



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE
MESTRADO EM AMBIENTE, TECNOLOGIA E SOCIEDADE

BÁRBARA CAMILA FIRMINO FREIRE

**APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE FÉCULA DE
MANDIOCA, CERA DE ABELHA E EXTRATO DE ROMÃ NA CONSERVAÇÃO DE
QUEIJO TIPO COALHO**

MOSSORÓ

2019

BÁRBARA CAMILA FIRMINO FREIRE

**APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE FÉCULA DE
MANDIOCA, CERA DE ABELHA E EXTRATO DE ROMÃ NA CONSERVAÇÃO DE
QUEIJO TIPO COALHO**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

Orientadora: Profa. Dra. Karoline Mikaelle de Paiva Soares.

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique de Lima Leite.

MOSSORÓ

2019

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei n° 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei n° 9.610/1998. O conteúdo desta obra tornar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

FF862 Freire, Bárbara Camila Firmino.
a APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE
FÉCULA DE MANDIOCA, CERA DE ABELHA E EXTRATO DE
ROMÃ NA CONSERVAÇÃO DE QUEIJO TIPO COALHO /
Bárbara Camila Firmino Freire. - 2019.
82 f. : il.

Orientadora: Karoline Mikaelle de Paiva Soares.
Coorientador: Ricardo Henrique de Lima Leite.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2019.

1. Biopolímeros. 2. Produto lácteo. 3. Análises
de alimentos. 4. Conservação. I. Soares, Karoline
Mikaelle de Paiva, orient. II. Leite, Ricardo
Henrique de Lima, co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

BÁRBARA CAMILA FIRMINO FREIRE

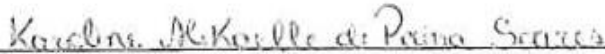
**APLICAÇÃO DE COBERTURAS COMESTÍVEIS A BASE DE FÉCULA DE
MANDIOCA, CERA DE ABELHA E EXTRATO DE ROMÃ NA CONSERVAÇÃO DE
QUEIJO TIPO COALHO**

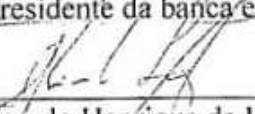
Dissertação apresentada ao Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade do Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

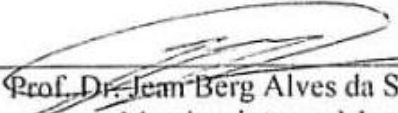
Linha de Pesquisa: Tecnologias Sustentáveis e Recursos Naturais do Semi-Árido.

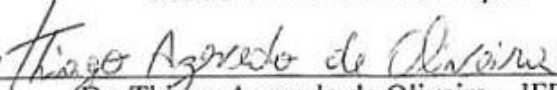
Defendida em: 26/02/2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Karoline Mikaelle de Paiva Soares – UFERSA
Presidente da banca e orientadora


Prof. Dr. Ricardo Henrique de Lima Leite – UFERSA
Membro interno ao Programa e co-orientador


Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva – UFERSA
Membro interno à Instituição


Dr. Thiago Azevedo de Oliveira – IFRN
Membro externo à Instituição

À minha família dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, a quem entrego minha vida e sou grata pela força, proteção e capacitação concedidas;

À minha mãe, amiga e conselheira, Edna Claudia, que sempre participou tão diretamente das minhas lutas e conquistas, e que tem sido meu exemplo de amor e dedicação;

Ao meu pai, João Batista, que sempre me apoiou e contribuiu para o meu crescimento pessoal e profissional;

À minha amada irmã, Brenna Caroline, e meu cunhado, Rodrigo Ananias, pela amizade, confiança e carinho;

Ao meu avô, Damião Firmino, e avó, Joana Auxiliadora, por toda dedicação, cuidado e amor, que são essenciais aos meus dias e contribuem para o meu crescimento;

Ao meu noivo, Lindemberg Ferreira, pela paciência, amor e apoio, sempre tão pontuais e essenciais;

