UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CAROLINA MARIA BEDOYA SERNA

**Avaliação da atividade antifúngica de óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare*) nanoemulsionado e estudo de caso em
queijo Minas Padrão**

Pirassununga

2015

Carolina Maria Bedoya Serna

**Avaliação da atividade antifúngica de óleo essencial de orégano
(*Origanum vulgare*) nanoemulsionado e estudo de caso em
queijo Minas Padrão**

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Samantha Cristina de Pinho

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B413a Bedoya-Serna, Carolina Maria
Avaliação da atividade antifúngica de óleo essencial
de orégano (*Origanum vulgare*) nanoemulsionado e estudo
de caso em queijo Minas Padrão / Carolina Maria Bedoya
Serna. -- Pirassununga, 2015.
106 f.
Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Samantha Cristina de Pinho.

1. Nanoemulsões 2. Método PIT 3. Inibição fúngica
4. Orégano 5. Queijos. I. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, meu irmão, meu namorado e minha tia Liliana ...
sem vocês nada disso teria dado certo ...
Grata para sempre!!!

Cada dia vale a pena se tenho a Deus em meu coração, o amor da minha família, a companhia do amor da minha vida, o carinho de meus amigos e a vontade de acordar cada dia com a esperança de lutar por meus objetivos... então...

VALEU MESMO!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por abençoar cada dia de minha vida e me permitir viver cada experiência que me ajuda a ser uma pessoa melhor.

Agradeço a meus pais Ramón e Lucero pelo amor, apoio e paciência... não é fácil ficar longe de vocês e, embora a saudade seja enorme, seu carinho e suas orações me dão a força para continuar adiante na vida... Agradeço sempre a Deus por me dar os melhores pais do mundo, vocês são únicos e por isso todo meu amor é para vocês.

Agradeço a meu irmão David por ser minha companhia e a força para ser melhor cada dia... Espero estar fazendo as coisas bem e ser teu melhor exemplo... Te amo!!!... Meu cuidado e dedicação serão para você.

Agradeço a minha tia Liliana por ser o impulso em minha vida como estudante e profissional, se não fosse por você, não estivesse aqui abrindo minha mente ao mundo e aumentando meu conhecimento... Espero te devolver da melhor forma todo aquilo que você me tem dado... Deus te abençoe sempre!!!

Agradeço a meu namorado Julian por seu amor, sua companhia, seu apoio incondicional e quer viver junto comigo esta aventura a qual está virando a melhor de todas... Te Amo meu amor!!

Agradeço a meus avós, minhas tias, meus tios, minhas primas e meus primos por suas orações, seu carinho e seu ânimo para eu continuar trilhando meu caminho.

Agradeço a minha amiga Laura por seu carinho, sua paciência e por sua amizade incondicional... Obrigada por tudo amiga!!!!... Tomara que a gente possa se encontrar de novo na Colômbia... Te adoro!!!

Agradeço à professora Samantha por arriscar em receber uma colombiana cheia de sonhos e expectativas na sua equipe de trabalho, muito obrigada pela confiança, pelo apoio e por acreditar em mim... pode contar comigo sempre e lembre que desde agora tem uma amiga colombiana... Deus abençoe sempre!!!

Agradeço à professora Andrezza Fernandes por me receber no seu laboratório, me dar um espaço no seu grupo de trabalho, me ajudar no processo do Mestrado e por seus ensinamentos... a gente se vê no Doutorado...

Agradeço a Marília Moraes pela ajuda e por tirar de seu tempo para me ensinar coisas maravilhosas. Agradeço sua dedicação e paciência ... e Parabéns mamãe!!!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas por me receber tão bem e fazer que me sentisse em família ... Obrigada pelos momentos compartilhados, suas risadas, sua alegria e pela comida gostosa rsrsrs ... nunca esquecerei!!! ... e lembrem que cada vez que estejam com vontade de mousse de maracujá é só avisar.

Agradeço a Silvia Seraphin por sua paciência e dedicação e por seu esforço para que eu aprendesse direitinho... Muito Obrigada por tudo!!!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Saúde Animal por sua amabilidade e me receber e permitir que me sentisse em casa... Muito Obrigada!!!

Agradeço ao Laticínio Imperial Jureia (Monte Belo, MG), na pessoa do proprietário, Sr. Roberto Costa, e da Eng^a de Alimentos Thalita Costa Liano, por seu apoio e disponibilizar do seu tempo e as instalações do laticínio para levar a cabo nosso projeto.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida, a qual me permitiu desenvolver este projeto de Mestrado.

Agradeço a Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos e a todos os professores pelos ensinamentos obtidos durante a realização do curso.

Agradeço aos meus amigos por cada momento juntos por cada festinha, reunião, almoço, janta, etc. vocês são parte de minha vida agora e sei que algum dia temos que ir embora, mas nunca vou esquecer de vocês. Obrigada mesmo!!!

RESUMO

BEDOYA-SERNA, C.M. **Avaliação da atividade antifúngica de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) nanoemulsionado e estudo de caso em queijo Minas Padrão.** 2015. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Este trabalho de Mestrado teve por objetivo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* e em queijo Minas Padrão de duas formulações (A e B) de nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) produzidas pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT). *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram os fungos identificados nas amostras de queijo Minas Padrão deteriorados. Tais cepas foram utilizadas na avaliação da atividade antifúngica *in vitro* e em queijo Minas Padrão do óleo de orégano nanoemulsionado. Nos testes *in vitro* foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias (CMI) do óleo essencial de orégano puro e nanoemulsionado sobre o *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Foram utilizadas fatias de queijo Minas Padrão para avaliar o efeito inibitório das nanoemulsões contendo óleo essencial de orégano. Por último foi avaliado o efeito inibitório das nanoemulsões durante o processo de maturação de queijos Minas Padrão. Determinaram-se valores de CMI para óleo essencial puro de 0,2; 0,3 µg/ml para *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente. Enquanto para as duas formulações de nanoemulsão; os valores de CMI dependeram da quantidade de óleo essencial de orégano que estava contido nelas, obtendo-se valores de 0,26; 0,11 e 1,62 µg/ml para a formulação A de óleo de orégano nanoemulsionado sobre *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., respectivamente, e CMIs de 0,32; 0,1 e 0,8 µg/ml para a formulação B de nanoemulsão sobre os mesmos gêneros de fungos. Os ensaios nas fatias de queijo evidenciaram que o efeito das CMIs, quando aplicadas na matriz alimentícia, foi nulo, permitindo o desenvolvimento normal dos fungos avaliados, da mesma forma se determinou a importância da atividade de água no crescimento fúngico. Já nos queijos em ambiente de maturação o efeito inibitório do óleo de orégano foi pouco satisfatório, o que indicou a importância do controle dos demais parâmetros ambientais no ambiente de maturação. Pode-se concluir que o óleo essencial de orégano nanoemulsionado apresentou efeito inibitório contra os gêneros de fungos avaliados. Quando controlados parâmetros ambientais como temperatura de armazenamento e atividade de

água, seu efeito inibitório pode ser amplamente melhorado, apresentando-o como potencial alternativa na conservação dos alimentos.

Palavras-chave: nanoemulsões; método PIT; inibição fúngica; orégano; queijos.

ABSTRACT

BEDOYA-SERNA, C.M. **Evaluation of antifungal activity of nanoemulsions encapsulating oregano essential oil and case study in Minas Padrão cheese.** 2015. Master Thesis - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This Master Thesis aimed to evaluate the *in vitro* antifungal activity and in Minas Padrão cheese of two formulations (A and B) of nanoemulsions encapsulating essential oil of oregano (*Origanum vulgare*) produced by the method of phase inversion temperature (PIT method). *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. fungi were identified in deteriorated cheese samples. These strains were used in the evaluation of antifungal activity of oregano essential oil nanoemulsions, both *in vitro* and in cheese. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of essential oil of pure oregano oil and nanoemulsions were determined. Cheese slices were used to evaluate the inhibitory effect of nanoemulsions containing essential oil of oregano. Finally the inhibitory effect of encapsulated oregano oil was tested during cheese ripening. MIC values determined for pure essential oil were 0.20 and 0.3 µg/ml for *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp., respectively. As for the two nanoemulsion formulations, MIC values depended on the amount of essential oil of oregano which was contained therein, and the values for formulation A were 0.26, 0.11 and 1.62 µg / ml for *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp, respectively. For formulation B, the values of MIC were 0.32, 0.10 and 0.80 µg/ml. The tests on the cheese slices showed that the effect of MIC when applied in the food matrix was null, as the fungi growth was not avoided. As for the tests during cheese ripening, the inhibitory effect of oregano oil in nanoemulsions was unsatisfactory, which indicated the importance of controlling other environmental parameters in the maturation chamber. It can be concluded that the nanoemulsions of essential oil presented inhibitory effect against the genera of fungi evaluated. Controlled environmental parameters such as storage temperature and water activity, its inhibitory effect can be highly improved, and the nanoemulsions of oregano oil can be seen as a potential system for food preservation.

Keywords: nanoemulsions; phase inversion temperature; oregano essential oil; fungal growth inhibition; cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aparência de queijo Minas Frescal.....	25
Figura 2. Aparência de queijos tipo Minas curado.....	26
Figura 3. Aparência de queijos Minas Padrão.....	27
Figura 4. Estrutura química do carvacrol e o timol principais princípios ativos do óleo essencial de orégano (<i>O. vulgare</i>).....	33
Figura 5. Representação esquemática da dependência da curvatura das camadas de tensoativo polietoxilado com a temperatura, e sua influência na característica das emulsões	39
Figura 6. Esquema do mecanismo de geração de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT): (a) a temperatura do sistema está abaixo da temperatura PIT; (b) sistema durante o aumento da temperatura, em que os tensoativos gradualmente se transformam em lipofílicos; (c) sistema na temperatura PIT; (d) a temperatura é levada acima do PIT, a emulsão é invertida e a água é dispersa na mistura óleo + tensoativo lipofílico. O sistema é então rapidamente resfriado, usando água diluída, tornando subitamente o tensoativo hidrofílico e induzindo a espontaneidade e a rápida migração para a fase aquosa	40
Figura 7. Aspecto visual das dispersões de nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano	48
Figura 8. Amostras comerciais de queijos deteriorados utilizados na identificação dos fungos .	49
Figura 9. Vista do Laticínio Imperial Jureia, localizado na cidade de Monte Belo, MG.....	51
Figura 10. Fluxograma de processo do queijo Minas Padrão fabricado no Laticínio Imperial Jureia	52
Figura 11. Porcentagem de crescimento dos diferentes tipos de fungos encontrados na superfície e no interior das amostras de queijo Minas Padrão analisadas.....	62
Figura 12. Visualização da concentração mínima inibitória do óleo de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) puro para <i>Fusarium</i> sp.	64
Figura 13. Visualização da concentração mínima inibitória do óleo de orégano (<i>Origanum vulgare</i>) em sua forma livre para <i>Penicillium</i> sp.....	64
Figura 14. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Cladosporium</i> sp.	65

Figura 15. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Fusarium</i> sp.	66
Figura 16. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Penicillium</i> sp.....	66
Figura 17. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Cladosporium</i> sp.	67
Figura 18. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Fusarium</i> sp.	68
Figura 19. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para <i>Penicillium</i> sp.....	69
Figura 20. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação A da nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano (fungo testado: <i>Fusarium</i> sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).	72
Figura 21. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação A da nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano em concentração de 11,7 µg/ml de óleo essencial (fungo testado: <i>Fusarium</i> sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).....	73
Figura 22. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação B da nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano (fungo testado: <i>Fusarium</i> sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).....	74
Figura 23. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação B da nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano em concentração de 18 µg/ml de óleo essencial (fungo testado: <i>Fusarium</i> sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).....	75
Figura 24. Ação antifúngica sobre <i>Cladosporium</i> sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T ₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T ₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.....	77
Figura 25. Ação antifúngica sobre <i>Cladosporium</i> sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da	

formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 78

Figura 26. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 79

Figura 27. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 80

Figura 28. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 81

Figura 29. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 82

Figura 30. Ação antifúngica sobre *Cladosporium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 84

Figura 31. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 84

Figura 32. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão. 85

Figura 33. Forma de imersão dos queijos Minas Padrão em nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano.	86
Figura 34. Aparência dos queijos tipo Minas Padrão imediatamente após a imersão nas formulações A e B de óleo de orégano nanoemulsionado, na câmara de maturação.	87
Figura 35. Aparência dos queijos tipo Minas Padrão imersos nas formulações A e B de óleo de orégano nanoemulsionado, na câmara de maturação, após 30 dias.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de queijo de acordo ao teor de gordura.	24
Tabela 2. Classificação de queijo de acordo ao teor de umidade.	25
Tabela 3. Gêneros e espécies de fungos filamentosos comumente presentes como agentes contaminantes em queijos maturados	29
Tabela 4. Compostos ativos do óleo de orégano.	32
Tabela 5. Estudos recentes sobre nanoencapsulação de óleos essenciais.....	41
Tabela 6. Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados.	46
Tabela 7. Formulações utilizadas para produção das nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano.	47
Tabela 8. Tratamentos utilizados na etapa de avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões em queijos Minas Padrão.	53
Tabela 9. Valores das contagens de fungos na superfície e no interior das amostras dos queijos Minas Padrão	56
Tabela 10. Imagens macroscópicas e microscópicas dos fungos encontrados na superfície de diferentes amostras de queijo Minas Padrão contaminados.	58
Tabela 11. Imagens macroscópicas e microscópicas dos fungos encontrados no interior das amostras de queijo Minas Padrão contaminados.....	59
Tabela 12. Exemplos de placas ilustrando os gêneros escolhidos para ser utilizados nos ensaios de atividade antifúngica do óleo de orégano nanoemulsionado in vitro.	63
Tabela 13. Valores de concentração mínima inibitória para os fungos testados, para o óleo de orégano puro e nanoemulsionado.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PIT	Do inglês <i>Phase Inversion Temperature</i> – Temperatura de Inversão de Fases
T _{PIT}	Temperatura em que ocorre a inversão de fases
CMi	Concentração Mínima Inibitória
MG	Minas Gerais (Estado)
A/O	Água/Óleo
O/A	Óleo/Água
CFM	Concentração Fungicida Mínima
HLB	Balanco Hidrofílico-Lipofílico
DRBC	Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
PDA	Ágar Batata Dextrose
OG	Óleo de Girassol
OO	Óleo Essencial de Orégano
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
PDA+C	Ágar Batata Dextrose adicionado de Cloranfenicol
EST	Valor Estimado
sp.	Espécie
T ₀	Tempo zero
T ₃₀	Tempo 30 minutos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
FETAEMG	Federação de Trabalhadores na Agricultura do Estado de Minas Gerais

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Nanômetros
μl	Microlitros
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
ml	Mililitro
rpm	Revoluções por minuto
g	Gramas
μg	Microgramas
≤	Menor ou igual que
>	Maior que
<	Menor que
kg	Quilogramas
+	Mais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1. HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE QUEIJOS NO BRASIL.....	23
2.2. QUEIJO MINAS.....	25
2.2.1. Queijo Minas Padrão	26
2.2.1.1. Contaminação fúngica em queijos maturados.....	28
2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES DE CONSERVAÇÃO	31
2.4. NANOEMULSÕES: PRODUÇÃO POR MÉTODOS DE BAIXA ENERGIA E APLICAÇÕES EM ALIMENTOS.....	37
2.4.1. Produção de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases.....	38
3. OBJETIVOS	44
3.1. OBJETIVO GERAL	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. MATERIAIS.....	45
4.1.1. Amostras de queijo Minas Padrão	45
4.1.2. Produção das nanoemulsões	45
4.1.3. Análises microbiológicas.....	46
4.2. MÉTODOS	47
4.2.1. Produção das nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano pelo método de inversão de fases (método PIT)	47
4.2.2. Identificação dos fungos encontrados nas amostras de queijos Minas Padrão	48
4.1.3. Ensaios <i>in vitro</i> para avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões	50

4.1.3.1.	Preparo da suspensão de esporos de fungos.....	50
4.1.3.2.	Avaliação da inibição do crescimento dos fungos deteriorantes.....	50
4.1.4.	Produção e caracterização do queijo tipo Minas Padrão	51
4.1.5.	Avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões em queijos Minas Padrão	52
4.1.6.	Avaliação da contaminação fúngica do queijo Minas Padrão adicionado com nanoemulsões contendo óleo de orégano	53
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1.	IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MAIS COMUMENTE ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE QUEIJO MINAS PADRÃO	55
5.2.	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DAS NANOEMULSÕES	63
5.3.	AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DAS NANOEMULSÕES EM QUEIJOS MINAS PADRÃO	71
5.4.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO NANOEMULSIONADO EM QUEIJOS MINAS PADRÃO NO AMBIENTE DE MATURAÇÃO.....	85
6.	CONCLUSÕES	89
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	90
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
	ANEXOS	106

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o sexto produtor mundial de queijo, com mais de 1 milhão de toneladas produzidas em 2014. O estado de Minas Gerais apresenta-se como grande destaque na produção de queijos de relevante importância tanto econômica quanto social, sendo que os principais queijos artesanais produzidos no Estado estão concentrados nas regiões da Serra da Canastra, Serro, Araxá, Alto Paranaíba e Campos das Vertentes. Entre os queijos considerados genuinamente brasileiros, por terem sido desenvolvidos localmente, encontram-se o queijo Prato, Minas Frescal, Minas Padrão, Minas Meia-Cura, queijo do Reino, Requeijão e Queijo de Coalho, sendo o queijo Minas o mais produzido no estado de Minas Gerais, além de poder ser encontrado em praticamente todo o país, ocupa o terceiro lugar na produção nacional de queijos.

