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.) submetidos a diferentes métodos de cortes e secagens. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 107-153, set./dez. 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SILVA, J. P. L. et al. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella* Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v 30, n. 4, p. 136-141, maio 2010.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. Ecophysiological attributes of *Salmonella typhimurium* in liquid culture and within a gelatin gel with or without the addition of orégano essential oil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 31-35, Feb. 2000.

SOUZA, E. L. et al. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 40-45, mar. 2005.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIM, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente as perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, p. 38-42, mar. 2003.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827 p.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 586 p.

ULTEE, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 5, p. 620-624, Mar. 2000.

VAN DENDER, A. G. F. et al. Adaptação da tecnologia de termização do queijo quark. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 40, n. 239, p. 33-53, mar. 2005.

VIEGAS, E. C. et al. Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919, ago. 2005.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, London, n. 108, p. 1019-1022, Apr. 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food and health in Europe: a new basis for action**. Geneva, 2004. 96 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **General information related to foodborne disease**. Geneva, 2009. 15 p.

WICKENS, A. P. Ageing and the free radical theory. **Respiration Physiology**, Amsterdam, v. 128, n. 3, p. 379- 391, Nov. 2001.

YASSIN, N.; MORAIS, A. R.; MUNIZ, J. A. Análise de variância em experimento de dois fatores com tratamentos adicionais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, p. 1541-1547, dez. 2002. Edição especial.

YESILYURT, V. et al. Antioxidant potential and phenolic constituents of *Salvia cedronella*. **Food Chemistry**, London, v. 108, p. 31-39, Mar. 2008.

ZANÚNCIO, R. C. A. et al. Embalagem ativa com extrato alcoólico de condimentos para conservação de pães Artesanais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Cruz Alta, v. 2, n. 2, out. 2007.

ANEXO A - Cromatogramas

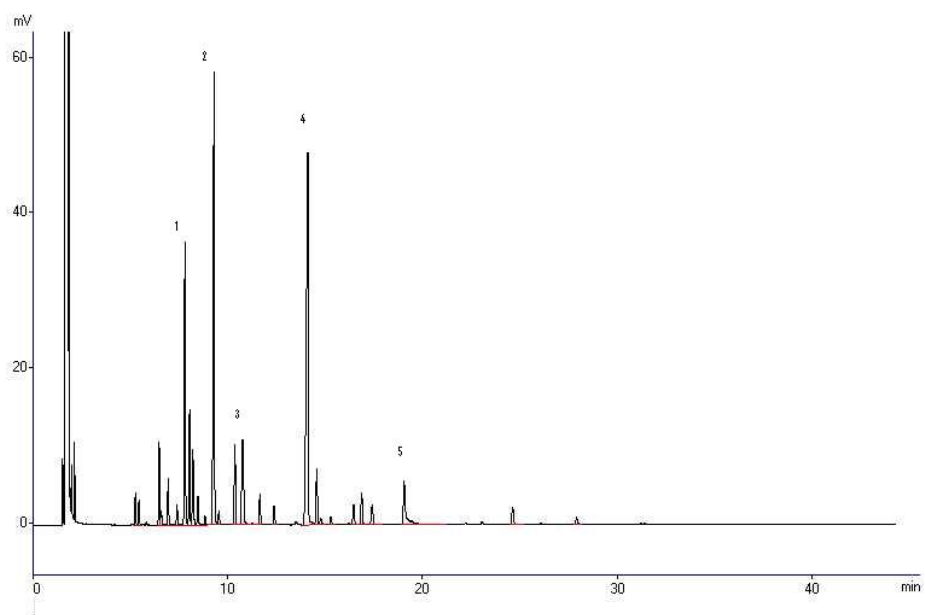


Figura 1A Cromatograma do óleo essencial das folhas de *O. vulgare*. (1) α -terpineno; (2) γ -terpineno; (3) β -cimeno; (4) 4-terpineol; (5) carvacrol