À minha professora, orientadora e amiga, Dra. Karoline Soares, pela amizade e conhecimento compartilhado, me orientando com tanta atenção, disponibilidade, paciência e sabedoria, e ao professor Dr. Vilson Góis, que tem sido sempre atencioso e pronto a ajudar;

Ao meu co-orientador, Dr. Ricardo Leite, pela disponibilidade, sendo sempre tão acessível;

Ao técnico José Aldenor, por toda ajuda, até nos dias e situações mais improváveis;

Aos queridos colegas de laboratório e amigos da vida, Lucas Rabelo, Elisandra Cibelly, Paulo Filho, Iohana Praxedes, Renata Macêdo e Lidiane Mendonça, por todas as experiências que pudemos compartilhar, pelas várias horas e dias completos de trabalho e pela alegria da companhia de vocês;

Agradeço a Nicolas Araújo por todo auxílio prestado quando necessário;

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade (PPGATS) e à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), seus professores e técnicos, por todas as oportunidades e conhecimentos adquiridos;

À Banca Examinadora pelas contribuições que muito têm ajudado na construção desta pesquisa;

A todos os amigos que a UFERSA me deu, agradeço imensamente pelos momentos compartilhados, bons e ruins, em especial, ao meu grande amigo Tallyson Nogueira, que ajudou a tornar os dias mais leves com sua alegria e amizade.

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
(Charles Chaplin)

RESUMO

O queijo de coalho é um produto lácteo com elevada expressão no Nordeste brasileiro, onde é amplamente produzido e consumido. No entanto, as características inerentes deste produto, bem como a falta de padronização na produção, tendem a comprometer a sua qualidade e segurança. Assim, métodos de conservação se fazem necessários para manutenção de sua qualidade, existindo, atualmente, nesta área de pesquisa, uma maior busca por alternativas naturais. Como exemplo, tem-se então a utilização de coberturas comestíveis obtidas pela exploração de biopolímeros e compostos bioativos. Dessa forma, o seguinte estudo teve por objetivo, produzir uma cobertura comestível a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã e avaliar a sua eficiência na qualidade de queijo tipo coalho. Inicialmente foram produzidos diferentes tipos de filmes e coberturas para caracterização das propriedades e aplicação nas peças de queijo, respectivamente. Os filmes não apresentaram diferenças entre os tratamentos, exceto na cor, microestrutura e propriedades mecânicas, sendo o filme adicionado de extrato de romã e cera de abelha mais resistente à quebra e flexível. Após produção do queijo e aplicação das coberturas, realizou-se então a análise sensorial, demonstrando uma boa aceitação por parte dos provadores. Na avaliação da qualidade e vida útil, as amostras estocadas sob refrigeração ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) ao longo de 15 dias obtiveram resultados satisfatórios na redução de deteriorantes, principalmente sobre bactérias aeróbias mesófilas em todos os tratamentos. Na físico-química, as coberturas reduziram a acidez das amostras, mantendo-se estatisticamente relevante até o nono dia de análise e sem interferir na coloração dos queijos. A partir dos dados obtidos, conclui-se que as coberturas naturais surgem como uma alternativa na conservação do queijo tipo coalho, sendo os melhores resultados observados pela utilização da cobertura de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Palavras-chave: Biopolímeros. Produto lácteo. Análises de alimentos. Conservação.

ABSTRACT

The curd cheese is a dairy product with high expression in the Northeast of Brazil, where it is very produced and consumed. However, the inherent characteristics of this product, as well as the lack of standardization in production, tend to compromise its quality and safety. Thus, conservation methods are necessary to maintain its quality, and, currently, there is a bigger search for natural alternatives in this area of research. As an example, the use of edible coatings obtained by the exploration of biopolymers and bioactive compounds. The objective of this study was to produce an edible cover based on cassava starch, beeswax and pomegranate extract and evaluate its efficiency in the quality of curd cheese. Initially, different types of films and covers were produced to characterize the properties and application in cheese pieces, respectively. The films did not present differences between the treatments, except in the color, microstructure and mechanical properties, being the film added of extract of pomegranate and beeswax more resistant to breaking and flexible. After the cheese was produced and the coverings were applied, the sensorial analysis was carried out, demonstrating a good acceptance by the tasters. In the evaluation of the quality and shelf life, samples stored under refrigeration ($7\pm 1^{\circ}\text{C}$) over 15 days obtained satisfactory results in the reduction of deteriorants, especially on aerobic mesophilic bacteria in all treatments. In physicochemistry, the coatings reduced the acidity of the samples, remaining statistically relevant until the ninth day of analysis and without interfering with the color of the cheeses. From the data obtained, it is concluded that the natural coverings appear as an alternative in the conservation of rennet cheese, with the best results observed using the cassava starch, pomegranate extract and beeswax coverage.