O queijo Minas Padrão, é um queijo prensado, semicurado, de umidade alta e semigordo. É produzido a partir de leite pasteurizado e apresenta cor, odor e sabor diferenciado. É um produto que precisa refrigeração durante o armazenamento e comercialização, já que elevadas temperaturas causam diminuição na sua qualidade. Embora seja um queijo muito fabricado e bastante consumido no país, ainda não se tem descrito um regulamento técnico que vigie sua identidade, qualidade e padronização.

O queijo Minas Padrão por ser classificado como queijo de alta umidade, pode ser atingido por um sem número de microrganismos patogênicos como por exemplo *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*, no entanto, por se tratar de um produto maturado, não é só susceptível a ser contaminado por este tipo de bactérias patógenas durante o processo de produção, mas também por fungos patogênicos no processo de maturação, devido a ficar exposto ao ambiente por longos períodos de tempo. A grande preocupação é que a legislação vigente não estabelece limites para contaminação por fungos e leveduras, pois além de causar problemas na qualidade e vida de prateleira do queijo, podem causar doenças transmitidas por alimentos.

Por outro lado, devido ao crescente interesse da indústria por substituir agentes conservadores sintéticos por conservadores naturais, surge a possibilidade de usar os óleos essenciais como mecanismos de conservação dos alimentos. Os óleos essenciais são substâncias complexas formadas por dezenas de compostos diferentes, oriundas de diferentes partes das plantas como raízes, folhas, sementes e cascas. A qualidade do óleo essencial de orégano está representada pela mistura dos seus principais compostos ativos como o carvacrol, o timol, o cimeno, o terpineno. O

crescente interesse no uso do óleo essencial de orégano na preservação de alimentos se deve ao fato de possuir um amplo espectro de atividade antimicrobiana e antifúngica. O timol e o carvacrol principais princípios ativos do óleo de orégano apresentam conhecida atividade inibitória contra uma ampla gama de bactérias, diversas leveduras e fungos filamentosos. Como exemplo cabe destacar a eficácia do timol contra bactérias como *E. coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphimorium* e leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*; por sua vez, o carvacrol é eficaz contra fungos, como *Aspergillus*, e bactérias patogênicas como *Salmonella*, *E. coli*, *S. thyphimorium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*.

Em alimentos, altas concentrações de óleos essenciais são necessárias para conseguir o mesmo efeito antimicrobiano exercido por conservadores sintéticos, tais concentrações podem, muitas vezes, causar efeitos sensoriais desagradáveis para os consumidores, desencadeando rejeição do consumidor ao produto alimentício.

Do ponto de vista tecnológico o emprego de óleos essenciais na conservação de alimentos, entretanto, enfrenta alguns desafios, como baixa estabilidade durante a armazenagem devido à sua alta volatilidade e a dificuldade de incorporação em formulações aquosas, já que se trata de substâncias hidrofóbicas. Com a finalidade de contornar tais desvantagens, a nanoencapsulação tem sido proposta como alternativa, visando, além de aumentar a solubilidade dos óleos essenciais em formulações aquosas, o aumento da sua estabilidade química durante o tempo de armazenagem e, em alguns casos, até mesmo a melhora da sua ação antimicrobiana. Devido ao seu tamanho nanométrico, estes sistemas podem interagir de modo mais eficiente com a matriz alimentícia a ser conservada, possibilitando o controle da liberação dos compostos ativos do óleo essencial. Dentre os diferentes nanossistemas que podem ser empregados com este objetivo são as nanoemulsões. Tratam-se de sistemas emulsionados que possuem gotas com tamanho médio entre 20 e 200 nm; são sistemas translúcidos a olho nu e possuem baixa estabilidade termodinâmica, mas, exibem alta estabilidade cinética, o que os pode tornar estáveis por um longo tempo de armazenagem; a baixa viscosidade e transparência óptica os fazem extremamente atraentes para utilização na área farmacêutica e de alimentos.

Há duas abordagens para a produção de nanoemulsões, a primeira categoria envolve a adição de grande quantidade de energia no sistema (processos de alta energia), e a segunda categoria envolve adição de baixa quantidade de energia (processos de baixa energia). Mas, os processos de

alta energia muitas vezes são extremamente dispendiosos para aplicações industriais, especialmente quando se deseja um tamanho médio de partícula muito pequeno.

A produção de nanoemulsões por métodos de baixa energia pode ser classificada em auto-emulsificação, onde o fenômeno ocorre devido a fatores como mudança de composição do sistema, variação de condições ambientais e condições de mistura; e métodos de transição de fase fazem uso da energia química liberada durante a transição de fases que ocorre durante o processo de emulsificação.

Dentre as metodologias de transição de fase está o método PIT (do inglês, *phase inversion temperature*), baseado na mudança de solubilidade de tensoativos polietoxilados não-iônicos com a temperatura, resultando, na inversão de emulsões O/A em emulsões A/O, tal método de emulsificação leva à formação de nanoemulsões extremamente estáveis quando o sistema for inicialmente emulsificado perto da temperatura PIT (T_{PIT}) e a seguir resfriado rapidamente.

Dentro deste contexto, este trabalho de Mestrado teve como objetivos avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de orégano nanoemulsionado e sua eficácia como agente antifúngico em queijo Minas Padrão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE QUEIJOS NO BRASIL

Atualmente, a indústria de queijos ocupa lugar de destaque na economia global, sendo os Estados Unidos o maior produtor, e responsável por 26% da produção mundial, enquanto o Brasil ocupa a sexta posição, com 1,1 milhão toneladas produzidas em 2014 (NUNES-FILHO, 2012; SCARCELLI, 2015). O Brasil, com uma produção de 24,7 bilhões de litros de leite em 2014, apresenta a quinta posição entre os maiores produtores mundiais deste produto (EMBRAPA, 2012; IBGE, 2015), sendo 11 bilhões de litros deste montante destinado à fabricação de queijo, demonstrando a importância social e econômica de tal produto no país (SCARCELLI, 2015). No Brasil, o estado de Minas Gerais apresenta-se tradicionalmente com grande destaque na produção de leite e produtos lácteos, sendo a produção de queijos de relevante importância tanto econômica quanto socialmente (DE ALMEIDA et al., 2011). O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos e o responsável pela metade do consumo nacional, sendo gerador de empregos para aproximadamente 30 mil famílias. Os principais queijos artesanais produzidos no estado de Minas Gerais estão concentrados nas regiões da Serra da Canastra, Serro, Araxá, Alto Paranaíba e Campos das Vertentes (SILVA, 2007; DE ALMEIDA et al., 2011).

O primeiro evento de importância para o desenvolvimento da indústria queijeira no Brasil ocorreu em 1880, quando o português Carlos Perreira de Sá Fortes trouxe dois mestres queijeiros da Holanda, que introduziram na Zona da Mata mineira (atualmente na região da cidade de Santos Dumont, localizada na Serra da Mantiqueira) uma adaptação do queijo edam. Em 1920, o dinamarquês Thovard Nielsen escolheu a região do Alto Rio Grande, no sul de Minas Gerais, para produzir o queijo de massa semicozida, inspirado nos tradicionais *tybo* e *danbo*, e que foi denominado queijo tipo prato. Os dinamarqueses fundaram as mais tradicionais indústrias de queijo do país, e deram início à produção de diversas variedades europeias (gorgonzola, *gruyère*, gouda, *port-salut* e *camembert*). A disseminação destas variedades de queijos pelo país foi bem lenta, porque exigiam condições de produção e maturação especiais, ficando, por isso, conhecidos como queijos finos. O contrário ocorreu com o queijo prato, que era de mais fácil produção, e exigia menos conhecimento das técnicas de queijaria (CHALITA et al. 2009).

O consumo de queijos no Brasil gira em torno de 5 kg per capita, considerado baixo em comparação a outros países como Argentina e França, em que o consumo é de 11 e 23 kg per capita,

respectivamente. As tendências, entretanto, apontam que tem havido um crescimento do consumo. Quase 50% do consumo ainda é de mussarela e prato para uso culinário, porém, o consumo de queijos finos vem aumentando significativamente (CHALITA et al., 2009; ABIQ, 2011; SCARCELLI, 2015).

Tecnicamente, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácticos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1952).

A legislação vigente (BRASIL, 1996), classifica os queijos de acordo com o conteúdo de gordura e de umidade, conforme explicitado nas Tabelas 1 e 2. Entre queijos considerados genuinamente brasileiros, por terem sido desenvolvidos localmente, encontram-se o queijo Prato, Minas Frescal, Minas Padrão, Minas Meia-Cura, Reino, Requeijão e Queijo de Coalho, os quais se caracterizam por estar dentro destas classificações.

Tabela 1. Classificação de queijo de acordo ao teor de gordura (fonte: BRASIL, 1996; Borges do Carmo, 2013).

Classificação	% gordura
Extra gordo ou duplo creme	≥ 60 %
Gordos	45 – 59,9 %
Semigordo	25 – 44,9 %
Magros	10 – 24,9 %
Desnatados	<10%

Tabela 2. Classificação de queijo de acordo ao teor de umidade (fonte: BRASIL, 1996; Borges do Carmo, 2013).

Classificação	% umidade
Baixa umidade (massa dura)	$\leq 35,9 \%$
Media umidade (massa semidura)	36 – 45,9 %
Alta umidade (massa branda ou “macios)	46 – 54,9 %
Muito alta umidade (massa branda ou “moles”)	$>55\%$

2.2. QUEIJO MINAS

Segundo Santos et al. (1997), o queijo Minas é um dos produtos lácteos brasileiros mais importantes, podendo ser encontrado em praticamente todo o país, e ocupando o terceiro lugar na produção nacional de queijos. Esta tendência é justificada pela simplicidade de sua tecnologia de fabricação, pelo alto rendimento e pelo baixo investimento em sistemas de estocagem e conservação (ZARBIELLI et al. 2004).

O queijo tipo Minas é produzido por coagulação enzimática, e possui massa crua, forma cilíndrica, diâmetro cerca de duas vezes a altura e pode pesar entre 0,3 e 5 kg, sendo normalmente classificado em Minas Frescal, Minas Padrão ou Meia-Cura, e Minas Artesanal ou curado (OLIVEIRA, 1986).

O queijo Minas Frescal (ilustrado na Figura 1) é produzido com leite de vaca pasteurizado, tem baixa acidez e sua vida de prateleira é bem curta (em torno de 9-10 dias sob refrigeração). É classificado como um queijo macio, semi-gordo, de alta umidade, tem cor esbranquiçada e odor suave (PERRY, 2004).

Figura 1. Aparência de queijo Minas Frescal (fonte: Charcutaria.org)

Por sua vez, o queijo Minas curado é feito com leite não-pasteurizado e deve ser conservado à temperatura ambiente, tem sabor relativamente forte, consistência bastante dura, baixa umidade, e só pode ser comercializado depois do processo de maturação de 60 dias (ilustrado na Figura 2) (OLIVEIRA, 1986; PERRY, 2004).

Figura 2. Aparência de queijos tipo Minas curado (fonte: FETAEMG)

2.2.1. Queijo Minas Padrão

Dentre os queijos mais antigos e originalmente brasileiros, está o queijo Minas Padrão, cuja origem remonta ao século 19, sobretudo em Minas Gerais. Esta variedade de queijo, ilustrada na Figura 3, originou-se de variedades distintas que foram aperfeiçoando ao longo da história, resultando em queijos com identidades próprias, dependendo da região o queijo Minas Padrão também é denominado Minas Meia-Cura, Minas curado ou, ainda, Minas prensado (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994; LONDOÑO; FURTADO; ABREU, 1999).

Figura 3. Aparência de queijos Minas Padrão (fonte: Queijos do Brasil)

O RIISPOA (REGULAMENTO DA INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL) define o queijo Minas Padrão como um produto obtido de leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante vinte (20) dias. Além disso, deve apresentar formato cilíndrico, massa entre 1 e 1,2 kg, crosta fina amarelada, consistência semidura tendendo a macia, eventualmente com pequenos buracos devido ao prensado mecânico; cor homogênea branco-creme; odor característico e sabor ácido agradável (BRASIL, 1952). Para o queijo Minas Padrão tradicional, em termos de composição, espera-se teores de umidade entre 46%-49%, gordura de 23%-25% e cloreto de sódio entre 1,4%-1,6%; o pH deve-se situar entre 5,0 e 5,2 (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Por suas características, este tipo de queijo precisa de refrigeração durante todo o período de armazenamento e comercialização, pois temperaturas elevadas causam excesso de acidificação e proteólise, originando sabores fortes, e tendência da diminuição da consistência (OLIVEIRA, 1986).

Embora seja um queijo muito fabricado e, conseqüentemente, bastante consumido, não só no estado de Minas Gerais mas em grande parte do Brasil, ainda não se tem descrito o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade desse produto, o que prejudica em muito sua padronização. O

queijo Minas Padrão é classificado como queijo de alta úmidade. Para este tipo de produtos a legislação estabelece limites de contaminação para coliformes a 30 e 45°C, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001).

O queijo Minas Padrão, por se tratar de um produto maturado, não é só susceptível a ser contaminado por bactérias patógenas durante o processo de produção mas também por fungos patogênicos no processo de maturação, onde fica exposto ao ambiente por longos períodos de tempo, o que pode gerar grande preocupação pois a legislação vigente não estabelece limites para contaminação por este tipo de microrganismos, os quais têm igual relevância na questão de conservação dos queijos quanto as bactérias (coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*), pois também podem causar doenças transmitidas por alimentos.

2.2.1.1. Contaminação fúngica em queijos maturados

As diferenças entre o queijo Minas Padrão e o queijo Minas frescal além do teor de umidade e a quantidade de sal, durante o processo de produção, é o processo de maturação; esta etapa é resultante do conjunto de ações de ordem bioquímica e bacteriológica simultâneas ou sucessivas, que permitem transformar a coalhada fresca em queijo. No curso da maturação, os componentes da coalhada fresca se transformam em diferentes produtos mais solúveis, é a natureza destes novos produtos o que faz com que cada queijo tenha suas características típicas e o faça diferente das demais variedades (BONASSI, 1985; AMIOT, 1991). No processo de maturação ocorrem três principais fenômenos, proteólise; lipólise e fermentações, os quais são responsáveis pelas características organolépticas dos queijos submetidos a maturação (BOURGEOIS, 1995; ROBINSON, 1987).