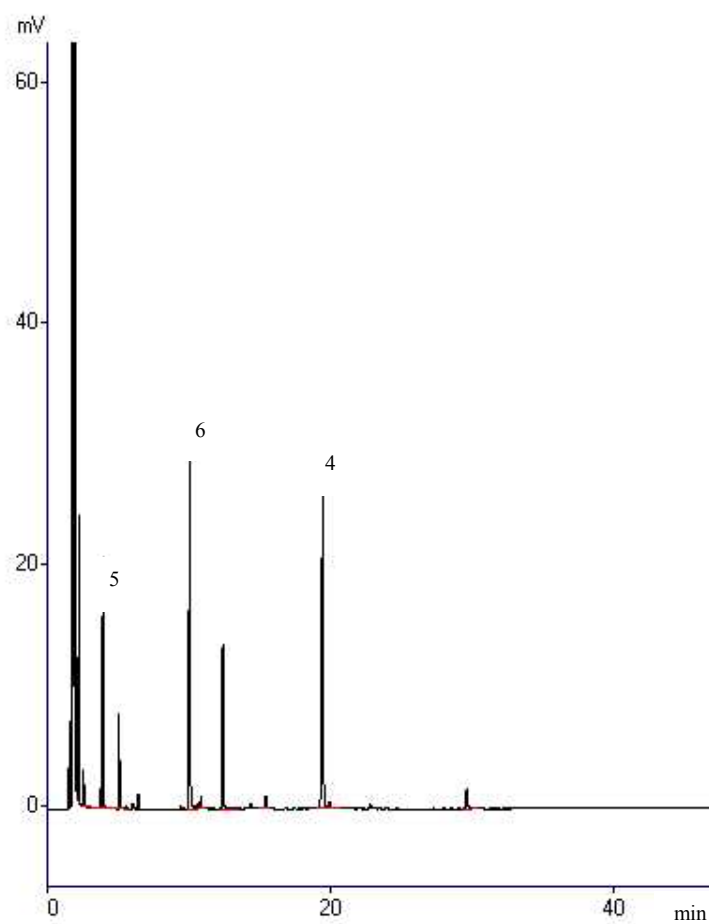


Figura 2A Cromatograma do óleo essencial dos bulbos de *A. sativum*. (1) Não identificado (NI); (2) NI; (3) NI; (4) dialil dissulfeto; (5) metil-alil-trissulfeto; (6) dialil-trissulfeto

ANEXO B - Tabelas

Tabela 1B Análise de variância para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* sobre *Escherichia coli*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	2.501042	2.501042	2401.000	0.000
Concentração	9	1.786875	0.198542	190.600	0.000
Óleo*concentração	9	1.786875	0.198542	190.600	0.000
Erro	40	0.041667	0.001042		
CV (%)	15.81				
Média geral	0.20				

Tabela 2B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo sobre *Escherichia coli*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	9	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Concentração/orégano	9	3.573750	0.397083	381.200	0.0000
Erro	40	0.041667	0.001042		

Tabela 3B Análise do desdobramento de óleo de cada nível de concentração sobre *Escherichia coli*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	0	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	1.95	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	3.90	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	7.81	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	15.62	0.375000	0.375000	360.000	0.0000
Óleo	31.25	0.510417	0.510417	490.000	0.0000
Óleo	62.5	0.633750	0.633750	608.400	0.0000
Óleo	125	0.806667	0.806667	774.400	0.0000
Óleo	250	1.041667	1.041667	1000.000	0.0000
Óleo	500	0.920417	0.920417	883.600	0.0000
Erro	40	0.041667	0.001042		

Tabela 4B Análise de variância para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* sobre *S. choleraesius*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	0.408375	0.408375	113.965	0.0000
Concentração	9	5.590375	0.621153	173.345	0.0000
Óleo*concentração	9	1.252042	0.139116	38.823	0.0000
Erro	40	0.143333	0.003583		
CV (%)	19.47				
Média geral	0.30				