Keywords: Biopolymers. Dairy product. Food analysis. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Peças de queijos tipo coalho.....	19
Figura 2	–	Polissacarídeos (amilose e amilopectina) presentes na fécula de mandioca...	22
Figura 3	–	Estrutura química do glicerol.....	25
Figura 4	–	Ajuste de suspensão bacteriana em escala nefelométrica de McFarland.....	32
Figura 5	–	Saponificação da cera de abelha em aparelho de refluxo.....	35
Figura 6	–	Aspecto visual das soluções filmogênicas de FM (fécula de mandioca), FMER (fécula de mandioca e extrato de romã), FMCA (fécula de mandioca e cera de abelha) e FMERCA (fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha).....	35
Figura 7	–	Placa de acrílico utilizada na produção de filmes comestíveis.....	36
Figura 8	–	Avaliação da permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	38
Figura 9	–	Etapas envolvidas no processo de produção de queijo tipo coalho.....	40
Figura 10	–	Avaliação microbiológica de queijos tipo coalho com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	43
Figura 11	–	Microscopia Eletrônica de Varredura dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, com dimensões de 50 μm e magnitude de 1Kx.....	53
Figura 12	–	<i>Heatmap</i> da correlação de Spearman entre os atributos sensoriais do queijo tipo coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	56

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Avaliação de bolores e leveduras em queijos de coalho com diferentes tratamentos e estocados sob refrigeração durante quinze dias..... 58
- Gráfico 2 – Avaliação de bactérias aeróbias mesófilas em queijos de coalho com diferentes tratamentos e estocados sob refrigeração durante quinze dias..... 59
- Gráfico 3 – Avaliação da acidez titulável em queijos de coalho com diferentes tratamentos e estocados sob refrigeração durante quinze dias..... 61
- Gráfico 4 – Avaliação do pH de queijos de coalho com diferentes tratamentos e estocados sob refrigeração durante quinze dias..... 62
- Gráfico 5 – Avaliação da cor de queijos de coalho com diferentes tratamentos e estocados sob refrigeração durante quinze dias..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Diferentes composições de filmes/coberturas comestíveis para aplicação em queijo de coalho.....	34
Tabela 2	–	Contagens obtidas na avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico de romã, em diferentes concentrações, sobre bactérias aeróbias mesófilas.....	47
Tabela 3	–	Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos com a caracterização dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	48
Tabela 4	–	Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos na avaliação das propriedades mecânicas dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	51
Tabela 5	–	Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos na análise sensorial de queijos tipo coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ANOVA	Análise de Variância
ASTM	American Society for Testing and Materials
BDA	Ágar Batata Dextrose
BHI	Brain Heart Infusion
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CA	Cera de abelha
CO	Controle
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ER	Extrato hidroalcoólico de Romã
FIB	Food Ingredients Brasil
FM	Fécula de mandioca
IAL	Instituto Adolfo Lutz
LABA	Laboratório de Biotecnologia de Alimentos
LPQ	Laboratório de Processos Químicos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Müeller Hinton
PCA	Ágar Padrão para Contagem
PVA	Permeabilidade ao Vapor de Água
PVC	Policloreto de Vinila
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TPVA	Taxa de Permeabilidade ao Vapor de Água
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1	Queijo.....	18
2.1.1	Queijo tipo coalho.....	18
2.1.1.1	Conservação de queijo tipo coalho.....	19
2.2	Filmes e coberturas comestíveis.....	20
2.2.1	Polissacarídeos.....	21
2.2.1.1	Fécula de mandioca.....	22
2.2.2	Aditivos.....	24
2.2.2.1	Plastificantes.....	24
2.2.2.2	Lipídios.....	25
2.2.2.2.1	Cera de abelha.....	26
2.2.2.3	Tensoativos.....	26
2.2.2.4	Bioativos.....	27
2.2.2.4.1	<i>Punica granatum</i> L.....	27
2.2.3	Método <i>casting</i>	28
2.2.4	Caracterização de filmes.....	28
2.2.4.1	Espessura.....	28
2.2.4.2	Permeabilidade ao vapor de água (PVA).....	29
2.2.4.3	Solubilidade.....	29
2.2.4.4	Propriedades mecânicas.....	29
2.2.4.5	Propriedades ópticas.....	30
2.2.4.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Produção e caracterização de filmes e coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã para utilização em queijo tipo coalho.....	31
3.1.1	Produção do extrato hidroalcoólico de romã.....	31
3.1.2	Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico de romã frente a micro-organismos isolados de queijos tipo coalho.....	32
3.1.2.1	Isolamento de bactérias aeróbias mesófilas de queijo tipo coalho.....	32