A maturação é umas das etapas mais exigentes com relação à qualidade final e ao risco econômico na fabricação do queijo (OLIVEIRA, 1986). Além dos controles das condições ambientais dentro das câmaras (temperatura entre 12-14 °C e umidade relativa 85%), o principal cuidado é em relação às transformações indesejáveis produzidas geralmente por microrganismos contaminantes que podem estar presentes no leite ou atingirem os queijos durante a fabricação, ainda, durante a cura, causando grandes danos (OLIVEIRA, 1986).

O crescimento de fungos pode causar modificações nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais que podem comprometer a qualidade dos mesmos ao causar alteração de sabor, descoloração, apodrecimento, formação de esporos patogênicos e alergênicos, e até

produção de micotoxinas (FILTENBORG et al., 1996; PERRY, 2004). As contaminações por fungos normalmente ocorrem após o processamento, e reduzem o tempo de vida de prateleira desses alimentos (PITT; HOCKING, 2009).

Diversos estudos demonstram que fungos filamentosos estão envolvidos na deterioração dos queijos, sobretudo em queijos submetidos a processos de maturação. A Tabela 3 relata alguns estudos de gêneros isolados de diferentes tipos de queijos que promovem a sua deterioração:

Tabela 3. Gêneros e espécies de fungos filamentosos comumente presentes como agentes contaminantes em queijos maturados

Tipo de queijo	Gênero ou espécie de fungo	Referência
Queijo suave e semiduro	<i>Penicillium commune</i>	Lund et al., 1995
	<i>Penicillium palitans</i>	
	<i>Penicillium nalgiovense</i>	
	<i>Penicillium verrucosum</i>	
Queijo Espanhol	<i>Penicillium sp.</i>	Barrios et al., 1998
	<i>Mucor sp.</i>	
Queijo de cabra e ovelha	<i>Geotrichum candidum</i>	Montagna et al., 2004
	<i>Penicillium sp.</i>	
	<i>Penicillium sp.</i>	
Queijo Cabrales	<i>Penicillium roqueforti</i>	Flórez et al., 2007
	<i>Geotrichum candidum</i>	
	<i>Acremonium charticola</i>	
	<i>Cladosporium</i>	
	<i>cladosporiodes</i>	
Queijo Camembert e Brie	<i>Geotrichum candidum</i>	Arteau e Labrie, 2010
	<i>Mucor racemosus</i>	
	<i>Penicillium camemberti</i>	
	<i>Penicillium caseicola</i>	
	<i>Penicillium chysogenum</i>	
	<i>Penicillium commune</i>	

	<i>Penicillium roqueforti</i>	
Queijo Fossa	<i>Penicillium</i> sp. <i>Aspergillus</i> sp.	De Santi et al., 2010
Queijo de cabra	<i>Penicillium</i> sp.	Bâth et al., 2012
Queijo Teleggio	<i>Penicillium commune</i> <i>Cladosporium</i> sp. <i>Geotrichum candidum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Aspergillus alliaceus</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus nidalus</i>	Panelli et al., 2012
Queijo Romy ou Ras	<i>Emmericella nidularis</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus glaucus</i> <i>Aspergillus flavipes</i> <i>Penicillium</i> sp. <i>Mucor</i> sp. <i>Rhizopus stolonifer</i>	El-Fadaly et al., 2015

No caso dos queijos duros e semiduros como o Minas Padrão, o crescimento de fungos é evitado através de revestimentos convencionais ou de trabalhosos processos de limpeza das câmaras de maturação e dos queijos em maturação, recorrendo a várias técnicas existentes (HOOFT; DIETRICH, 2014).

Existem dois processos convencionais para a maturação e proteção de queijos duros e semiduros; o primeiro deles é conhecido como “maturação natural” o qual envolve secar o queijo ao ar e aplicar um revestimento contendo inibidores e/ou banhos de natamicina (fungicida ativo) para protegê-lo contra o crescimento de fungos. Na maturação natural, como alternativa ao revestimento, durante e após a maturação, a superfície pode ser lavada com diferentes agentes de limpeza, posteriormente, ainda pode ser necessário limpá-los cortando as partes mofadas causadas por bolores penetrantes. Além destes métodos, a indústria tenta controlar a qualidade do ar das

câmaras de maturação (HOOFT; DIETRICH, 2014). Este processo representa um alto custo para o produtor seja pela mão de obra ou pelas perdas causadas na limpeza dos queijos.

O segundo processo envolve, logo após da salmoura, embalá-los em uma película plástica tipo *cryovac* com selagem a vácuo e termo encolhível (OLIVEIRA, 1986). Este tipo de armazenamento resulta em um produto macio, sem casca e com sabor típico de queijo novo, pois, o processo de maturação não ocorre efetivamente como também não ocorre perda de umidade o desenvolvimento das características próprias de um queijo maturado como o sabor e aroma (HOOFT; DIETRICH, 2014).

As maiores desvantagens que apresentam estes processos de conservação são a excessiva mão de obra nos métodos de limpeza seja pela lavagem gerando possíveis sabores indesejáveis ou pela retirada das partes mofadas resultando em perda direta do queijo e a mão de obra na manutenção das câmaras de maturação; e dependendo do uso final do queijo o revestimento plástico poderia ser ou não retirado resultando em mão de obra e descartes adicionais.

2.3. ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES DE CONSERVAÇÃO

Os óleos essenciais são compostos aromáticos obtidos de matérias-primas vegetais (flores, folhas, raízes, cascas), sendo caracterizados por alta volatilidade e por composição complexa (BURT, 2004). São formados por metabólitos secundários de plantas aromáticas. Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, dos quais 300 são comercializados especialmente para as indústrias farmacêutica, de alimentos, agrônômica, cosmética e de perfumaria (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008), devido ao fato de possuírem conhecida ação antimicrobiana, ação antifúngica, além, obviamente, de seu caráter aromático.

Embora a ação antimicrobiana dos óleos essenciais seja amplamente conhecida e comprovada, o seu mecanismo de ação ainda não foi completamente explicado em detalhes (LAMBERT et al., 2001). Devido ao grande número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, o mais provável é que sua atividade antibacteriana não seja atribuível a um mecanismo específico (CARSON et al., 2002). Os mecanismos mais comumente aceitos como responsáveis pela ação antimicrobiana são: degradação da parede celular; dano à membrana citoplasmática; danos às proteínas da membrana; perda dos componentes celulares; coagulação do citoplasma e diminuição do fluxo de prótons através da membrana celular (BURT, 2004). Em relação à atividade antifúngica, diversos estudos também têm demonstrado o potencial dos óleos essenciais em evitar

a proliferação de espécies como *Aspergillus*, *Microsporum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Zygosaccharomyces* e *Candida* em alimentos (THOMPSON et al., 1989; CONSENTINO et al., 2003; HOLLEY; PATEL, 2005; SACCHETTI et al., 2005; CARSON; HAMMER, 2011).

Dentre os óleos essenciais mais estudados devido às boas propriedades antifúngicas, se destaca o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*). O orégano é uma erva rizomatosa, baixa e rasteira; seus ramos são longos, pardo-esverdeados que se enraízam em contato com o solo; as folhas são pequenas, ovaladas, de cor verde e pubescentes (CASTRO; RAMOS, 2003). Trata-se de uma planta de espécie condimentar, perene, pertencente à família das *Lamiaceae*, muito utilizada na culinária, panificação e flavorizante de alimentos. A espécie é originária da região mediterrânea da Europa, Norte da África e Oriente Médio. A espécie foi aclimatada na América do Norte e nas regiões áridas da América do Sul.

O óleo essencial de orégano representa uma porcentagem de 0,15 – 0,40% na planta verde, possui sabor levemente picante, sendo o mesmo de cor amarelo-limão e de aroma intenso (CASTRO; RAMOS, 2003). A qualidade do óleo essencial é representada pela mistura dos seus compostos ativos como o carvacrol, o timol, o cimeno, o terpineno, entre outros (LAMBERT et al., 2001; RHAYOUR et al., 2003). A Tabela 4 mostra os principais compostos ativos do óleo essencial de orégano:

Tabela 4. Compostos ativos do óleo de orégano (fonte: Burt, 2004).

Componentes	% Composição
Carvacrol	Vestígios a 80%
Timol	Vestígios a 64%
γ -Terpineno	2 – 52%
p-Cimeno	Vestígios a 52%

O crescente interesse no uso deste óleo essencial na preservação de alimentos se deve ao fato de possuir um amplo espectro de atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2009). O timol e o carvacrol principais princípios ativos do óleo de orégano (Figura 4), são substâncias incoloras, isômeras que pertencem ao grupo dos terpenos; têm conhecida atividade antibacteriana,

antifúngica, analgésica e antioxidante por isso são amplamente utilizados na indústria cosmética, de higiene e de alimentos.

Figura 4. Estrutura química do carvacrol e o timol principais princípios ativos do óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) (fonte: Burt, 2004).

O timol apresenta uma conhecida atividade inibitória contra uma ampla gama de bactérias, incluindo *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thyphymorium* e diversas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*; por sua vez, o carvacrol é eficaz contra fungos, como *Aspergillus*, e bactérias patogênicas como *Salmonella*, *E. coli*, *S. thyphimorium*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* (GAYSINSKY, 2007; CARMO et al., 2008). Todos estes microrganismos são conhecidos por causar diversas doenças relacionadas com a ingestão de alimentos.

A literatura científica relata um grande número de pesquisas em que se estuda o efeito inibidor do óleo essencial de orégano contra o crescimento bacteriano e fúngico, no entanto, são poucas as pesquisas relatadas no uso deste óleo essencial como preservativo natural e agente antimicrobiano em alimentos. As pesquisas aqui citadas são dos últimos cinco anos.

Almeida et al. (2010) avaliaram a eficácia e os possíveis mecanismos envolvidos no estabelecimento da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *O. vulgare L.* e *O. majorana L.* na inibição do crescimento e sobrevivência de fungos patogênicos, e observaram que o óleo essencial de *O. vulgare* apresentou menor concentração inibitória mínima que *O. majorana*. A linhagem *C. krusei* foi única resistente a todas as concentrações de ambos os óleos essenciais. Ambos os óleos essenciais proporcionaram um efeito bactericida *in vitro* frente a *C. albicans*, *O. vulgare* apresentou inibição total do crescimento micelial radial frente ao *T. rubrum*. *O. vulgare* reduziu a conidação, produziu vazamentos do citoplasma, perda de pigmentação e perturbações à estrutura molecular no *A. flavus*. Os autores concluíram que os óleos essenciais de *Origanum*

podem ser considerados como compostos antifúngicos potenciais para controlar o crescimento de fungos patogênicos e a aparição de micose.

Por sua vez, Cueto-Wong et al. (2010) determinaram a atividade antifúngica do orégano mexicano sobre o crescimento micelial do fungo *Fusarium oxysporum* em sementes de tomate. Encontraram que a produção de biomassa foi totalmente inibida. A concentração de 0.5% do óleo essencial inibiu completamente a colonização que havia nas sementes sem afetar sua capacidade de germinação. Desta forma, concluíram que os resultados obtidos apresentam o potencial do orégano mexicano como importante inibidor, assim como agente fungicida de *F. oxysporum* em sementes de tomate.

Por sua vez, os estudos desenvolvidos por Gumus et al. (2010) analisaram as propriedades inibitórias de diferentes concentrações de óleos essenciais (cítricos, laurel, murta, orégano y segurelha) obtidos por destilação de vapor, sobre o *Aspergillus fumigatus* e o *Paecilomyces variotii*, isolados da margarina. Encontraram que o poder inibitório seguiu a seqüência: cítricos, orégano, segurelha, laurel y murta, da mesma forma encontraram que o *P. variotii* foi mais resistente aos óleos essenciais que o *A. fumigatus*. Concluíram que os resultados mostram a possibilidade de usar estes compostos como conservantes naturais em alimentos.

Já Mitchell et al. (2010) avaliaram o efeito inibitório *in vitro* de diferentes concentrações de óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus ochraceus*. Observaram que o óleo essencial apresentou um efeito inibitório significativo sobre todos os fungos analisados, afetando o crescimento micelial radial, a massa micelial, a viabilidade e a germinação de esporas e provocando alterações morfológicas. Concluíram que estes resultados mostraram que o óleo essencial de *O. vulgare* exerce um efeito fungitóxico significativo, suportando seu uso como agente antifúngico na conservação de alimentos.

Martín-Sánchez et al. (2011) avaliaram a atividade antifúngica superficial do óleo essencial de orégano em salsichões espanhóis fermentados e curados e seu efeito sobre a lipólise, proteólise e características sensoriais. Encontraram que a aplicação do óleo de orégano diminuiu a contaminação fúngica na superfície sem afetar o processo de secagem. A adição do óleo essencial de orégano aumentou os ácidos graxos insaturados, mas a lipólise não foi grandemente afetada. As mudanças proteolíticas se mostraram similares aos padrões em todas as salsichas. O óleo de orégano não afetou as características sensoriais, mas aumentou a dureza, melhorando a textura.

Concluíram que o uso de óleo essencial de orégano é uma alternativa como antifúngico natural para aplicação de produtos cárneos curados.

Por sua vez, Kocić-Tanackov et al. (2012) avaliaram o efeito antifúngico de extrato de orégano sobre três espécies de *Aspergillus* (*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. wentii*). Encontraram que a baixas concentrações (0,025ml/ml) o extrato de orégano inibiu completamente o crescimento de *Aspergillus wentii* enquanto o crescimento de *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger* foi inibido em 96% e em 46% respectivamente. Concluíram que o extrato pode ser usado como um preservativo para prevenir infecções fúngicas de origem alimentar e produção de micotoxinas.

Por sua vez, Timóteo dos Santos et al. (2012) avaliaram a eficácia da aplicação de quitosana combinada com óleo essencial de orégano na inibição in vitro e em uva (*Vitis labrusca* L.) de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger*. Encontraram que a CMI para quitosana e óleo de orégano foi de 10 mg/ml e 10 µl/ml respectivamente para ambas espécies de fungos. Enquanto à combinação, o *R. stolonifer* foi inibido numa concentração de 5 mg/ml quitosana+5 µl/ml óleo de orégano e o *A. niger* foi inibido apenas como uma concentração de 5 mg/ml quitosana+2,5 µl/ml óleo de orégano. Além disso a aplicação do revestimento composto de quitosana e óleo essencial de orégano preservou a qualidade física, físico-química e sensorial das uvas ao longo do armazenamento. Concluíram que os resultados obtidos demonstraram o potencial da combinação para o controle pós-colheita de fungos patogênicos em frutas.

Em outro estudo Lima de Sousa et al. (2013) avaliaram a eficácia da aplicação de óleos essenciais de orégano e alecrim de forma separada e combinada sobre o crescimento in vitro e em uva (*Vitis lebrusca* L.) de *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*. Encontraram que a CMI para óleo de orégano e óleo de alecrim foi de 0,25 e 1 µl/ml respectivamente em ambas espécies de fungos. Enquanto à mistura dos óleos essenciais, o crescimento das duas espécies de fungos foi inibido em concentrações muito menores ($\frac{1}{4}$ da CMI de cada óleo essencial). Em uva, o óleo de orégano inibiu completamente o crescimento das duas espécies de fungos na concentração inibitória mínima. Para *A. niger* a combinação de óleos essenciais na concentração de $\frac{1}{4}$ da CMI de cada óleo essencial apresentou maior efeito inibidor, enquanto para o *A. flavus* o maior efeito da mesma combinação se apresentou na concentração de $\frac{1}{2}$ da CMI de cada óleo essencial. Concluíram que a aplicação dos óleos preservou a qualidade das uvas e a combinação deles mostrou ter potencial no controle pós-colheita de fungos patogênicos em frutas.

Santin et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis*, levedura causante de otites e dermatites em pequenos animais. Encontraram que para os 42 isolados de *M. pachydermatis* as CMI e CFM variaram entre 0,87 – 7 mg/ml, permitindo determinar que este microrganismo é sensível ao efeito do óleo essencial de orégano. Concluíram que o óleo essencial de orégano se apresenta como promissor na bioprospecção de novos fármacos para o tratamento de otites e dermatites na clínica de pequenos animais.