Tabela 5B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo sobre sobre *S. choleraesius*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	9	3.683750	0.409306	114.225	0.0000
Concentração/orégano	9	3.158667	0.350963	97.943	0.0000
Erro	40	0.143333	0.003583		

Tabela 6B Análise do desdobramento de óleo de cada nível de concentração sobre *S. Choleraesius*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	0	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	1.95	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	3.90	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	7.81	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	15.62	0.375000	0.375000	104.651	0.0000
Óleo	31.25	0.540000	0.540000	150.698	0.0000
Óleo	62.5	0.666667	0.666667	186.047	0.0000
Óleo	125	0.006667	0.006667	1.860	0.1802
Óleo	250	0.001667	0.001667	0.465	0.4992
Óleo	500	0.070417	0.070417	19.651	0.0001
Erro	40	0.143333	0.003583		

Tabela 7B Análise de variância para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* sobre *P. aeruginosa*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	3.128167	3.128167	2588.828	0.0000
Concentração	9	2.280167	0.253352	209.670	0.0000
Óleo*concentração	9	2.280167	0.253352	209.670	0.0000
Erro	40	0.048333	0.001208		
CV (%)	15.22				
Média geral	0.22				

Tabela 8B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo sobre sobre *P. aeruginosa*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	9	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Concentração/orégano	9	4.560333	0.506704	419.341	0.0000
Erro	40	0.048333	0.001208		

Tabela 9B Análise do desdobramento de óleo de cada nível de concentração sobre *P. aeruginosa*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	0	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	1.95	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	3.90	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	7.81	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	15.62	0.375000	0.375000	310.345	0.0000
Óleo	31.25	0.633750	0.633750	524.483	0.0000
Óleo	62.5	0.843750	0.843750	698.276	0.0000
Óleo	125	1.170417	1.170417	968.621	0.1802
Óleo	250	1.170417	1.170417	968.621	0.4992
Óleo	500	1.215000	1.215000	1005.517	0.0000
Erro	40	0.048333	0.001208		

Tabela 10B Análise de variância para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* sobre *S. aureus*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	2.109375	2.109375	2664.474	0.0000
Concentração	9	1.456042	0.161782	204.357	0.0000
Óleo*concentração	9	1.456042	0.161782	204.357	0.0000
Erro	40	0.031667	0.000792		
CV (%)	15.01				
Média geral	0.18				

Tabela 11B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo sobre sobre *S. aureus*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	9	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Concentração/orégano	9	2.912083	0.323565	408.713	0.0000
Erro	40	0.031667	0.000792		

Tabela 12B Análise do desdobramento de óleo de cada nível de concentração sobre *S. aureus*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	0	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	1.95	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	3.90	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	7.81	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	15.62	0.375000	0.375000	473.684	0.0000
Óleo	31.25	0.481667	0.481667	608.421	0.0000
Óleo	62.5	0.633750	0.633750	800.523	0.0000
Óleo	125	0.601667	0.601667	760.000	0.0000
Óleo	250	0.666667	0.666667	842.105	0.0000
Óleo	500	0.806667	0.806667	1018.947	0.0000
Erro	40	0.031667	0.000792		

Tabela 13B Análise de variância para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum* sobre *L.monocytogenes*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	1.488375	1.488375	11907.000	0.0000
Concentração	9	1.602875	0.178097	1424.778	0.0000
Óleo*concentração	9	1.602875	0.178097	1424.778	0.0000
Erro	40	0.005000	0.000125		
CV (%)	7.10				
Média geral	0.15				

Tabela 14B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo sobre sobre *L. monocytogenes*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	9	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Concentração/orégano	9	3.205750	0.356194	2849.556	0.0000
Erro	40	0.005000	0.000125		

Tabela 15B Análise do desdobramento de óleo de cada nível de concentração sobre *S. aureus*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	0	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	1.95	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	3.90	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	7.81	0.000000	0.000000	0.000	1.0000
Óleo	15.62	0.000000	0.000000	0.000	0.0000
Óleo	31.25	0.375000	0.375000	3000.000	0.0000
Óleo	62.5	0.375000	0.375000	3000.000	0.0000
Óleo	125	0.570417	0.570417	4563.333	0.0000
Óleo	250	0.770417	0.770417	6163.333	0.0000
Óleo	500	1.000417	1.000417	8003.333	0.0000
Erro	40	0.005000	0.005000		