3.1.2.2	Teste de sensibilidade.....	32
3.1.2.3	Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> de diferentes concentrações do extrato de romã.....	33
3.1.3	Desenvolvimento dos filmes e coberturas comestíveis.....	34
3.1.4	Caracterização dos filmes comestíveis.....	36
3.1.4.1	Espessura.....	37
3.1.4.2	PVA.....	37
3.1.4.3	Solubilidade em água.....	38
3.1.4.4	Propriedades mecânicas.....	39
3.1.4.5	Cor e opacidade.....	39
3.1.4.6	MEV.....	39
3.2	Produção do queijo coalho e aplicação das coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã.....	39
3.3	Avaliação da aceitação de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã.....	42
3.4	Avaliação de aspectos qualitativos de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã estocados em refrigeração.....	43
3.4.1	Análises microbiológicas.....	43
3.4.1.1	Bactérias aeróbias mesófilas.....	44
3.4.1.2	Bolores e leveduras.....	44
3.4.2	Análises físico-químicas.....	45
3.4.2.1	pH.....	45
3.4.2.2	Acidez Titulável.....	45
3.4.2.3	Cor.....	45
3.5	Delineamento experimental e análise estatística.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	Produção e caracterização de filmes e coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã para utilização em queijo tipo coalho.....	47
4.1.1	Avaliação antimicrobiana <i>in vitro</i> do extrato hidroalcoólico de romã frente a micro-organismos isolados de queijos tipo coalho.....	47

4.1.2	Caracterização dos filmes comestíveis.....	48
4.2	Avaliação da aceitação de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã.....	55
4.3	Avaliação de aspectos qualitativos de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã estocados em refrigeração.....	57
4.3.1	Análises microbiológicas.....	57
4.3.2	Análises físico-químicas.....	61
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO A.....	81

1 INTRODUÇÃO

Os queijos são uma das formas mais antigas de emprego e conservação do leite, sendo utilizados desde o início da civilização humana. Nos últimos anos, no Brasil, têm representado uma parcela considerável dentre os derivados lácteos produzidos (MENDES et al., 2015). Apesar da infinidade de queijos fabricados em âmbito nacional, na Região Nordeste destaca-se o queijo tipo coalho, que é obtido pela coagulação do leite devido à ação do coalho e pode ser comercializado com até dez dias após a sua fabricação (BRASIL, 2001; BARROS et al., 2019). No entanto, por ser um produto altamente perecível e largamente produzido, por vezes com deficiência em parâmetros microbiológicos e padronização da qualidade, seja por pequenos produtores ou indústrias, se fazem necessárias, além da adoção das Boas Práticas de Fabricação, tecnologias capazes de prolongar sua vida útil (BRANCO et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2009).