Stević et al. (2014) avaliaram as propriedades antifúngicas de 16 óleos essenciais sobre o crescimento de vinte um (21) espécies diferentes de fungos. Encontraram que os óleos de sagurelha, orégano, tomilho e rosa foram apresentaram o melhor efeito inibitório sobre todas as espécies de fungos avaliadas. Concluíram que os óleos de sagurelha, orégano, tomilho e rosa representam uma boa base para a formulação de produtos com potencial eficácia no controle de fungos, além disso, numa possível aplicação em larga escala, usando pequenas concentrações dos óleos podem trazer efeitos econômicos positivos.

Stupar et al. (2014) avaliaram efeito inibitório dos óleos essenciais de orégano, alecrim e lavanda e um efetivo biocida (cloreto de benzalcônio) sobre o crescimento de *A. niger*, *A. ochraceus*, *B. spicifera*, *Penicillium* sp. e *T. viride*. Encontraram que óleo essencial de orégano apresentou o maior efeito inibitório sobre as espécies de fungos avaliadas, seguido pelo óleo de lavanda e por último pelo óleo de alecrim. Concluíram que os resultados confirmaram o bem conhecido efeito inibitório do Cloreto de Benzalcônio e sugeriram o uso potencial dos óleos essenciais como novos agentes biocidas na conservação do patrimônio cultural. Além disto sugeriram que os óleos essenciais podem ser uma boa alternativa para os biocidas existentes devido à sua baixa toxicidade aos mamíferos, susceptibilidade à degradação e sua alta atividade inibitória.

Já Zabka et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica de vinte (20) óleos essenciais diferentes sobre o crescimento de *Alternaria alternata*, *Stochybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporoides* e *Aspergillus niger*. Os autores observaram que o óleo essencial de orégano teve a maior eficácia de inibição do crescimento sobre as espécies de fungos avaliadas, e concluíram que, devido a sua segurança ambiental e ser de origem natural, os óleos essenciais oferecem um potencial para tornar-se uma alternativa quando o uso de fungicidas sintéticos não podem ser usados por diferentes razões.

No entanto, normalmente altas concentrações de óleos essenciais são necessárias para conseguir o mesmo efeito antimicrobiano em alimentos exercido por os agentes conservadores sintéticos. Tais concentrações necessárias para inibir o crescimento de patógenos em alimentos podem, muitas vezes, causar efeitos sensoriais desagradáveis para os consumidores. A adição de pequenas quantidades de outros conservantes naturais em conjunto com o óleo essencial pode ser uma forma de proporcionar o equilíbrio entre a aceitabilidade sensorial e eficácia antimicrobiana (GUTIERREZ et al., 2008; NAVEENA et al., 2006).

Do ponto de vista tecnológico de aplicação dos óleos essenciais como conservantes alimentícios, entretanto, uma grande desvantagem é sua limitada solubilidade em meio aquoso. Com a finalidade de contornar tal desvantagem, a microencapsulação tem sido proposta como alternativa, visando, além de aumentar a solubilidade dos óleos essenciais em formulações aquosas, o aumento da sua estabilidade química durante o tempo de armazenagem e, em alguns casos, até mesmo a melhora da sua ação antimicrobiana (NAMUR et al., 2006).

2.4. NANOEMULSÕES: PRODUÇÃO POR MÉTODOS DE BAIXA ENERGIA E APLICAÇÕES EM ALIMENTOS

A nanotecnologia tem potencial para revolucionar o sistema alimentar mundial, pois através dela se podem desenvolver, por exemplo: novos sistemas de segurança agrícola e alimentar; métodos para liberação controlada de determinadas moléculas, como substâncias bioativas (ingredientes funcionais); nanosensores para detecção de patógenos e contaminantes; nanodispositivos para detecção e registro das condições ambientais às quais os alimentos são submetidos durante seu transporte, dentre outras aplicações (MORARU et al., 2003).

Particularmente, os sistemas de segurança alimentar são um campo de investigação altamente promissor na área de alimentos em associação à nanotecnologia, especialmente na substituição de aditivos (conservantes, por exemplo) artificiais por naturais. Os sistemas coloidais, como as nanoemulsões, são alternativas promissoras para se alcançar os objetivos já citados (MORARU et al., 2003).

Define-se como nanoemulsões os sistemas emulsionados que possuem gotas com tamanho médio na faixa de 20 a 200 nm, e, devido a esta característica, são sistemas translúcidos a olho nu e possuem baixa estabilidade termodinâmica, mas, por outro lado, exibem alta estabilidade cinética, o que os pode tornar estáveis por um longo tempo de armazenagem (SOLANS et al., 2005;

MASON et al., 2006; SAGALOWICZ; LESER, 2010). A baixa viscosidade e transparência óptica os fazem extremamente atraentes para utilização na área farmacêutica e de alimentos. Por se tratar de sistemas em não-equilíbrio termodinâmico, as nanoemulsões não são sistemas formados espontaneamente. Há duas abordagens para a produção de nanoemulsões, sendo que a primeira categoria envolve a adição de grande quantidade de energia no sistema (processos de alta energia), e a segunda categoria envolve adição de baixa quantidade de energia (processos de baixa energia).

No primeiro caso, a energia mecânica é inserida nos sistemas por equipamentos como homogeneizadores a alta pressão, microfluidizadores ou pela aplicação de altos níveis de energia ultrassônica (SPERNATH; MAGDASSI, 2007; ANTON et al., 2007; ANTON et al., 2008). Entretanto, tais métodos muitas vezes são extremamente dispendiosos para aplicações industriais, especialmente quando se deseja um tamanho médio de partícula muito pequeno.

2.4.1. Produção de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases

A produção de nanoemulsões por métodos de baixa energia pode ser realizada por metodologias classificadas em dois tipos: auto-emulsificação e métodos de transição de fase. De modo geral, na auto-emulsificação o fenômeno ocorre devido a diversos fatores: mudança de composição do sistema; variação de condições ambientais (pH, força iônica, temperatura); condições de mistura (intensidade de agitação, taxa de adição dos componentes, ordem de adição dos componentes) (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

Por outro lado, os métodos de transição de fase fazem uso da energia química liberada durante a transição de fases que ocorre durante o processo de emulsificação. Dentre tais metodologias está o método PIT (do inglês, *phase inversion temperature*), baseado na mudança de solubilidade de tensoativos polietoxilados não-iônicos com a temperatura (SOLANS et al., 2010; SHINODA, 1969), resultando, na inversão de emulsões O/A em emulsões A/O. Uma representação esquemática da emulsificação pelo método PIT pode ser visualizada na Figura 5:

Figura 5. Representação esquemática da dependência da curvatura das camadas de tensoativo polietoxilado com a temperatura, e sua influência na característica das emulsões (fonte: McClements e Rao, 2011).

Tal método de emulsificação foi inicialmente desenvolvido por Shinoda (1969) e Satio (1968), e leva à formação de nanoemulsões extremamente estáveis, se o sistema for inicialmente emulsificado perto da temperatura PIT (T_{PIT}) e a seguir resfriado rapidamente (SCHALBART et al., 2010). A Figura 6 mostra que no método PIT, a partir de certa temperatura, ocorre uma mudança na curvatura do tensoativo, o que altera sua afinidade (na verdade, altera seu valor de HLB, ou balanço hidrofílico-lipofílico) permitindo a migração para a outra fase e desta forma a transição de uma emulsão O/A para uma emulsão A/O (FERNANDEZ et al., 2004; McCLEMENTS; RAO, 2011; SOLANS; SOLÈ, 2012). Na temperatura PIT, a curvatura do tensoativo é próxima a zero e há a formação de estruturas bicontínuas ou lamelares (ANTON; VANDAMME, 2009; IZQUIERDO et al., 2004). No ponto em que a curvatura do tensoativo é próxima a zero, as barreiras que se opõem ao processo de coalescência são baixas e assim, a taxa de coalescência é extremamente alta, e é por essa razão, que a temperatura do sistema deve ser diminuída rapidamente, para que sejam produzidas nanogotas cineticamente estáveis ao longo do tempo (SOLANS; SOLÈ, 2012).

O tipo de tensoativo é muito importante no método PIT, só podendo ocorrer a transição de fases por temperatura quando se utilizam tensoativos sensíveis a alteração de temperatura, como os tensoativos não-iônicos polietoxilados, nos quais as mudanças de temperatura induzem uma mudança na hidratação das cadeias de polioxietileno, o que permite a alteração de sua curvatura (SAJJADI et al. 2004; SALAGER et al., 2004; ANTON; VANDAMME, 2009). De maneira simplificada pode-se dizer que em baixas temperaturas, a cabeça de tais tensoativos é hidratada, permitindo que eles sejam solúveis em água, enquanto que em temperaturas mais baixas as cabeças polares se desidratam e assim, tal tensoativo se torna insolúvel em meio aquoso. A partir de uma dada temperatura, denominada temperatura PIT, a afinidade do tensoativo com a fase oleosa e aquosa é equilibrada e a tensão interfacial é, portanto, muito baixa, sendo a curvatura espontânea do tensoativo igual a zero (MORALES et al. 2006; McCLEMENTS; RAO, 2011). Se o sistema for rapidamente resfriado após a inversão de fases, ocorre a nanoemulsificação da fase oleosa.

Figura 6. Esquema do mecanismo de geração de nanoemulsões pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT): (a) a temperatura do sistema está abaixo da temperatura PIT; (b) sistema durante o aumento da temperatura, em que os tensoativos gradualmente se transformam em lipofílicos; (c) sistema na temperatura PIT; (d) a temperatura é levada acima do PIT, a emulsão é invertida e a água é dispersa na mistura óleo + tensoativo lipofílico. O sistema é então rapidamente resfriado, usando água diluída, tornando subitamente o tensoativo hidrofílico e induzindo a espontaneidade e a rápida migração para a fase aquosa (adaptado de Anton; Vandamme, 2009).

Por outro lado, devido ao fato da nanoencapsulação ser uma tecnologia emergente e haver crescente interesse no uso dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos (principalmente como substitutos de aditivos artificiais), a literatura científica relata diversas pesquisas que estudam a nanoencapsulação de óleos essenciais e seu método de produção. A Tabela 5, lista exemplos de pesquisas realizadas com este enfoque nos últimos 4 anos:

Tabela 5. Estudos recentes sobre nanoencapsulação de óleos essenciais (publicados desde 2012)

Óleo essencial	Tipo de encapsulação	Método de encapsulação	Referências
Óleo essencial de orégano	Encapsulação em esferas de amido de arroz e capsulas de inulina e gelatina/sacarose	Spray drying	Beirão da Costa et al. (2012)
Óleo essencial de sálvia	Microencapsulação em matriz de proteína de soro concentrado-polissacarídeos	Spray drying	Rodea-González et al. (2012)
Óleo essencial de orégano	Encapsulação em micropartículas de amido	Impregnação por fluido supercrítico	Almeida et al. (2013)
Óleo essencial de orégano	Encapsulação em nanopartículas de quitosano	Gelificação iônica	Fakhreddin-Hosseini et al. (2013)
Óleo essencial de eucalipto	Nanoencapsulação com quitosano e Tween 80	Agitação mecânica	Ribeiro et al. (2014)
Óleo essencial de mandarina	Nanoemulsão com óleo de girassol,	Homogeneização por alta pressão	Severino et al. (2014)

	mono-oleato de glicerol e Tween 20		
Óleo essencial de orégano	Nanoemulsão O/A com óleo essencial e Tween 80	Ultrassonicação	Bhargava et al. (2015)
Óleo essencial de hortelã-pimenta	Nanopartículas de zeína, propilenoligol e goma arábica	Dispersão líquido-líquido	Chen e Zhong (2015)
Óleo essencial de eucalipto	Nanoencapsulação em goma do cajueiro	Spray dryer	Herculano et al. (2015)
Óleo essencial de <i>Zataria multiflora</i>	Encapsulação em nanopartículas de quitosana	Gelificação iônica	Mohammadi et al. (2015)
Óleos essenciais de capim-limão, cravo, árvore do chá, tomilho, gerânio, manjerona, palmarosa, pau-rosado, sálvia e hortelã	Nanoemulsões produzidas com Tween 80 e alginato de sódio	Microfluidização	Salvia-Trujillo et al. (2015)
Óleo essencial de tomilho	Nanogel de quitosano e ácido benzoico	Ultrassonicação	Tahereh-Khalili et al. (2015)
Óleo essencial de cominho	Nanogel de quitosano e ácido caféico	Ultrassonicação	Zhaveh et al. (2015)

Desta forma, é possível perceber que há um grande interesse no potencial do uso de nanoemulsões encapsulando óleos essenciais na indústria de alimentos; no entanto, ainda é necessário superar algumas barreiras tecnológicas. As principais desvantagens dos óleos essenciais

são apresentar curta vida de prateleira e dificuldade de dispersão em meios predominantemente hidrofílicos, as quais são possíveis de serem minimizadas em grande parte pela utilização de sistemas nanoemulsionados.

Por outro lado, a crescente demanda por produtos de origem natural pelos consumidores e a necessidade de substituir conservadores sintéticos por naturais da indústria é, com certeza, uma grande possibilidade para a utilização de óleos essenciais na conservação de alimentos, sobretudo no caso de alimentos que são facilmente atingidos por microrganismos patogênicos assim como os queijos curados ou semicurados.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho de Mestrado foi avaliar a ação antifúngica do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) nanoencapsulado em emulsões produzidas pelo método da temperatura de inversão de fases (método PIT), fazendo um estudo de caso em queijo tipo Minas Padrão.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral especificado, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

- Determinar quais tipos de fungos são mais comuns em amostras comerciais de queijo minas padrão disponíveis no mercado;
- Avaliar quantitativamente a ação antifúngica das nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano por meio de ensaios *in vitro*, através da determinação da concentração mínima necessária para que a ação antifúngica possa ocorrer.
- Avaliar a ação antifúngica das nanoemulsões em queijos tipo minas padrão, determinando as condições mínimas necessárias para que a ação antifúngica possa ocorrer.
- Avaliar a contaminação fúngica dos queijos tipo Minas Padrão incorporados com as nanoemulsões e compará-la a contaminação de queijos sem aplicação das nanoemulsões.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Amostras de queijo Minas Padrão

Foram obtidas 18 amostras de queijo Minas Padrão, sob inspeção, do Mercado Municipal da cidade de Poços de Caldas (MG), bem como amostras sabidamente deterioradas, doadas pelo Laticínio Imperial Jureia (Monte Belo, MG).

No momento da compra, as amostras estavam à temperatura ambiente. As amostras foram levadas para o Laboratório de Coloides e Funcionalidade de Macromoléculas, localizado na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP, onde foram armazenadas sob refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) até o momento da amostragem.

4.1.2. Produção das nanoemulsões

Na fase lipídica das nanoemulsões foi utilizado óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) (Anexo 1) fornecido pela FERQUIMA (Vargem Grande Paulista, SP) e óleo de girassol comercial (Liza, Cargill, Mairinque, SP).

Os tensoativos utilizados foram Kolliphor RH 40 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA), Brij 30 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e Span 80 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA).