Tabela 16B Valores médios dos halos de inibição para o desdobraimento de óleo dentro de cada concentração sobre sobre *E. coli*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Orégano	Alho
0	0.0 b	0.0 b
1.95	0.0 b	0.0 b
3.90	0.0 b	0.0 b
7.81	0.0 b	0.0 b
15.62	0.50 a	0.0 b
31.25	0.58 a	0.0 b
62.50	0.65 a	0.0 b
125	0.73 a	0.0 b
250	0.83 a	0.0 b
500	0.78 a	0.0 b

As médias na mesma linha seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 17B Valores médios dos halos de inibição para o desdobraimento de óleo dentro de cada concentração sobre sobre *S. Choleraesius*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Orégano	Alho
0	0.0 b	0.0 b
1.95	0.0 b	0.0 b
3.90	0.0 b	0.0 b
7.81	0.0 b	0.0 b
15.62	0.50 a	0.0 b
31.25	0.60 a	0.0 b
62.50	0.66 a	0.0 b
125	0.68 a	0.61 a
250	0.75 a	0.71 a
500	0.91 a	0.70 b

As médias na mesma linha seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 18B Valores médios dos halos de inibição para o desdobraimento de óleo dentro de cada concentração sobre sobre *P. aeruginosa*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Orégano	Alho
0	0.0 b	0.0 b
1.95	0.0 b	0.0 b
3.90	0.0 b	0.0 b
7.81	0.0 b	0.0 b
15.62	0.5 a	0.0 b
31.25	0.65 a	0.0 b
62.50	0.75 a	0.0 b
125	0.88 a	0.0 b
250	0.88 a	0.0 b
500	0.90 a	0.0 b

As médias na mesma linha seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 19B Valores médios dos halos de inibição para o desdobraimento de óleo dentro de cada concentração sobre sobre *S. aureus*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Orégano	Alho
0	0.0 b	0.0 b
1.95	0.0 b	0.0 b
3.90	0.0 b	0.0 b
7.81	0.0 b	0.0 b
15.62	0.5 a	0.0 b
31.25	0.56 a	0.0 b
62.50	0.65 a	0.0 b
125	0.63 a	0.0 b
250	0.66 a	0.0 b
500	0.73 a	0.0 b

As médias na mesma linha seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 20B Valores médios dos halos de inibição para o desdobramento de óleo dentro de cada concentração sobre sobre *L. monocytogenes*

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Orégano	Alho
0	0.0 b	0.0 b
1.95	0.0 b	0.0 b
3.90	0.0 b	0.0 b
7.81	0.0 b	0.0 b
15.62	0.0 b	0.0 b
31.25	0.50 a	0.0 b
62.50	0.60 a	0.0 b
125	0.61 a	0.0 b
250	0.71 a	0.0 b
500	0.81 a	0.0 b

As médias na mesma linha seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 21B Análise de variância para os valores observados de atividade antioxidante para o ensaio β -caroteno/ácido linoléico dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	27182.84343	27182.84343	1845.271	0.000
Concentração	5	3673.005809	734.601162	49.867	0.000
Óleo*concentração	5	1072.796449	214.559290	14.565	0.000
Erro	24	353.545968	14.731082		
CV (%)	7.69				
Média geral	49.91				

Tabela 22B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo para o ensaio β -caroteno/ácido linoléico dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	5	648.389670	129.677934	8.803	0.0001
Concentração/orégano	5	4097.412587	819.482517	55.629	0.0000
Erro	24	353.545968	14.731082		