Neste sentido, tem-se então a utilização dos filmes e coberturas comestíveis, que consistem em emulsões com diferentes formas de adição no alimento (PAGANI et al., 2012; PASCALL; LIN, 2013) e que não têm por finalidade a substituição total das embalagens sintéticas, comumente utilizadas no seu acondicionamento, mas limitar a migração entre os componentes do produto e permitir a preservação de importantes características como textura e valor nutricional, conferindo uma atuação funcional não disponibilizada pelas embalagens tradicionais (BOURTOOM; CHINNAN, 2008; ASSIS; BRITTO, 2014).

Os filmes e coberturas comestíveis apresentam uma importante característica de biodegradabilidade, sendo extensivamente estudadas as embalagens à base de polímeros, como proteínas e polissacarídeos, capazes de contribuir na diminuição da poluição ambiental (VILLADIEGO et al., 2005). Outro fator que merece destaque é a capacidade que os filmes a base de polissacarídeos têm de permitir a permanência de componentes antioxidantes e antimicrobianos na superfície do alimento e em altas concentrações (CHEN, 1995; YANGILAR, 2015). Exemplo de componente/conservante natural é a romã (*Punica granatum* L.), fruto comestível com capacidades antioxidante (HMID et al., 2013) e antimicrobiana (DEGÁSPARI; DUTRA, 2011; SHAYGANNIA et al., 2016) já bem relatadas.

Dentre os polissacarídeos amplamente estudados para elaboração de filmes e coberturas comestíveis está a fécula de mandioca, que apresenta como características de eleição o baixo custo e a competência de formar películas resistentes e transparentes, que proporcionam eficiente barreira a gases (LUVIELMO; LAMAS, 2012) e alta resistência

mecânica. Porém, são mais sensíveis à umidade, ao contrário daqueles elaborados com lipídios, que apresentam resistência à passagem de água, mas são opacos e quebradiços. Dessa forma, a combinação desses dois compostos pode resultar em filmes com melhores propriedades funcionais (BATISTA; TANADA-PALMU; GROSSO, 2005; NAVARRO-TARAZAGA; SOTHORNVIT; PÉREZ-GAGO, 2008; CHIUMARELLI; HUBINGER, 2014).

A cera de abelha é um lipídio extensamente estudado para produção de filmes comestíveis, apresentando em sua composição ésteres de álcoois graxos de cadeia longa e ácidos, hidrocarbonetos de cadeia longa e ácidos graxos (AURAS; ARROYO; SELKE, 2009) e cuja estrutura é mais densa e compacta, interferindo na migração das moléculas de água (VILLADIEGO et al., 2005).

Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo produzir coberturas comestíveis à base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato hidroalcoólico de romã para aplicação em queijo tipo coalho e avaliar o seu efeito na qualidade desse produto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo

O queijo é o produto fresco ou maturado obtido pela separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996). De forma simplificada, é um produto fresco ou maturado obtido pela separação do soro que ocorre no dessoramento, possibilitado pela coagulação do leite (ORDÓÑEZ PEREDA et al., 2005).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ, existe uma infinidade de queijos no Brasil que são produzidos a partir do leite de vaca, sendo eles o brie, camembert, cheddar, coalho, cottage, cream cheese, emental, fundidos, gorgonzola, gouda, minas frescal, minas padrão, mussarela, parmesão, prato, provolone, reino, requeijão, ricota fresca, saint Paulin e tilsit, e que são classificados a partir de critérios como o tratamento utilizado na massa e as características de cura (ABIQ, 2017).