A representação das moléculas dos tensoativos utilizados são mostradas na Tabela 6:

Tabela 6. Dados dos tensoativos empregados nos experimentos realizados. (fonte: Sigma-Aldrich; Resikem)

Tensoativo	HLB	Molécula
Cremophor RH40	15	$(L+M+N+X+Y+Z = 40)$
Span 80	4,3
Brij 30	9,7	<p style="text-align: center;">Brij-30</p>

4.1.3. Análises microbiológicas

Para identificação dos fungos nas amostras comerciais de queijo Minas Padrão foi utilizado ágar dicloran rosa de bengala cloranfenicol (DRBC – Acumedia - Neogen, São Paulo, SP). Nas diluições foi empregada água destilada estéril (autoclavada a 120 °C por 15 minutos). Para isolamento dos fungos e etapas subsequentes foi utilizado ágar batata dextrose (Acumedia - Neogen, São Paulo, SP), adicionado de cloranfenicol 50 mg. Os fungos foram visualizados e identificados microscopicamente por microscópio (Leica – Leica Microsystems, Alemanha). No preparo da suspensão de esporos se utilizou água ultrapura (Synergy® - Millipore Corporation – MilliUNI, França) autoclavada a 120 °C por 15 minutos e filtrada com filtro para seringa de 0,45 µm de poro (Kasvi - Curitiba, PR). Para garantir um adequado tratamento das amostras de queijo da fase inicial e as fatias de queijo Minas Padrão e evitar contaminações das placas de DRBC e PDA, foi utilizada uma cabine de segurança biológica classe II B2 (Filterflux – Piracicaba, SP). Para todas as análises microbiológicas foram utilizadas placas de Petri descartáveis de poliestireno

esterilizadas com oxido de etileno (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR). Para incubação dos fungos em todos os ensaios foi utilizada uma incubadora BOD microprocessada (Marqlabor – São José de Rio Preto, SP).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Produção das nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano pelo método de inversão de fases (método PIT)

O método empregado na produção das nanoemulsões foi o método da temperatura de inversão de fases (ou método PIT, do inglês, *phase inversion temperature*). Foram adicionados em um béquer os tensoativos, o óleo essencial de orégano, o óleo de girassol e água deionizada, de acordo com as formulações descritas na Tabela 7. Em seguida, os componentes da mistura foram submetidos à agitação magnética (MA085, Marconi) na velocidade de 1350 rpm, utilizando-se aquecimento até uma temperatura de aproximadamente 65° C.

Tabela 7. Formulações utilizadas para produção das nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano.

Formulações	Tensoativos	Fase lipídica*	Fase contínua (aquosa)
A	13%	6,5%	80,5%
	- Cremophor RH 40 (9,75%)	- OG (3,25%)	- Água ultrapura
	- Brij 30 (3,25%)	- OO (3,25%)	
B	20%	10%	70%
	- Cremophor RH 40 (12%)	- OG (5%)	- Água ultrapura
	- Span 80 (8%)	- OO (5%)	

*OG = óleo de girassol; OO = óleo de orégano

Após o aquecimento, as formulações de nanoemulsões foram resfriadas em um béquer encamisado, acoplado em um banho ultratermostatizado (MA184, Marconi), com água de resfriamento a 0° C, até a temperatura alcançar aproximadamente 20° C, sob agitação magnética

com velocidade de 585 rpm. As dispersões de nanoemulsões foram submetidas a dois ciclos de aquecimento e resfriamento.

A Figura 7 mostra o aspecto visual das dispersões de nanoemulsões obtidas após o segundo ciclo de resfriamento.

Figura 7. Aspecto visual das dispersões de nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano, formulações A e B.

4.2.2. Identificação dos fungos encontrados nas amostras de queijos Minas Padrão

As amostras de queijo Minas Padrão (representadas na Figura 8) foram analisadas no Laboratório Multiusuário de Microbiologia, localizado no Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP.

Figura 8. Amostras comerciais de queijos deteriorados utilizados na identificação dos fungos.

Os fungos foram isolados tanto da superfície (retirando-se uma amostra da camada mais externa do queijo, entre 0,3 e 0,5 cm de profundidade) quanto do interior (retirando-se cubos do centro dos queijos). Dez gramas de cada amostra (tanto da superfície quanto do interior), previamente homogeneizadas, foram diluídas em 90 ml de água destilada estéril (diluição até 10^{-1}). A partir desta diluição foram realizadas diluições sucessivas até 10^{-4} , com a inoculação de 0,1 ml em meio de cultivo dicloran rosa de bengala cloranfenicol – DRBC. As placas foram incubadas a temperatura de 25 °C por sete dias. Após este período foi efetuada a contagem de colônias e seu respectivo cálculo em unidades formadoras de colônia por grama de amostra (UFC/g). As colônias de diferentes tipos morfológicos foram isoladas em ágar batata dextrose + cloranfenicol (PDA+C) e posteriormente foram identificadas pela técnica de microcultivo. Os fungos foram classificados até o gênero (PITT; HOCKINS, 2009); desta forma, foram determinados quais os fungos mais abundantes nas amostras de queijo tipo minas padrão disponíveis no mercado. Dentre os fungos identificados, os três com maior ocorrência nas amostras de queijos foram empregados para os passos experimentais subsequentes.

4.1.3. Ensaios *in vitro* para avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões

4.1.3.1. Preparo da suspensão de esporos de fungos

Cepas dos gêneros *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., fungos escolhidos na etapa 4.2.2 foram cultivadas em ágar batata dextrose + cloranfenicol (PDA+C) a 25°C por sete dias para permitir esporulação significativa. Após a incubação, uma alça de semeadura estéril foi utilizada para remover os conídios do ágar. Os conídios foram ressuspensos em água ultrapura e ajustados com o uso de uma câmara de Neubauer para ajuste a uma concentração final de 10^4 a 10^5 esporos/ml (GARCÍA et al., 2011).

4.1.3.2. Avaliação da inibição do crescimento dos fungos deteriorantes

Para a atividade inibitória *in vitro* foi utilizado óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) e nanoemulsão de óleo de orégano produzida pelo método PIT (conforme descrito no item 4.2.1), a avaliação se fez por método quantitativo. Foram utilizadas concentrações de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 µg/ml de óleo essencial de orégano puro para os fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. e concentrações de 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,3 µg/ml para o *Cladosporium* sp., gêneros de fungos que apresentaram maior ocorrência de crescimento. Para as formulações A e B, as concentrações de nanoemulsão utilizadas dependeram do tipo de fungo a ser inoculado. Os valores das concentrações para os três gêneros de fungos estão dados em função do óleo essencial de orégano nanoencapsulado. Para *Cladosporium* sp. se usaram concentrações na faixa de 0,16 a 0,5 µg/ml. Por sua vez, para *Fusarium* sp. se utilizaram concentrações na faixa de 0,03 a 0,5 µg/ml, e, finalmente, para *Penicillium* sp. foram utilizadas concentrações na faixa de 0,16 a 2,5 µg/ml. Tanto o óleo essencial de orégano puro quanto as duas formulações (A e B) de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano foram diluídos em ágar batata dextrose + cloranfenicol (PDA+C), para obter as concentrações desejadas.

Espalhou-se 0,1 ml de cada suspensão contendo entre 10^4 e 10^5 esporos de fungos/ml em PDA+C contendo cada uma das concentrações de óleo e de nanoemulsão. As placas inoculadas foram incubadas a 25 °C por sete dias (ADIGUZEL et al., 2009). A atividade inibitória foi determinada pela presença ou ausência do crescimento fúngico. A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada como a menor concentração de óleo e nanoemulsão na qual houve inibição do crescimento fúngico (ADIGUZEL et al., 2009). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.1.4. Produção e caracterização do queijo tipo Minas Padrão

Os queijos tipo Minas Padrão utilizados nas etapas seguintes foram produzidos no Laticínio Imperial Jureia (localizado na cidade de Monte Belo, MG) (Figura 7). Todos os queijos utilizados foram produzidos sob as normas de Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 1997; BRASIL, 2001) e caracterizados físico-quimicamente de acordo com os testes realizados pelo referido laticínio.

Figura 9. Vista do Laticínio Imperial Jureia, localizado na cidade de Monte Belo, MG.

A Figura 8 mostra o fluxograma do processo de produção dos queijos Minas Padrão no Laticínio Imperial Jureia, utilizados na execução do presente trabalho de Mestrado:

Figura 10. Fluxograma de processo do queijo Minas Padrão fabricado no Laticínio Imperial Jureia.

4.1.5. Avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões em queijos Minas Padrão

Fatias de queijo de 2 mm de espessura e 50 mm de diâmetro foram cortadas e, colocadas em bandejas de aço inoxidável previamente esterilizadas, sendo a seguir expostas à radiação ultravioleta por 2 horas (uma hora para cada superfície), em cabine de fluxo laminar (metodologia adaptada de TAMIWAKI et al., 2001). A seguir, as fatias foram colocadas em placas de Petri. Os tratamentos utilizados se mostram na Tabela 8.

Tabela 8. Tratamentos utilizados na etapa de avaliação da ação antifúngica das nanoemulsões em queijos Minas Padrão.

Tratamentos	
Gênero de fungo	<i>Cladosporium</i> sp. <i>Fusarium</i> sp. <i>Penicillium</i> sp. Sem emulsão Emulsão pura
Concentração da emulsão*	Concentração mínima inibitória A: 3,25 µg/ml; B: 5 µg/ml A: 6,5 µg/ml; B: 10 µg/ml A: 11,7 µg/ml; B: 18 µg/ml
Tempo de imersão das fatias de queijo na nanoemulsão	Retirada imediata 30 minutos
Tipo de armazenamento	Temperatura ambiente (25° C) Refrigeração (4-5° C)

*Concentração da emulsão: quantidade de óleo essencial de orégano nanoemulsionado no líquido de imersão para as fatias de queijo (µg óleo de orégano/ml líquido de imersão).

As fatias de queijo foram imersas nas dispersões de nanoemulsões, e a seguir colocadas em placas de Petri para posterior inoculação fúngica com suspensão contendo entre 10^4 e 10^5 esporos de fungos/ml. Cada fatia foi inoculada no seu centro com um gênero de fungo escolhido de acordo com a Tabela 8. O efeito dos diferentes tratamentos foi avaliado visualmente pelo crescimento fúngico. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.1.6. Avaliação da contaminação fúngica do queijo Minas Padrão adicionado com nanoemulsões contendo óleo de orégano

A avaliação da contaminação fúngica do queijo Minas Padrão foi realizada no Laticínio Imperial Jureia (Monte Belo, MG). Queijos Minas Padrão de 500 gramas devidamente salgados, foram imersos nas duas formulações de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano (A e B)

e retirados na hora, após, foram dispostos em prateleiras plásticas dentro de uma câmara de resfriamento a uma temperatura de aproximadamente 10 °C por um tempo de 30 (trinta) dias para que seu processo de maturação pudesse ocorrer. Foram utilizados cinco (5) queijos por cada tratamento: Controle (sem emulsão); A (formulação A da nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano); B (formulação B da nanoemulsão contendo óleo de orégano). A contaminação fúngica foi avaliada visualmente pelo crescimento de colônias na superfície dos queijos durante o tempo de maturação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS MAIS COMUMENTE ENCONTRADOS NAS AMOSTRAS COMERCIAIS DE QUEIJO MINAS PADRÃO

A Tabela 9 mostra a comparação das médias do crescimento de fungos em todas as amostras, tanto na superfície quanto no interior dos queijos. As amostras 1 a 5 foram obtidas do Mercado Municipal de Poços de Caldas (MG). As amostras 6 a 18 foram doadas pelo Laticínio Imperial Jureia. Destas ultimas, as amostras 6, 7, 8 e 10 se encontravam sem embalagem e altamente deterioradas na sua superfície. Enquanto, a amostra 9 e as amostras 11 a 18 se encontravam com a embalagem original, mas, com evidentes sinais de deterioro.

Tabela 9. Valores das contagens de fungos na superfície e no interior das amostras dos queijos Minas

Amostra	Padrão	
	Superfície UFC/g	Interior UFC/g
1	$1,9 \times 10^3$	$3,2 \times 10^6$
2	$2,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
3	$2,9 \times 10^3$	$4,8 \times 10^3$
4	$2,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$
5	$2,8 \times 10^4$	$4,5 \times 10^3$ est.*
6	$1,1 \times 10^6$	$1,5 \times 10^2$ est.
7	$8,5 \times 10^3$ est.	2×10^2 est.
8	$9,5 \times 10^3$	$3,1 \times 10^6$
9	$< 1 \times 10^2$ est.	$7,3 \times 10^6$
10	1×10^4	$6,5 \times 10^4$
11	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
12	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
13	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
14	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
15	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
16	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
17	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.
18	$< 1 \times 10^2$ est.	$< 1 \times 10^2$ est.

*est = valor estimado de unidades formadoras de colônias por grama de amostra de queijo.

UFC/g = unidades formadoras de colônias por grama de amostra de queijo.

Para as 18 amostras de queijos, a contagem de unidades formadoras de colônias por grama de amostra esteve na faixa entre 10^1 e 10^6 UFC/g tanto para a superfície quanto para o interior. As amostras 5, 6 e 10 apresentaram os maiores valores para a superfície ($2,8 \times 10^4$, $1,1 \times 10^6$ e 1×10^4 UFC/g respectivamente), enquanto as amostras que apresentaram maiores níveis na contagem de colônias no interior foram 1, 8, 9 e 10 com valores de $3,2 \times 10^6$, $3,1 \times 10^6$, $7,3 \times 10^6$ e $6,5 \times 10^4$ UFC/g respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho relativamente altos, mas similares aos encontrados por Rocha (2004), que avaliou o crescimento fúngico durante a maturação de queijo

Minas Padrão encontrando um crescimento dentre 10^4 e 10^8 UFC/g de amostra para os 21 dias de maturação e os encontrados por Idênio-Schmitt et. al. (2011), que encontraram contagens entre $2,2 \times 10^4$ e $1,3 \times 10^9$ UFC/g em 30 amostras de queijo colonial (um outro tipo de queijo curado) comercializado no estado de Rio Grande do Sul. Araújo et. al. (2001) avaliaram seis amostras de queijo Minas Padrão e 24 de Minas frescal, e observaram que, das seis amostras, uma teve contagem de 10^3 UFC/g enquanto as outras cinco amostras se encontraram com níveis de 10^2 , entretanto, das 24 amostras de queijo Minas frescal, 18 apresentaram níveis de contaminação iguais ou maiores de 10^2 . Por sua vez, De Moraes (2005) estudou a microbiota fúngica em queijos manteiga (tipo de queijo curado) comercializados na cidade de João Pessoa (PB), e encontrou uma contagem de $4,7 \times 10^3$ UFC/g. Pode-se afirmar, portanto, que os queijos avaliados apresentaram níveis de contaminação fúngica típicos de queijos maturados presentes no mercado. .

Os resultados obtidos podem indicar que houve falhas no processo de fabricação ou na higiene das instalações, ou mesmo dos manipuladores, bem como na comercialização e disposição ao consumidor (Boas Práticas de Fabricação). Atualmente, a legislação vigente (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001) não estabelece limites máximos para contagem de bolores e leveduras para queijos com baixa ou média umidade. Devido ao processo de maturação que têm estes tipos de produtos, podem ser atingidos facilmente por diferentes microrganismos, especialmente fungos, o que pode representar diminuição na qualidade físico-química e sensorial do produto, afetando sua vida de prateleira e a final rejeição do consumidor.

Para dar continuidade à identificação dos fungos encontrados nas amostras de queijo foram isoladas de todas as placas as colônias de fungos que apresentaram diferentes condições morfológicas, e que permitissem ser identificadas pelo método de microcultivo, e posterior visualização por microscópio.

Na Tabela 10 pode-se visualizar exemplos de diferentes gêneros de bolores encontrados na superfície em cada uma das amostras analisadas, sendo que nelas se mostram as imagens macroscópicas (anverso e reverso) e microscópicas de cada bolor.

Tabela 10. Imagens macroscópicas e microscópicas dos fungos encontrados na superfície de diferentes amostras de queijo Minas Padrão contaminados.

Amostra de queijo contaminado	Gênero	Identificação de bolores por amostra		
		MACROSCÓPICA		MICROSCÓPICA
		Anverso	Reverso	
1	<i>Cladosporium</i> sp.
4	<i>Alternaria</i> sp.
4	<i>Cladosporium</i> sp.
5	<i>Cladosporium</i> sp.
6	<i>Penicillium</i> sp.
8	<i>Penicillium</i> sp.

8	<i>Scopulariopsis</i> sp.
8	<i>Cladosporium</i> sp.
10	<i>Penicillium</i> sp.
10	<i>Cladosporium</i> sp.

Por sua vez, a Tabela 11 mostra as imagens de alguns exemplos de bolores encontrados no interior das amostras de queijo padrão analisadas:

Tabela 11. Imagens macroscópicas e microscópicas dos fungos encontrados no interior das amostras de queijo Minas Padrão contaminados.