Tabela 23B Análise de variância para os valores observados de atividade antioxidante para o ensaio DPPH dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Óleo	1	52609.152257	52609.152257	108439	0.000
Concentração	6	20143.274653	3357.212442	6919.99	0.000
Óleo*concentração	6	19906.418301	3317.736384	6838.62	0.000
Erro	28	13.584113	0.485147		
CV (%)	1.89				
Média geral	36.92				

Tabela 24B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo para o DPPH dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Allium sativum*

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/alho	6	13.252443	2.208740	4.553	0.0001
Concentração/orégano	6	40036.440512	6672.740085	13754.0	0.0000
Erro	28	13.584113	0.485147		

Tabela 25B Análise de variância para os valores observados de atividade antioxidante para o ensaio DPPH do padrão ácido ascórbico

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração	6	21905.231196	3650.871866	6728.411	0.000
Erro	14	7.596475	0.542605		
CV (%)	1.02				
Média geral	71.95				

Tabela 26B Análise de variância para os valores observados de atividade antioxidante para o ensaio DPPH do padrão timol

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração	6	10882.457996	1813.742999	4514.691	0.000
Erro	14	5.624394	0.401742		
CV (%)	1.22				
Média geral	51.75				

Tabela 27B Análise de variância para os valores observados de atividade antioxidante para o ensaio β -caroteno/ácido linoléico dos padrões timol e ácido ascórbico

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração	5	35590.722051	6718.144410	207.760	0.000
Padrões	1	2136.751627	2136.751627	66.080	0.000
Conc.*padrões	5	2568.630183	513.726037	15.887	0.000
Erro	24	776.064544	32.336023		
CV (%)	13.31				
Média geral	42.72				

Tabela 28B Análise do desdobramento de concentração dentro de cada nível de óleo para o ensaio β -caroteno/ácido linoléico dos padrões timol e ácido ascórbico

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
Concentração/AA	5	13987.056606	2797.411321	86.511	0.0000
Concentração/timol	5	22172.295628	4434.459126	137.137	0.0000
Erro	24	776.064544	32.336023		

Tabela 29B Valores médios do atributo pH dos queijos condimentados com OEO nos tempos

Orégano					
Tempo (dias)					
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	4.02 d	4.07 b	4.12 b	4.11 b	4.15 b
0,015	4.18 b	4.26 a	4.17 a	4.20 a	4.14 bc
0,03	4.07 cd	4.20 a	4.18 a	4.21 a	4.09 c
0,06	4.25 a	4.26 a	4.19 a	4.22 a	4.15 b
0,1	4.09 c	4.23 a	4.16 ab	4.22 a	4.26 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 30B Valores médios do atributo gordura dos queijos condimentados com OEO nos tempos

Orégano					
Tempo (dias)					
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	14.86 a	15.00 a	12.00 c	12.63 cd	11.66 ab
0,015	12.013 ab	12.00 c	13.20 b	14.40 ab	11.03 b
0,03	13.66 b	13.86 ab	14.63 a	14.73 a	12.33 a
0,06	13.20 bc	14.00 ab	12.00 c	12.00 d	11.00 b
0,1	14.00 c	13.50 b	13.76 ab	13.30 bc	11.00 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 31B Valores médios do atributo Proteína Total dos queijos condimentados com OEO nos tempos

Orégano					
Tempo (dias)					
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	9.62 b	9.79 a	9.94 a	9.78 a	9.85 a
0,015	9.86 a	9.82 a	9.85 a	9.84 a	9.51 b
0,03	9.34 a	9.20 b	9.55 b	9.68 a	9.78 a
0,06	8.67 c	8.66 c	9.76 ab	9.71 a	9.67 ab
0,1	9.71 a	7.37 d	9.81 a	9.76 a	8.79 c

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 32B Valores médios do atributo umidade dos queijos condimentados com OEO nos tempos

Orégano					
Tempo (dias)					
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	71.39 b	72.68 a	73.60 b	72.32 a	73.15 a
0,015	73.43 ab	73.02 a	73.12 b	73.22 a	73.78 a
0,03	70.98 b	73.02 a	69.45 c	72.45 a	72.27 a
0,06	73.23 ab	74.58 a	73.06 b	72.65 a	73.65 a
0,1	74.03 a	74.87 a	76.26 a	74.45 a	74.07 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 33B Valores médios do atributo acidez e cinzas dos queijos condimentados com OEO nos tempos