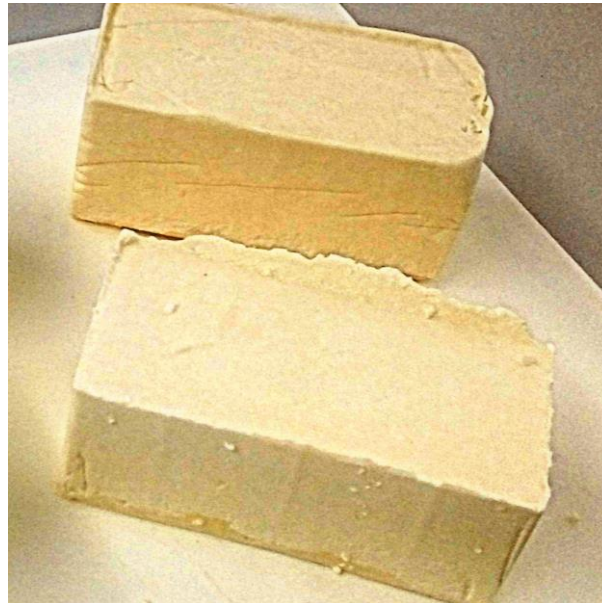
2.1.1 Queijo tipo coalho

O queijo tipo coalho é obtido por coagulação do leite, graças à atuação do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e que costuma ser comercializado com até dez dias desde a sua fabricação (BRASIL, 2001). É um tipo de produto lácteo amplamente consumido no Nordeste brasileiro e é produzido, principalmente, nos Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, sendo uma atividade rentável extremamente significativa aos produtores, dentre outros fatores, graças à simples tecnologia aplicada à produção. Nos últimos anos o produto tem apresentado ampla expansão por todo o território brasileiro, podendo ser caracterizado pelo teor de umidade, que varia entre média e alta umidade, e o cozimento da massa (semicozida ou cozida), além de ser considerado um componente cultural, cuja técnica tem sido passada às gerações (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006; BARROS et al., 2019).

A produção do queijo coalho ocorre por meio de modificações físico-químicas das micelas de caseína pela ação de enzimas conhecidas como coalho, dando origem à coalhada,

cujo mecanismo de produção envolve duas fases. Na primeira, a enzima irá atuar na fração k-caseína da proteína, clivando-a e fazendo com que seja liberado o caseíno macropeptídeo, que consiste na fração solúvel perdida durante o processo de dessoramento. Na fase seguinte ocorre à formação do gel de coalhada, estrutura capaz de ligar componentes como proteínas, gordura, lactose e sais minerais, dando origem, após as etapas necessárias, ao queijo (FIB, 2011a). De modo sucinto, o coalho é um queijo que não passa pela etapa de maturação, recebendo tal denominação pela coagulação ocorrer a partir de uma enzima encontrada no estômago de ruminantes. Essa enzima confere ao coalho uma maior resistência ao aquecimento, impedindo seu derretimento pela baixa proteólise e desmineralização (ABIQ, 2017). O aspecto do queijo tipo coalho pode ser observado na Figura 1.

Figura 1. Peças de queijo tipo coalho.



Fonte: acervo próprio.

2.1.1.1 Conservação do queijo tipo coalho

Apesar da elevada expressão do queijo tipo coalho na região Nordeste, este ainda é visto como um produto de baixa qualidade microbiológica, produzido, por vezes, em condições higiênico-sanitárias precárias e deficiência na padronização da qualidade. Isso o configura como um potente veículo de contaminantes, expondo os consumidores a possíveis Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (DAMACENO et al., 2014; BARROS et al., 2019), como demonstrado por vários autores. Exemplo é o trabalho de Borges et al. (2003), sobre a ocorrência de micro-organismos patogênicos e indicadores de higiene em queijo

coalho produzido, artesanalmente, no Ceará, demonstrando que as amostras apresentaram um perfil microbiológico insatisfatório, tendo em vista que foi encontrada uma alta contaminação por bolores e leveduras, coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva e presença de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Silva et al. (2018), observaram, em seu estudo sobre os aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres de Petrolina-PE, uma elevada contagem de bactérias aeróbias mesófilas, bem como de coliformes a 35°C e 45°C e presença de *Escherichia Coli*.

Com isso, observa-se que o controle de qualidade microbiológica do produto é essencial tanto na redução de perdas econômicas, como para garantir um alimento isento de riscos à saúde (FEITOSA et al., 2003). Assim, se fazem necessárias às aplicações de tecnologias capazes de prolongar o seu o tempo em prateleira, já que apresenta alta perecibilidade, característica capaz de reduzir sua vida útil (ARAÚJO et al., 2009). Na indústria de alimentos, com esta finalidade, são utilizados diferentes tipos de métodos, sejam eles físicos, químicos e/ou biológicos de conservação (FIB, 2011b).