Identificação de bolores por amostra				
Amostra de queijo contaminado	Gênero	MACROSCÓPICA		MICROSCÓPICA
		Anverso	Reverso	
2	<i>Cladosporium</i> sp.

3	<i>Cladosporium</i> sp.
4	<i>Fusarium</i> sp.
5	<i>Cladosporium</i> sp.
6	<i>Penicillium</i> sp.
7	<i>Penicillium</i> sp.
7	<i>Cladosporium</i> sp.
8	<i>Scopulariopsis</i> sp.

Segundo Filtenborg et. al., (2000), os fungos são os mais importantes deteriorantes dos queijos duros e semiduros, pois tais alimentos são submetidos a longos períodos de maturação, o que permite que fiquem mais expostos ao ataque destes microrganismos (SCHOLTE et. al., 2000).

Kure e Skaal (2000) e Kure et. al., (2001) isolaram de queijos noruegueses semiduros 13 espécies de *Penicillium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicocum*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Phoma*, *Trichoderma* e *Ulocladium*. Da mesma forma, De Moraes (2005) isolou os gêneros *Penicillium*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus*, *Aspergillus ochraceus* e *Mucor* de queijo manteiga.

Por outro lado, o tipo de leite, o tipo de queijo, a salmoura, as superfícies, a composição da atmosfera de armazenamento e maturação, o tipo de embalagem, a temperatura de armazenamento, localização das instalações, entre outros, são fatores que influenciam no potencial de desenvolvimento de fungos deteriorantes nos queijos (FILTENBORG et. al., 1996; KURE; SKAAR, 2000; KURE et. al., 2001; KURE et. al., 2004; STETZENBACH, 1998; TANIWAKI et. al., 2001). Segundo Larone (1996), dentre os gêneros de fungos considerados como contaminantes ambientais se encontram *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

De acordo com os resultados obtidos da identificação dos fungos que cresceram nas amostras, se determinou que o crescimento fúngico se deu em maior parte na superfície do produto com uma porcentagem de 56%, resultado esperado devido a que o queijo Minas Padrão fica exposto no ambiente quando é submetido ao processo de maturação, enquanto ao interior a porcentagem de crescimento foi de 43%. Os gêneros de fungos que apresentaram maior ocorrência na superfície foram o *Penicillium* sp. seguido por *Cladosporium* sp. e *Scopulariopsis* sp., com porcentagens de 67, 18 e 5 %, respectivamente. No entanto, no interior o crescimento ocorreu em maior porcentagem para o *Cladosporium* sp. com 33%, seguido por *Fusarium* sp. e *Scopulariopsis* sp. ambos com 14% e por último por *Penicillium* sp. com 12%. A Figura 11 sintetiza tais informações.

Figura 11. Porcentagem de crescimento dos diferentes tipos de fungos encontrados na superfície e no interior das amostras de queijo Minas Padrão analisadas.

Portanto, levando-se em consideração os dados mostrados na Figura 11, os fungos escolhidos para a continuação deste trabalho de Mestrado, com os ensaios de atividade antifúngica *in vitro*, foram os bolores dos gêneros *Cladosporium sp.*, *Fusarium sp.*, e *Penicillium sp.*, ilustrados na Tabela 12.

Tabela 12. Exemplos de placas ilustrando os gêneros escolhidos para serem utilizados nos ensaios de atividade antifúngica do óleo de orégano nanoemulsionado *in vitro*.

Fungos escolhidos para ensaios de atividade antifúngica <i>in vitro</i>			
Gênero	MACROSCÓPICA		MICROSCÓPICA
	Anverso	Reverso	
<i>Cladosporium</i> sp.
<i>Fusarium</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.

5.2. ENSAIOS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DAS NANOEMULSÕES

A ação antifúngica do óleo de orégano nanoemulsionado foi avaliada pelo crescimento fúngico durante 7 dias de incubação dos bolores, permitindo evidenciar o efeito das diferentes concentrações tanto do óleo essencial de orégano quanto das duas formulações de nanoemulsão contendo óleo de orégano encapsulado. A concentração inibitória mínima foi determinada para o óleo de orégano puro e para as duas formulações de nanoemulsão, separadamente.

Determinaram-se as concentrações inibitórias mínimas de óleo de orégano para *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. as quais foram, 0,2 µg/ml e 0,3 µg/ml respectivamente. As Figuras 12 e 13 mostram tais informações.

Figura 12. Visualização da concentração mínima inibitória do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) puro para *Fusarium* sp.

Figura 13. Visualização da concentração mínima inibitória do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) em sua forma livre para *Penicillium* sp.

As concentrações de óleo essencial puro (0,05 – 0,3 $\mu\text{g/ml}$) utilizadas para determinar a atividade antifúngica sobre *Cladosporium* sp. não permitiram o crescimento do fungo durante o tempo de incubação do mesmo, não permitindo a determinação da concentração mínima inibitória para *Cladosporium* sp. Isto pode indicar que este gênero de fungo foi muito susceptível ao efeito inibitório do óleo de orégano em sua forma livre quando comparado com o efeito inibitório do óleo essencial de orégano sobre *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. O anteriormente dito pode ser confirmado por Zabta et al. (2014) que obtiveram CMI de 0,062 $\mu\text{g/ml}$ para *Cladosporium cladosporoides* quando foi aplicado de óleo essencial de orégano.

Por sua vez, as Figuras 14, 15 e 16 mostram a CMI da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para os fungos *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. respectivamente. As concentrações obtidas estão dadas em função da concentração de óleo de orégano as quais foram 0,26 $\mu\text{g/ml}$ para *Cladosporium* sp., 0,113 $\mu\text{g/ml}$ para *Fusarium* sp. e 1,62 $\mu\text{g/ml}$ para *Penicillium* sp.

Figura 14. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Cladosporium* sp.

Figura 15. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Fusarium* sp.

Figura 16. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Penicillium* sp.

A concentração mínima onde houve inibição no crescimento do *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. para a formulação B da nanoemulsão encapsulando óleo de orégano se mostra nas Figuras 17, 18 e 19. As CMI's para *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. foram 0,32 µg/ml, 0,1 µg/ml e 0,8 µg/ml respectivamente, concentrações igualmente dadas em função do óleo de orégano contido nas nanoemulsões.

Figura 17. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Cladosporium* sp.

Figura 18. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Fusarium* sp.

Figura 19. Visualização da concentração mínima inibitória da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano nanoencapsulado para *Penicillium* sp.

A Tabela 13 sintetiza os resultados obtidos para as CMI's para o óleo essencial de orégano puro e nanoemulsionado sobre os três gêneros de fungos avaliados.

Tabela 13. Valores de concentração mínima inibitória para os fungos testados, para o óleo de orégano puro e nanoemulsionado.

Gênero de Fungo	Concentração mínima inibitória (µg óleo essencial/ml)		
	Óleo de orégano puro	Óleo de orégano nanoemulsionado (formulação A)	Óleo de orégano nanoemulsionado (formulação B)
<i>Cladosporium</i> sp.	--	0,26	0,32
<i>Fusarium</i> sp.	0,20	0,11	0,10
<i>Penicillium</i> sp.	0,30	1,62	0,80

Os resultados obtidos mostram que as CMI's encontradas para a formulação A da nanoemulsão foram maiores do que as CMI's para a formulação B sobre os três fungos avaliados (*Cladosporium* sp. *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.), o que muito provavelmente se deve ao conteúdo maior de óleo de orégano na formulação B (5%) comparado com a formulação A (3,25%). No entanto, as concentrações para ambas formulações (A e B), foram maiores do que as CMI's encontradas para o óleo essencial de orégano puro. Tal fato pode indicar que os componentes das formulações das nanoemulsões interferem na atividade antifúngica do óleo essencial de orégano, provavelmente pela aplicação da nanoencapsulação, ou pela temperatura ao momento de produzir as nanoemulsões ou a agitação aplicada.

Entretanto, os valores de CMI *in vitro* obtidos tanto para o óleo essencial livre quanto as duas formulações de nanoemulsão foram menores que os valores obtidos por Daferera et al. (2000), que encontraram valores de inibição de 250 µg/ml de óleo de orégano sobre o *Penicillium digitatum*. Daferera et al. (2003) encontraram valores de inibição de 150 µg/ml de óleo de orégano no gênero *Fusarium* sp. Stević et al., (2014), por sua vez, encontraram concentrações mínimas de óleo de orégano para 8 espécies diferentes de *Fusarium* que variaram entre 70 e 1160 µg/ml, e para *Penicillium* sp., que foi de 280 µg/ml.

Ao contrário dos autores anteriores, Mitchell et al. (2010) encontraram valores de CMI de 0,564 µg/ml de óleo de orégano em diferentes espécies de *Aspergillus*, no entanto, continuam sendo concentrações maiores do que as obtidas no presente trabalho de Mestrado. Isto pode indicar que os gêneros avaliados neste trabalho foram mais susceptíveis ao efeito do óleo de orégano encapsulado na nanoemulsão.

Entretanto, as concentrações mínimas inibitórias de óleo essencial de orégano obtidas por Stupar et al. (2014), as quais foram 0,18 µg/ml para as espécies de *Aspergillus ochraceus* e *Bipolaris spicifera* e para o gênero *Penicillium* sp.; 0,23 µg/ml para *Aspergillus niger* e 0,47 µg/ml para *Trichoderma viride*; foram relativamente menores quando comparados com os dados obtidos para as duas formulações de nanoemulsões contendo óleo de orégano. No entanto, foram maiores quando comparadas com as concentrações obtidas neste trabalho pelo óleo essencial em forma livre.

Zabta et al. (2014) obtiveram concentrações mínimas de óleo essencial de orégano muito menores quando comparadas com as concentrações mínimas obtidas neste trabalho; as quais foram

0,0103, 0,062, 0,067 e 0,086 µg/ml para *Stochybotrys chartarum*, *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus niger* e *Alternaria alternata*, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível constatar que o óleo de orégano nanoemulsionado, obtido pelo método PIT, mostrou atividade antifúngica considerável, o que permitiu o prosseguimento dos estudos para verificação da atividade antifúngica em queijo Minas Padrão.

5.3. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DAS NANOEMULSÕES EM QUEIJOS MINAS PADRÃO

Para levar a cabo os ensaios de atividade antifúngica em queijos, foi necessário estabelecer primeiramente dois parâmetros importantes para os testes. O primeiro deles foi o volume de nanoemulsão a ser utilizado, que foi estabelecido como o volume suficiente para se proceder à imersão da fatia do queijo no líquido, em uma placa de Petri de 8 cm de diâmetro (9 ml). O segundo parâmetro foi o tempo de contato das fatias de queijo com as nanoemulsões (denominado neste trabalho de *tempo de imersão*). Foram testados os tempos de imersão de 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Os resultados obtidos nos testes de tempo de imersão estão mostrados nas Figuras 20 a 23:

Figura 20. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação A da nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano (fungo testado: *Fusarium* sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).

Figura 21. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação A da nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano em concentração de $11,7 \mu\text{g/ml}$ de óleo essencial (fungo testado: *Fusarium* sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).

Figura 22. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação B da nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano (fungo testado: *Fusarium* sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado)

Figura 23. Efeito do tempo de imersão no crescimento fúngico em fatias de queijo Minas Padrão, utilizando-se formulação B da nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano em concentração de 18 $\mu\text{g/ml}$ de óleo essencial (fungo testado: *Fusarium* sp.; Controle: sem óleo de orégano nanoemulsionado).

Os resultados obtidos evidenciaram que à medida em que se aumentou o tempo de imersão das fatias de queijo nas nanoemulsões, em concentração de 11,7 e 18 $\mu\text{g/ml}$ (em função de óleo essencial de orégano), o crescimento fúngico também aumentou, durante os sete dias de incubação.

Nas fatias imersas nas nanoemulsões puras (sem diluição) ocorreu o mesmo efeito, no entanto, o crescimento fúngico se deu em tempos maiores de incubação (15 dias). Tal fato provavelmente ocorreu porque quando se aumentou o tempo de imersão das fatias também se aumentou a atividade de água das mesmas, ao final do tempo de imersão, originando um ambiente ideal para o crescimento destes tipos de microrganismos.

Na matriz dos alimentos, os fungos podem se desenvolver em pHs menores que 2 e maiores que 9, sendo que a maioria dos bolores cresce em temperaturas entre 5 e 35° C, e em atividade de água de 0,85 ou menor (MISLIVEC et al., 1992). Esta última variável é que determina se haverá crescimento fúngico, já que indica quanta água disponível tem o alimento. Jay (1973) destaca que outros parâmetros que influenciam no crescimento dos fungos são a variação da temperatura ou a quantidade de elementos nutritivos da matriz alimentícia.

Devido aos resultados obtidos no teste anterior, foram aplicados tempos de imersão de 0 (zero, representando a retirada imediata das fatias após a imersão) e 30 minutos para avaliar a atividade antifúngica do óleo de orégano nanoemulsionado nos diferentes tratamentos nos ensaios subsequentes.

A Figura 24 mostra a ação antifúngica da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Cladosporium* sp. para o dia trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 24. Ação antifúngica sobre *Cladosporium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Os resultados obtidos não permitiram determinar diferença no crescimento de *Cladosporium* sp. nas fatias de queijo quando foram imersas por 30 minutos nas diferentes concentrações de nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano, evidenciando-se igual crescimento ao longo do armazenamento. Quando comparadas as fatias imersas por trinta minutos em nanoemulsão diluída (diferentes concentrações) com as fatias imersas no mesmo tempo em nanoemulsão pura, verificou-se que não houve crescimento do fungo avaliado nas fatias com nanoemulsão pura durante os 30 dias de armazenamento, o que permite evidenciar o efeito antifúngico do óleo essencial de orégano nanoemulsionado para o referido fungo.

Por sua vez, a Figura 25 mostra a ação antifúngica da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Cladosporium* sp. para o e trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 25. Ação antifúngica sobre *Cladosporium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Ao contrário das fatias de queijo imersas por 30 minutos na formulação A de nanoemulsão, as fatias de queijo imersas no mesmo tempo na formulação B, apresentaram diferença no crescimento de *Cladosporium* sp. nas diferentes concentrações de nanoemulsão avaliadas, evidenciando um menor crescimento do fungo na medida em que aumentava a concentração de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano. Tal diferença entre as duas formulações (A e B) pode dever-se a que a formulação B tem maior quantidade de óleo essencial de orégano (5%) que a formulação A (3,25%). Para as fatias imersas por 30 minutos, tanto na formulação A de nanoemulsão quanto na formulação B, não houve crescimento do fungo avaliado ao longo do armazenamento quando estas foram imersas na nanoemulsão pura.

A Figura 26 mostra a ação antifúngica da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Fusarium* sp. para o dia trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 26. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

A Figura 27 mostra a ação antifúngica da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Fusarium* sp. para o dia trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 27. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Da mesma forma que para as fatias imersas por 30 minutos em formulação A de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano e inoculadas com *Cladosporium* sp., para as fatias de queijo imersas no mesmo tempo em formulação A e B de nanoemulsão contendo óleo de orégano e inoculadas com *Fusarium* sp., não houve diferença no crescimento do fungo quando comparadas as diferentes concentrações de nanoemulsão, devido a que se apresentou crescimento do fungo nas quatro concentrações durante o tempo de armazenamento. Nas fatias imersas na nanoemulsão pura, em ambas as formulações, não houve crescimento do *Fusarium* sp. ao longo do armazenamento, permitindo determinar o efeito positivo do óleo essencial de orégano nanoemulsionado na inibição do crescimento do fungo avaliado.

A Figura 28 mostra a ação antifúngica da formulação A de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Penicillium* sp. para o dia trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 28. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação A de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

A Figura 29 mostra a ação antifúngica da formulação B de nanoemulsão contendo óleo de orégano para o gênero *Penicillium* sp. para o dia trinta (30) nos diferentes tratamentos usados incluindo o tratamento controle (sem imersão em nanoemulsão) e nos diferentes tempos de imersão (retirada imediata e 30 minutos) das fatias de queijo.