Orégano		
Tempo (dias)	Acidez	Cinzas
0	1.11 c	1.18 ab
7	1.16 bc	1.19 ab
14	1.32 ab	1.18 ab
21	1.36 b	1.28 a
28	1.58 a	1.17 b

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 34B Valores médios do atributo acidez e cinzas dos queijos condimentados com OEO nas concentrações

Orégano		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Acidez	Cinzas
0	1.39 a	1.17 a
0,015	1.28 a	1.18 a
0,03	1.36 a	1.16 a
0,06	1.32 a	1.27 a
0,1	1.17 a	1.21 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 35B Valores médios do atributo pH dos queijos condimentados com OEA nos tempos

Alho					
Concentração (%)	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
0	4,04 b	4,06 b	4,13 a	4,15 b	4,13 bc
0,015	4,20 a	4,26 a	4,18 a	4,21 ab	4,15 bc
0,03	4,08 b	4,21 a	4,18 a	4,21 ab	4,09 c
0,045	4,25 a	4,27 a	4,19 a	4,25 a	4,19 ab
0,06	4,08 b	4,25 a	4,17 a	4,22 ab	4,25 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 36B Valores médios do atributo gordura dos queijos condimentados com OEA nos tempos

Alho					
	Tempo (dias)				
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	14,80 a	15,00 a	12,00 b	12,47 b	12,67 a
0,015	12,80 c	12,00 c	13,06 a	14,40 a	12,53 a
0,03	14,00 ab	13,80 b	14,40 a	14,40 a	12,33 a
0,045	13,20 bc	14,00 ab	12,00 b	12,00 b	12,60 a
0,06	14,00 ab	13,50 b	13,67 a	13,00 b	11,00 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 37B Valores médios do atributo proteína total dos queijos condimentados com OEA nos tempos

Alho					
	Tempo (dias)				
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	9,23 a	9,93 a	9,97 a	9,79 a	10,21 a
0,015	9,86 a	9,93 a	9,93 a	9,86 a	9,24 b
0,03	10,07 a	9,23 ab	10,28 a	9,72 a	9,88 ab
0,045	9,01 b	8,66 b	9,79 a	9,72 a	9,67 ab
0,06	9,72 ab	7,37 b	9,81 a	9,76 a	10,12 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 38B Valores médios do atributo umidade dos queijos condimentados com OEA nos tempos

Alho					
	Tempo (dias)				
Concentração (%)	0	7	14	21	28
0	71,39 bc	72,78 a	73,33 b	72,73 a	73,11 a
0,015	74,07 a	73,02 a	73,12 b	73,22 a	73,78 a
0,03	70,98 c	73,02 a	69,45 c	72,46 a	72,27 a
0,045	73,24 abc	74,58 a	73,06 b	72,65 a	73,82 a
0,06	73,70 ab	74,88 a	76,26 a	74,46 a	74,07 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 39B Valores médios do atributo acidez e cinzas dos queijos condimentados com OEA nos tempos

Alho		
Tempo (dias)	Acidez	Cinzas
0	1.15 c	1.19 ab
7	1.17 c	1.19 ab
14	1.34 b	1.18 ab
21	1.35 b	1.28 a
28	1.54 a	1.13 c

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 40B Valores médios do atributo acidez e cinzas dos queijos condimentados com OEA nas concentrações

Alho		
Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Acidez	Cinzas
0	1.39 a	1.17 a
0.015	1.24 ab	1.19 a
0.03	1.37 ab	1.14 a
0.045	1.32 ab	1.27 a
0.06	1.23 b	1.21 a

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 41B Média geral dos atributos pH, acidez, Umidade, Gordura, PT e Cinzas ao logo do tempo

Análises	Orégano (%)	Alho (%)
pH	4,17	4,17
Acidez	1,11	1,12
Umidade	73,14	73,17
Gordura	13,03	12,88
PT	9,49	9,65
Cinzas	1,20	1,19

ANEXO C – Figuras

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL

Nome: _____ Data: _____

Avalie da esquerda para a direita cada amostra e indique, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou, na seguinte ordem: da cor, consistência, sabor e impressão global de cada molho agri-doce.