Um método físico bastante empregado na preservação de queijos, inclusive do queijo tipo coalho, que é um queijo fresco, é o abaixamento da temperatura (refrigeração). De acordo com Gava, Silva & Frias (2008), esse método é capaz de retardar as reações químicas, a atividade enzimática e o crescimento de micro-organismos, e como não são empregadas temperaturas tão baixas, o alimento pode ser mantido viável por dias. Porém, quando utilizadas temperaturas insuficientes/inadequadas à sua manutenção, danos ao produto podem ser gerados, como demonstrou Oliveira (2010) em seu estudo sobre a evolução microbiológica de queijo fresco tradicional português em refrigeração doméstica, por um período médio de dois meses. Desse modo, a refrigeração é considerada um método de conservação temporário até que outra tecnologia seja aplicada ou até que o alimento seja consumido, devendo, para isso, ser controlada com o intuito de atender as exigências do alimento a ser refrigerado (LEONARDI; AZEVEDO, 2018).

Já na utilização dos conservantes, tem-se a preservação dos produtos pela adição de compostos químicos, definidos como ingredientes adicionais que não têm por propósito nutrir, mas mudar as características do alimento, conservando-o (LEONARDI; AZEVEDO, 2018).

2.2 Filmes e coberturas comestíveis

Para garantir a manutenção das características do alimento e sua comercialização, além dos processos físicos e químicos empregados, outro fator de elevada importância é a embalagem que o acondicionará. Neste sentido, têm-se expandido as pesquisas sobre a aplicação de filmes e coberturas comestíveis produzidos a partir de biopolímeros como embalagem dos mais variados tipos de produtos alimentícios (VILLADIEGO et al., 2005). Os biopolímeros constituem o grupo de polímeros produzidos pela exploração de fontes renováveis, aquelas com menor ciclo de vida quando comparadas às fontes fósseis (BRITO et al., 2011).

De modo prático, os filmes e coberturas são diferenciados pela forma de produção e aplicação ao produto. No primeiro caso, os filmes são pré-formados para posterior aplicação, enquanto as coberturas são desenvolvidas quando aplicadas sobre o alimento (PASCALL; LIN, 2013), atuando como barreiras, função estreitamente ligada às propriedades físicas e químicas que possuem, evitando a perda de água (transferência de umidade), trocas de gases (oxigênio e dióxido de carbono), lipídios e componentes de sabor. Na sua preparação, os polímeros frequentemente utilizados são as proteínas (gelatina, caseína, glúten de trigo e zeína) e polissacarídeos (amido, pectina, celulose, alginato e carragenina) (CHIUMARELLI; HUBINGER, 2014).

2.2.1 Polissacarídeos

Consistem em uma classe de carboidratos, formados por unidades de monossacarídeos repetidas, com mais de dez unidades estruturais. Nos seres vivos, os polissacarídeos apresentam três funções principais: são fonte de energia, componentes estruturais das células e aglutinantes de água. Os polissacarídeos ocorrem com diferentes tipos de estrutura, seja ela linear (amilose, celulose), ramificada (amilopectina, glicogênio), interrompida (pectina), bloco (alginato), ou repetição alternada (ágar, carragenina). Nos alimentos, uma importante propriedade desses carboidratos é a sua capacidade de formação de géis aquosos (FRAZIER, 2015).

Dentre os polissacarídeos tem-se então o amido, importante biopolímero utilizado com a finalidade de melhorar os aspectos sensoriais dos mais diversos alimentos. Todos os amidos são igualmente constituídos por resíduos de α -glicose, apresentando, no entanto, diferentes propriedades conforme sua origem botânica. Exemplo de alimento rico em amido é a mandioca (SILVA; CABELLO; PEREIRA, 2005).