Figura 29. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as diferentes concentrações da formulação B de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Nas fatias de queijo imersas por 30 minutos nas formulações A e B de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano e inoculadas com *Penicillium* sp., encontrou-se que para todas as concentrações de nanoemulsão avaliadas - incluindo a nanoemulsão pura - houve crescimento do fungo ao longo do tempo de armazenamento, no entanto, pode-se evidenciar que houve diferença entre as fatias de queijo imersas em nanoemulsão nas concentrações de 11,7 e 18 $\mu\text{g/ml}$ e as fatias imersas em nanoemulsão pura para ambas formulações, devido à diminuição aparente no crescimento do fungo na medida em que aumentou a concentração da nanoemulsão. Entretanto, quando comparadas as fatias imersas por trinta minutos, em formulação A com formulação B de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano, determinou-se que a formulação B de nanoemulsão apresentou maior atividade antifúngica sobre o *Penicillium* sp. que a formulação A, provavelmente devido a que em sua concentração a formulação B tem maior porcentagem de óleo essencial de orégano.

Por outro lado, quando comparando o comportamento geral de ambas formulações de nanoemulsão (A e B) sobre o crescimento dos três gêneros de fungos avaliados pode-se dizer que estas apresentaram efeito positivo na inibição do crescimento dos fungos avaliados, no entanto, o

Penicillium sp. foi o gênero que teve menor susceptibilidade ao efeito antifúngico do óleo essencial de orégano nanoemulsionado, que os gêneros *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp., devido a que ao final do armazenamento se apresentou início do crescimento de *Penicillium* sp. o que pode indicar que este gênero de fungo tem alta capacidade de acoplamento a ambientes extremos, contrário ao *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. que não apresentaram crescimento algum durante o tempo de armazenamento para ambos tempo de imersão.

Os resultados obtidos nestes testes confirmaram que o tempo de imersão das fatias de queijo nas nanoemulsões afetou consideravelmente o crescimento dos gêneros de fungos avaliados, permitindo observar que nas fatias que foram retiradas imediatamente (tempo de imersão zero) e depois inoculadas dos fungos, não se apresentou crescimento dos mesmos durante os 30 dias de armazenamento, destacando com isso a importância da atividade de água para o crescimento deste tipo de microrganismos.

Ao respeito da atividade antifúngica das duas formulações de nanoemulsão contendo óleo essencial de orégano na concentração inibitória mínima, não se apresentou o mesmo efeito quando estas foram aplicadas nas fatias de queijo (tempo de imersão 30 minutos), porque permitiram o desenvolvimento dos gêneros de fungos avaliados em sete dias de incubação, tempo em que normalmente demoram em crescer e esporular os gêneros avaliados neste trabalho.

Por outro lado, as fatias que foram armazenadas sob refrigeração não apresentaram crescimento fúngico (*Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp.) para as diferentes concentrações de óleo essencial de orégano nanoemulsionado e para os dois tempos de imersão avaliados, tais informações se mostram nas Figuras 30, 31 e 32.

Figura 30. Ação antifúngica sobre *Cladosporium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Figura 31. Ação antifúngica sobre *Fusarium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Figura 32. Ação antifúngica sobre *Penicillium* sp. para o dia trinta de incubação sob refrigeração, para os diferentes tratamentos, em fatias de queijo Minas Padrão com as formulações A e B de nanoemulsão pura encapsulando óleo essencial de orégano. Tratamentos: (T₀) retirada imediata após imersão na nanoemulsão; (T₃₀) imersão por 30 minutos na nanoemulsão.

Os resultados obtidos não permitiram determinar o efeito inibitório real das nanoemulsões sobre os gêneros de fungos estudados, devido à forte influência que teve a temperatura de armazenamento no crescimento fúngico. No entanto, segundo Mislivec et al., (1992), numa matriz alimentícia, os fungos se podem desenvolver em pH muito ácido ou muito básico, em temperaturas entre 5 e 35° C, e em atividade de água de 0,85 ou menor, o que pode indicar que o óleo essencial de orégano nanoemulsionado teve melhor atividade antifúngica quando combinado com temperaturas de refrigeração, o que faz que a atividade de água tenha menor importância neste caso quando comparado com o armazenamento a temperatura ambiente.

5.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO NANOEMULSIONADO EM QUEIJOS MINAS PADRÃO NO AMBIENTE DE MATURAÇÃO

Os queijos testados foram imersos nas duas formulações (A e B) de nanoemulsões encapsulando óleo essencial de orégano e retirados imediatamente, de acordo com os ensaios

realizados previamente nas fatias de queijo. A Figura 33 mostram este processo realizado dentro instalações do Laticínio Imperial Jureia:

Figura 33. Forma de imersão dos queijos Minas Padrão em nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano.

Para avaliação da atividade antifúngica das duas formulações de nanoemulsão encapsulando óleo essencial de orégano sobre os queijos Minas Padrão, estes foram armazenados durante 30 dias, tempo no qual ocorre o processo de maturação, em uma câmara de refrigeração a 10° C, aproximadamente. As Figuras 34 e 35 mostram a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano nanoemulsionado em queijos Minas Padrão.

Figura 34. Aparência dos queijos tipo Minas Padrão imediatamente após a imersão nas formulações A e B de óleo de orégano nanoemulsionado, na câmara de maturação.

Figura 35. Aparência dos queijos tipo Minas Padrão imersos nas formulações A e B de óleo de orégano nanoemulsionado, na câmara de maturação, após 30 dias.

Os resultados obtidos mostram que o óleo de orégano nanoemulsionado não teve efeito inibitório quando comparado com os resultados obtidos nas fatias de queijo no mesmo período de armazenamento, permitindo o crescimento de fungos na superfície dos queijos. Este efeito provavelmente se deve ao fato que as fatias de queijo no ensaio em laboratório permaneceram em ambiente controlado (dentro das placas de Petri), livres de qualquer contaminação externa (foram inoculadas apenas uma vez), enquanto os queijos Minas Padrão na câmara de maturação estavam expostos a uma grande quantidade de microrganismos continuamente. Tal problemática poderia ser diminuída ou eliminada caso houvesse a possibilidade de reaplicação das nanoemulsões periodicamente na superfície dos queijos.

Por último, foi realizada a identificação dos bolores que cresceram na superfície dos queijos Minas Padrão aplicados com as nanoemulsões (formulações A e B), encontrando maior crescimento de *Cladosporium* sp., isto pode indicar que o ambiente onde foram dispostos os queijos para seu processo de maturação é propício para o desenvolvimento deste tipo de fungo. Para este caso, são necessárias estratégias de controle na área de maturação para garantir um adequado processo dos queijos e evitar perdas do produto.

6. CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados obtidos neste trabalho de Mestrado, pode-se concluir que:

- Foi possível identificar os gêneros de fungos mais comumente encontrados em queijos tipo Minas Padrão deteriorados, e foram eles *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp., nas amostras analisadas;

- O óleo essencial de orégano nanoemulsionado pelo método da temperatura de inversão de fases produzido possui ação antifúngica, em ambas as formulações utilizadas, em concentrações dentro de intervalos de concentração de óleo essencial compatíveis com a literatura;

- As nanoemulsões de óleo essencial de orégano foram efetivas contra o crescimento fúngico de *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp em fatias de queijo Minas Padrão. Tal efetividade foi dependente do tempo de imersão das fatias na nanoemulsão e também da temperatura na qual o queijo foi armazenado. Em condições de temperatura ambiente, somente as fatias imersas e imediatamente retiradas foram protegidas contra o crescimento fúngico; já no caso das fatias armazenadas sob refrigeração, o tempo de imersão não foi fator determinante, mas sim a temperatura.

- No ambiente de laticínio (câmara de maturação), as nanoemulsões não foram efetivas para evitar o crescimento fúngico, provavelmente devido ao contato contínuo do ambiente contaminado com a superfície dos queijos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

De acordo com os dados obtidos neste trabalho de Mestrado, as seguintes sugestões são feitas para trabalhos futuros no mesmo tema:

- Avaliação de outras formulações de nanoemulsões contendo óleo de orégano;
- Determinação da influência das formulações de nanoemulsões no crescimento *in vitro* dos fungos, em termos quantitativos;
- Determinação da influência das nanoemulsões na produção de toxinas fúngicas;
- Reaplicação periódica das nanoemulsões na superfície dos queijos no ambiente de maturação, com acompanhamento periódico da presença de fungos na superfície, bem como do seu crescimento.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. MG estima crescimento de 3% na produção de laticínios em 2012. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=1286&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: Julho/2014.

ADIGUZEL, A; OZER, M; SOKMEN, M; GULLUCE, M; SOKMEN, A; KILIC, H; SAHIN, F; BARIS, O. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extract of *Nepeta cataria*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 58, p. 69 – 76, 2009.

ALMEIDA, N.; SOUZA, B.; LIMA, E.; NUNES GUEDES, D.; PEREIRA, F.; LEITE DE SOUZA, E.; BARBOSA DE SOUSA, F. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, p. 499 – 508, 2010.

ALMEIDA, A.P., RODRÍGUEZ-ROJO, S., SERRA, A.T., VILA-REAL, H., SIMPLICIO, A.L., DELGADILHO, I., BEIRÃO-DA-COSTA, S., BEIRÃO-DA-COSTA, L., NOGUEIRA, I.D., DUARTE, C.M.M. Microencapsulation of oregano essential oil starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 140 – 145, 2013.

AMIOT, J. Ciencia y tecnología de la leche: Principios y aplicaciones. **Ed. Acribia**, Zaragoza - España, 1991.

ANTON, N., AND T.F. VANDAMME. The universality of low-energy nanoemulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1–2, p. 142 – 147, 2009.

ANTON, N., BENOIT, J.P., SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. **Journal Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185 – 199, 2008.

ANTON, N., GAYET, P., BENOIT, J.P., SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, n. 1 – 2, p. 44 – 52, 2007.

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

ARTEAU M, LABRIE S. Terminal-restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis profiling of fungal communities in Camembert cheese. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 545 – 54, 2010.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., WAOMAR, M. Biological effects of essential oil – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446 – 475. 2008.

BARRIOS M, MEDINA L, LOPEZ M. Fungal biota isolated from Spanish cheeses. **Journal Food Safety**, v. 18, p. 151 – 157, 1998.

BÅTH K., PERSSON K.N., SCHNÖURER, J., LEONG, S.I.L. Microbiota of an unpasteurized cellar-stored goat cheese from northern Sweden. **Agriculture Food Science**, v. 21, p. 197 – 203, 2012.

BEIRÃO-DA-COSTA, S., DARTE, C., BOURBON, A.I., PINHEIRO, A.C., JANUÁRIO, M.I.N, VICENTE, A.A., BEIRÃO-DA-COSTA, M.L., DELGADILLO, I. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of *Oregano* essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 33, p. 199 – 206, 2013.

BHARGAVA, K., CONTI, D.S., DA ROCHA, S.R.P, ZHANG, Y. Application of na oregano oil nanoemulsion to the control foodborne bactéria on fresh lettuce. **Food Microbiology**, v. 47, p. 69 – 73, 2015.

BONASSI, I.A. Liberação de ácidos graxos livres voláteis em queijo minas padronizado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG. v. 40, n. 240, p. 37 – 48. 1985.

BORGES DO CARMO, A.A.L. Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo Minas Padrão de fabricação industrial, artesanal e informal. (TCC), **Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília**, 2013.

BOURGEOIS, C.M., LARPENT, J.P. Microbiología Alimentária – Fermentaciones Alimentárias. **Ed. Acribia**, Zaragoza – España, 1995.

BRASIL. Decreto 30691 de 29/03/1952. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Ministério da Aricultura, do Abastecimento Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA Divisão de Normas Técnicas.

BRASIL. Portaria no. 146, de 7 de março de 1996. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária - Gabinete Do Ministro.

BRASIL. Portaria SVS/MS no 326, de 30/07/1997. Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 01 de agosto de 1997.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 10 de janeiro de 2001.

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

CARMO, E.S., LIMA, E.D., SOUZA, E.L. The potential of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil in inhibiting the growth of some food-related *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 362 – 367, 2008.

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**, v. 46, n. 6, p. 1914 – 1920. 2002.

CARSON, C.F.; HAMMER, K.A. (2011). Chemistry and bioactivity of essential oils. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**. Ed. Thormar, H, p. 203 – 237, 2011.

CASTRO, L.O., RAMOS, R.L.D. Descroção botânica, cultivo e uso de *Origanum majorana* L., manjerona e de *Origanum vulgare* L., oregano (LAMIACEAE). **FEPAGRO, Circular Técnica**, v. 22, p. 15, 2003.

CHALITA, M.A.N., PITHAN-SILVA, R.O., PETTI, R.H.V., LEITE DA SILVA, C.R. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**, v. 39, n. 6, 2009.

CHARCUTARIA.ORG. Queijo Minas Frescal. Disponível em: <<http://charcutaria.org/diversos/queijo-minas-frescal/>>. Ingresso em: Março/2015.

CHEN, H., ZHONG, Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 593 – 602, 2015.

COSENTINO, S., BARRA, A. PISANO, B., CABIZZA, M. PIRISI, F., PALMAS, F. Composition and antimicrobial properties of *Sardinian juniperus* essential oils against foodborne pathogens and spoilage microorganisms. **Journal Food Protection**, v. 66, p. 1288 – 1291, 2003.

CUETO-WONG, M. C.; RIVAS-MORALES, C.; ALANÍS-GUZMÁN, M. G.; ORANDAY-CÁRDENAS, A.; AMAYA-GUERRA, C. A.; NÚÑEZ-GONZÁLEZ, A. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Revista Mexicana de Micología**, v. 31, p. 29 – 25, 2010.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. GC-MS Analysis of essential oils from some greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2576 – 2581, 2000.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N., POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39 – 44, 2003.

DE ALMEIDA, K.M., DA PAIXÃO, R.F., DE OLIVEIRA, A.D.M., GAUDERETO, B.S., LOPES, M.M., MARTINS, J.M. Características físico-químicas e sensoriais de queijo minas padrão probiótico **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 378, n. 66, p. 17 – 25, 2011.

DE MORAIS, V.M.F. Identificação de fungos leveduriformes e filamentosos em queijos de manteiga. Dissertação-Mestrado. **Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Universidade Federal Da Paraíba**, 2005.

DE SANTI M, SISTI M, BARBIERI E, PICCOLI G, BRANDI G, STOCCHI V. A combined morphologic and molecular approach for characterizing fungal microflora from a traditional Italian cheese (Fossa cheese). **International Dairy Journal**, v. 20, p. 465 – 71, 2010.

EL-FADALY, H.M., EL-KADI, S.M., HAMAD, M.N., HABIB, A.A. Isolation and identification of egyptian ras cheese (Romy) contaminating fungi durng ripening period. **Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 1, p. 1 – 10, 2015.

EMBRAPA. Principais países produtores de leite no mundo – 2010. **Embrapa Gado de Leite**. Disponível em:

<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0212.php>.

Ingresso em: fevereiro/2012.

FAKHREDDIN-HOSSEINI, S., ZANDI, M., REZAEI, M., FARAHMANDGHAHI, F. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 50 – 56, 2013.

FERNANDEZ, P., ANDRE, V., RIEGER, J., AND KUHNLE, A. Nanoemulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53 – 58, 2004.

FETAEMG. Queijo minas artesanal já pode ser comercializado em outros estados e for a do país. Notícias – Federação dos Trabalhadores na Agricultura do Estado de Minas Gerais. Disponível em: <<http://www.fetaemg.org.br/noticias/queijo-minas-artesanal-ja-pode-ser-comercializado-em-outros-estados-e-fora-do-pais/>>. Ingresso em: Março/2015.

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

FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C., SAMSON, R.A. Specific association of fungi to foods and influence of physical environmental factors. In: SAMSON, R.A., HOEKSTRA, E.S., FRISVAD, J.C., FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi. 6th.ed.** Utrecht: Centraal Bureau Voor Schimmelcultures, p. 321 – 330, 2000.