	N °	Nota	Nota	Nota	Nota
	Amostra	aparência	textura	sabor	impressão global
9 – gostei extremamente					
8 – gostei muito					
7 – gostei moderadamente					
6 – gostei ligeiramente					
5 – nem gostei/nem desgostei	_____	_____	_____	_____	_____
4 – desgostei ligeiramente					
3 – desgostei moderadamente	_____	_____	_____	_____	_____
2 – desgostei muito					
1 – desgostei extremamente	_____		_____	_____	_____

Comentários: _____

Agora, utilizando a escala abaixo, indique a sua intenção de compra com relação ao produto.

	N °	Intenção de
	Amostra	compra
5 – certamente compraria		
4 – provavelmente compraria		
3 – não sei		
2 – provavelmente não compraria	_____	_____
1 – certamente não compraria	_____	_____

O que podemos acrescentar neste produto?

Figura 1C Ficha de avaliação sensorial

Senhor(a) Pesquisador(a)

Comunicamos a Vossa Senhoria a aprovação do projeto de intervenção **VIABILIZAÇÃO TECNOLÓGICA DA UTILIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS PASTOSOS (protocolo n.º 766/2010)**, após análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIPAC – CEP –, no dia 30.09.2010. Segue anexo o parecer para apreciação do autor.

O Pesquisador deverá apresentar relatórios semestralmente ao CEP a partir da data de aprovação.

Para maiores esclarecimentos favor entrar em contato com o CEP – UNIPAC –, cuja função é orientar os pesquisadores, esclarecendo-lhes as dúvidas.

Ciente de sua atenção, antecipadamente agradecemos.



Prof. Dr. Sebastião Rogério Góis Moreira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP – UNIPAC –

Ilmo(a) Sr(a).
Prof(a). **Maria das Graças Cardoso**

Comitê de Ética em Pesquisa – CEP - UNIPAC
Rua Monsenhor José Augusto, 203 – São José
Barbacena – MG – CEP: 36205-018
Fone: (0XX32) 3693-8832 – Fax: (0XX32) 3693-8880
cep@unipac.br <http://www.unipac.br>

Figura 2C Parecer de Aprovação do Projeto (A)



UNIPAC
Universidade Presidente Antônio Carlos

Parecer Consubstanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: VIABILIZAÇÃO TECNOLÓGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE CONDIMENTOS NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS PASTOSOS

Pesquisador Responsável: MARIA DAS GRAÇAS CARDOSO

Data da Versão:

Cadastro: 766/2010

Data do Parecer: 30/09/2010

Recomendação

APROVADO

Comentários Gerais sobre o Projeto:

O projeto é completo e bem feito. Nada foi deixado para ser feito ou demonstrado, exceto o risco de ingestão da essência para a saúde do ser humano e de animais.

É evidente e de domínio do senso comum que o orégano e o alho não são prejudiciais ao homem ou aos animais. O óleo e alho disponíveis no mercado e o orégano adicionado ao óleo de oliva já consumidos por milhares de pessoas e nenhum caso de intoxicação foi relatado.

Mas o projeto é uma proposta de experimentos com humanos de essências extraídas mediante processo químicos, artificiais, que podem adicionar propriedades indesejadas aos produtos além de produzir alíquotas de essências com concentrações de princípios ativos muito superiores aos encontrados nas plantas *in natura*.

Sugiro aos orientadores, que nos próximos projetos, seja citado no texto, o resumo de referências bibliográficas que demonstrem a segurança dos produtos testados nos experimentos de degustação.

Figura 3C Parecer de Aprovação do Projeto (B)