FLÓREZ, A.B., ÁLVAREZ-MARTÍN, P., LÓPEZ-DÍAZ, T., MAYO, B. Morphotypic and molecular identification of filamentous fungi from spanish blue-veined cabrales cheese, and typing of *Penicillium roqueforti* and *Geotrichum candidum* isolates. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 350 – 357, 2007.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos. **São Paulo: Dipemar**, p. 118, 1994.

GARCIA, D., GARCIA-CELA, E., RAMOS, A.J., SANCHIS, V., MARÍN, S. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts **Food Control**, v. 22, p. 1378 – 1384, 2011.

GAYSINSKY, S. Emulsions and microemulsions as antimicrobial delivery systems. Tese (Doutorado) – **Department of Food Science, University of Massachusetts at Amherst**, 2007.

GUMUS, T.; SUKRU-DEMIRCI, A.; SAGDIC, O.; ARICI, M. Inhibition of heat resistant molds: *Aspergillus fumigatus* and *Paecilomyces variotti* by some plant essential oils. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 5, p. 1241 – 1244, 2010.

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, R. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91 – 97, 2008.

HERCULANO, E.D., DE PAULA, H.C.B., DE FIGUEIREDO, E.A.T., DIAS, F.G.B., PEREIRA, V.A. Physicochemical and antimicrobial properties of nanoencapsulated *Eucalyptus staigeriana* essential oil. **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, p. 484 – 491, 2015.

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

HOOFT, C., DIETRICH, J. A revolução do Pack-Age®. **Revista Leite e Derivados**, v. 151, p. 19 – 20, 2014.

IBGE. Estatística da produção pecuária. Indicadores IBGE, **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, Março 2015.

IDÊNIO-SCHMITT, C., DEBONI-CERESER, N., SILVA-BOHRZ, D.A., NOSKOSKI, L. Contaminação do queijo colonial de produção artesanal comercializado em mercados varejistas do rio grande do sul. **Veterinária Notícias**, v. 17, n. 2, p. 111 - 116, 2011.

IZQUIERDO, P., ESQUENA, J., TADROS, T.F., DEDEREN, J.C., FENG, J., GARCIA-CELMA, M.J., AZEMAR, N., SOLANS, C. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 20, p. 6594 – 6598, 2004

JAY, J.M. Microbiología moderna de los alimentos. **Ed. Acribia**, Zaragoza – España, 1973.

KOCIĆ-TANACKOV, S., DIMIĆ, G., TANACKOV, I., PEJIN, D., MOJOVIĆ, L., PEJIN, J. The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspegillus* spp. and on sterigmatocystin biosynthesis. **LWT – Food Science and Technology**, v. 49, p. 14 – 20, 2012.

KURE, C.F., SKAAR, I. Moulds growth on the Norwegian semi-hard cheese Norvegia and Jarlsber. **International Journal Food Microbiology**, v. 62, p. 133 – 137, 2000.

KURE, C.F., WASTESON, Y., BRENDHAUG, J., SKAAR, I. Moulds contaminants on Jarlsber and Norvegia cheese blocks from four factories. **International Journal Food Microbiology**, v. 70, p. 21 – 27, 2001.

KURE, C.F., SKAAR, I., BRENDHAUG, J. Mould contamination in production of semi-hard cheese. **International Journal Food Microbiology**, v. 93, p. 41 – 49, 2004.

MARTÍN-SÁNCHEZ, A.M., CHAVEZ-LÓPEZ, C., SENDRA, E., SAYAS, E., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J., PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Lipolysis, proteolysis and sensory characteristics of a Spanish fermented dry-cured meat product (salchichón) with oregano essential oil used as surfasse mold inhibitor. **Meat Science**, v. 89, p. 35 – 44, 2011.

MASON, T.G.; WILKING, J.N.; MELESON, K.; CHANG, C.B.; GRAVES, S.M. **Journal Physics Condensed Matter**, v. 18, p. 635 – 666, 2006.

MCCLEMENTS, D.J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285 – 330, 2011.

MITCHELL, T. C.; MONTENEGRO, T. L.; LEITE DE SOUZA, E.; LIMA, E.; CARMO, E. Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic Aspergilli. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 755 – 760, 2010.

MISLIVEC, P.B., BEUCHAT, L.R., CUSIN, M.A. Yeast and molds. In: VANDERZART, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd. ed.** Washington, DC: APHA, p. 239 – 49, 1992.

MOHAMMADI, A., HSHEMI, M., HOSSEINI, S.M. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 28, p. 73 – 80, 2015.

MONTAGNA MT, SANTACROCE MP, SPILOTROS G, NAPOLI C, MINERVINI F, PAPA A, DRAGONI I. Investigation of fungal contamination in sheep and goat cheeses in southern Italy. **Mycopathologia**, v. 158, p. 245 – 9, 2004.

MORALES, D., GUTIERREZ, J.M., GARCIA-CELMA, M.J., SOLANS, C. A study of the relation between bicontinuous microemulsion and oil/water nanoemulsion formation. **Langmuir**, v. 19, p. 7196 – 7200, 2003.

MORARU, C.I.; PANCHAPAKESAN, C.P.; HUANG, Q.; TAKHISTOV, P.; LIU, S.; KOKINI, J.L. Nanotechnology: A new frontier in food science. **Food Technology**, v. 7, n. 12, p. 24 – 29, 2003.

LAMBERT, R.J., SKANDAMIS, P.N., COOTE, P.J., NYCHAS, G.J.E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453 – 462, 2001.

LARONE, D.H. Medically important fungi: A guide to identification. **3rd ed. Washington, DC: ASM Press**, p. 274, 1996.

LIMA DE SOUSA, L., ALBUQUERQUE DE ANDRADE, S.C., ALVES-AGUIAR, A.A.J., VASCONCELOS DE OLIVEIRA, C.E., VERÍSSIMO DE SALES, C., MADRUGA, M.S., LEITE DE SOUZA, E. Efficacy of *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in combination to control postharvest pathogenic Aspergilli and autochthonous mycoflora in *Vitis labrusca* L. (table grapes). **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, p. 312 – 318. 2013.

LODOÑO, M.M.D.; FURTADO, M.M.; ABREU, L.R. Comparação dos processos de fabricação, composição centesimal e sensorial do queijo Minas meia cura com os queijos Minas padrão e prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Toest**, Juiz de Fora, v.54, n.306, p.20-22, jan./fev. 1999.

LUND, F., FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. Associated mycoflora of cheese. **Food Microbiology**, v. 12, p. 173 – 180, 1995.

NAMUR, J.A.D., CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.D., QUINTILIO, W., SANTANA, M.H.A., POLITI, M.J., DE ARAUJO, P.S. LOPES, A.C., DA COSTA, M.H.B. Poly-lactide-co-glycolide microparticle sizes: a rational factorial design and surface response analysis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, n. 8 p. 2403 – 2407, 2006.

NAVEENA, B.M.; MUTHUKUMAR, M.; SEN, A.R.; BABJI, Y.; MURTHY, T.R.K. Improvement of shelf-life of buffalo meat using lactic acid, clove oil and vitamin C during retail display. **Meat Science**, v. 74, n. 2, p. 409 – 415, 2006.

NUNES-FILHO, R. O maravilhoso mundo dos queijos especiais. **Superhiper**. Promoção II, p. 60 – 64, 2012.

OLIVEIRA, J. S. Queijo: Fundamentos Tecnológicos. **2ª ed., Ed. Icone**, Campinas, 1986.

PANELLI S, BUFFONI JN, BONACINA C, FELLIGINI M. Identification of moulds from the taleggio cheese environment by the use of barcodes. **Food Control**, v. 28, p. 285 – 391, 2012.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293 – 300, 2004.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage. **Springer**, **3ª ed.**, 2009.

QUEIJOS DO BRASIL. Receita queijo minas padrão. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/receita-queijo-minas-padrao.html>>. Ingresso em: Março/2015.

RESIKEM S.A. Distribución de productos químicos y materias primas para la industria. Disponível em: <<http://www.resikem.com.ar/>>. Ingresso em: Fevereiro/2015.

RIBEIRO, J.C., RIBEIRO, W.L.C., CAMURCA-VASCONCELOS, A.L.F., MACEDO, I.T.F., SANTOS, J.M.L., PAULA, H.C.B., ARAÚJO FILHO, J.V., MAGALHÃES, R.D., BEVILAQUA, C.M.L. Efficacy of free and nanoencapsulated *Eucalyptus citriodora* essential oils on sheep gastrointestinal nematodes and toxicity for mice. **Veterinary Parasitology**, v. 204, p. 243 – 248, 2014.

RHAYOUR, K., BOUCHIKHI, T., TANTAOUI-ELARAKI, A., SENDIDE, K., REMMAL, A. The mechanism of bactericidal action of Oregano and clove essential oils and their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, p. 286 – 292, 2003.

ROBINSON, R.K. Microbiología lactológica – microbiología de los productos lácteos. **Ed. Acrobia**, Zaragoza - España, 1987.

ROCHA, A. M. P. Controle de Fungos Durante a Maturação do Queijo Minas Padrão. Dissertação de Mestrado – **Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria**, 2004

RODEA-GONZÁLEZ, D.A., CRUZ-OLIVARES, J., RÓMAN-GUERRERO, A., RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E., VERNON-CARTER, E.J., PÉREZ-ALONSO, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispánica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 102 – 109, 2012.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M., SCAGLIANTI, M., MANFREDINI, S., RADICE, M., BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 4 p. 621 – 632, 2005.

SAGALOWICZ, L., LESER, M.E. Delivery systems for liquid food products. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 15, p. 61 – 72, 2010.

SAJJADI, S., JAHANZAD, F., YIANNESKIS, M., BROOKS, B.W. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance. **Industry and Engineering Chemical Research**, v. 42, p. 3571 – 3577, 2004.

SALAGER, J.L., FORGIARINI, A., MARQUEZ, L., PENA, A., PIZZINO, A., RODRIGUEZ, M.P., RONDO-GONZALEZ, M. Using emulsion inversion in industrial processes. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 259 – 272, 2004.

SALVIA-TRUJILLO, L., ROJAS-GRAÜ, A., SOLIVA-FORTUNY, R., MATÍN-BELLOSO, O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsion and nanoemulsion incorporating essential oils. **Food Hydrocolloids**, v. 47, p. 547 – 556, 2015.

SIGMA-ALDRICH BRASIL. Produces and sells a broad range of biochemicals, organic and inorganic chemicals and related products. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>>. Ingresso em: Fevereiro/2015.

SILVA, J. G. Características físicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra. **Lavras: UFLA**, p. 198, 2007.

SANTIN, R., GIORDANI, C., MADRIS, I.M., MATOS, C.B., FREITAG, R.A., MEIRELES, M.C.A., CLEFF, M.B., MELLO, J.R.B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 367 – 373, 2014.

SANTOS, D.M., GALVÃO, L.C.A., MENEZES, H.C. Tecnologia de queijos. I - Testes de coalhos com queijos prato e minas frescal. **Col. Inst. Tecnol. Alim**, v.8, p.95, 1997.

SCARCELLI, F. A evolução do mercado de queijos em 2014 e suas perspectivas. **Revista Leite e Derivados**, v. 152, p. 21 – 22, 2015.

SCHOLTE, R.P.M., SAMSON, R.A., DIJKSTERHUIS, J. Spoilage fungi in the industrial processing of food. In: SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food and airborne fungi. 6th. ed.** Utrecht: Centraal Bureau Voor Schimmelcultures, p. 339-356, 2000.

SEVERINO, R., DANG-VU, K., DONSI, F., SALMIERI, S., FERRARI, G., LACROIX, M. Antibacterial and physical effects of modified chitosan-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 82 – 88, 2014.

SHINODA, K. Proceedings of the 5th International Congress of Surface Activity, **Barcelona, Spain**, v. 2, p. 275 – 283, 1969.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M.J. Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3 – 4, p. 102 – 110, 2005.

SOUZA, E.L., BARROS, J.C., OLIVEIRA, C.E.V., CONCEIÇÃO, M.L. Influence of *Origanum vulgare* L. essential oil on enterotoxin production, membrane permeability and surface characteristics of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2 – 3, p. 308 – 311, 2009.

SPERNATH, L.; MAGDASSI, S. A new method for preparation of poly-lauryl acrylate nanoparticles from nanoemulsions obtained by the phase inversion temperature process. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 18, n. 9, p. 705 – 711, 2007.

STETZENBACH, L.D. Microorganisms and indoor air quality. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 20, p. 34 – 45, 1998

STEVIĆ, T., BERIĆ, T., SAVIKIN, K., SOKOVIĆ, M., GODEVAC, D., DIMKIĆ, I., STANKOVIĆ, S. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 116 – 122, 2014.

STUPAR, M., GRBIĆ, L.J., DZAMIĆ, A., UNKOVIĆ, N., RISTIĆ, M., JELIKIĆ, A., VUKOJEVIĆ, J. Antifungal activity of selected essential oils and biocide benzalkonium chloride against the fungi isolated from cultural heritage objects. **South African Journal of Botany**, v. 93, p. 118 – 124, 2014.

TAHEREH-KHALILI, S., MOHSENIFAR, A., BEYKI, M., ZHAVEH, S., RAHMANI-CHERATI, T., ABDOLLAHI, A., BAYAT, M., TABATABAEI, M. Encapsulation of Thyme essential oils in chitosan-benzoic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 502 – 508, 2015.

TANIWAKI, M.H.; HOCKING, A.D.; PITT, J.I.; FLEET, G.H. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. **International Journal of Food Microbiology**, 68, p. 125 – 133, 2001.

TIMÓTEO DOS SANTOS, N.S., ALVES-ATHAYDE, A.A.J., VASCONCELOS DE OLIVEIRA, C.E., VERÍSSIMO DE SALES, C., MELO DE SILVA, S., SOUSA DA SILVA, R., MONTENEGRO-STAMFORD, T.C., LEITE DE SOUZA, E. Efficacy of the application of a coating composted of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Microbiology**, v. 32, p. 345 – 353. 2012.

THOMPSON, D. P. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. **Mycologist** v. 81, p. 151-153, 1989.

ZABKA, M., PAVELA, R., PROKINOVA, E. Antifungal activity and chemical composition of twenty essential oils against significant indoor and outdoor toxigenic and aeroallergenic fungi. **Chemosphere**, v. 112, p. 443 – 448, 2014.

ZARBIELLI, M; SANTIN, M; JACQUES, R; STUART, G; VALDUGA, E. Formulação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Minas light enriquecido com fonte de ferro. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 251 – 257, 2004.

ZHAVEH, S., MOHSENI FAR, A., BEIKI, M., TAHEREH-KHALILI, S., ABDOLLAHI, A., RAHMANI-CHERATI, T., TABATABAEI, M. Encapsulation of *Cuminum cyminum* essential oils in chitosan-cafeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 251 – 256, 2015.

ANEXOS

Anexo 1. Especificações técnicas do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*). (Fonte: www.ferquima.com.br)

ESPECIFICAÇÕES TÉCNICAS Óleo Essencial de Orégano (*Origanum vulgare*)

CAS Number: 84012-24-8

	Especificações
Aparência	Líquido Límpido
Cor	Amarelo Esverdeado a Marrom Escuro
Impurezas	Isento
Odor	Característico
Densidade (20°C)	0,940 – 0,960
Índice de Refração (20°C)	1,500 – 1,520
Rotação Ótica	[-2°; +3°]
Principais Componentes (aprox.)	Carvacrol = 70%

ORÉGANO

- **nome do produto:** Óleo Essencial de Orégano
 - **nome INCI:** Origanum Vulgare Leaf Oil
 - **nome científico:** *Origanum Vulgare*
 - **nome em inglês e francês:** origanum / organ
 - **origem:** Moldávia
 - **extração:** destilação a vapor das folhas
 - **principal componente:** carvacrol
 - **descrição:** líquido amarelo esverdeado a marrom, de odor característico.
 - **utilização:** Alivia dores musculares e auxilia na resistência física. Auxilia no tratamento contra celulite. Usado em aromaterapia
- Observação:** Utilize em pequenas quantidades. Poderá causar irritação à pele.