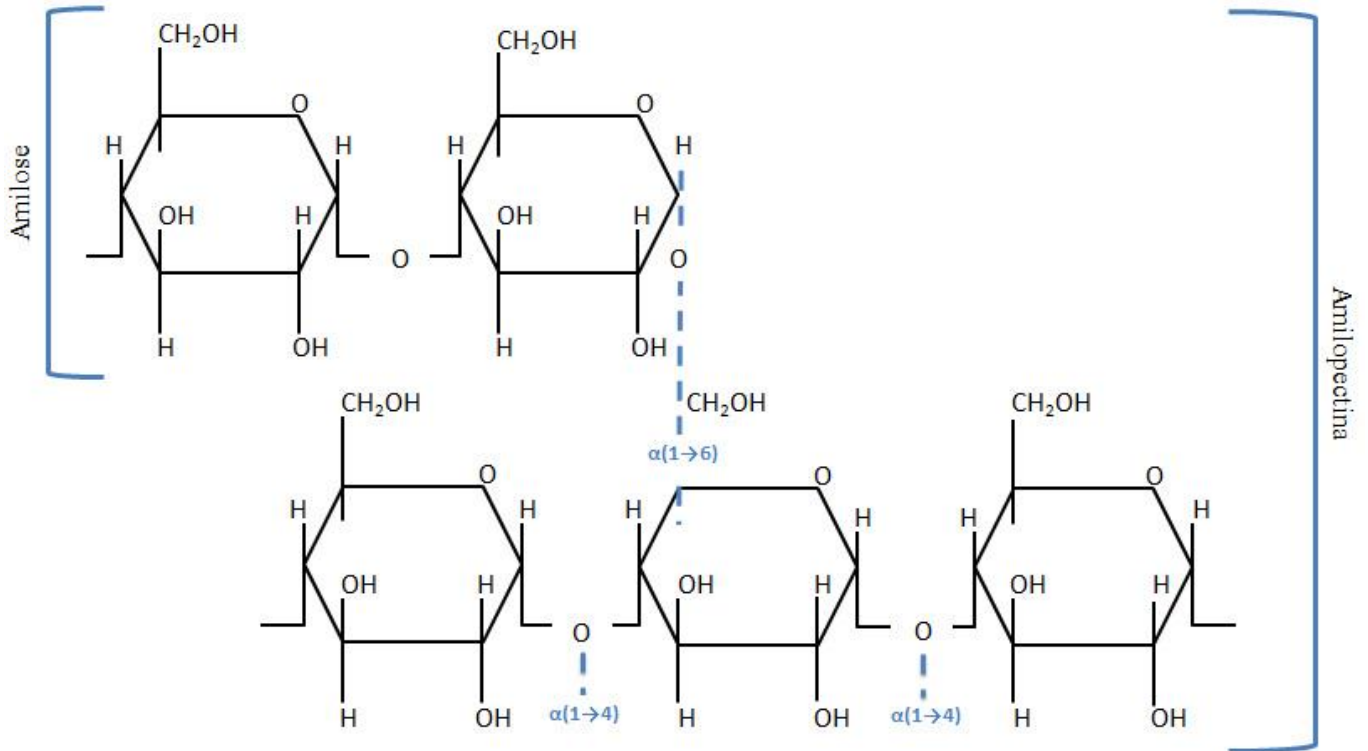
2.2.1.1 Fécula de mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) é uma espécie de planta considerada como importante fonte alimentar, que apresenta inúmeras vantagens frente a outras culturas, inclusive a adaptação a ambientes de baixa disponibilidade de água. Sua produção é mais elevada em países tropicais, dentre estes o Brasil que alcança uma colocação de destaque. A mandioca representa uma significativa fonte comercial de amido (FIORDA et al., 2013), que também é chamado de fécula quando extraído de partes subterrâneas da planta (tubérculos e raízes) (BRASIL, 2005).

Este polissacarídeo ocorre na forma de grânulos semicristalinos, formado por dois tipos de polímeros de glicose, que são a amilose e a amilopectina (FRAZIER, 2015), cujos teores variam entre 17 e 20% e 80 e 83%, respectivamente (VICENTINI, 2003).

A amilose é uma macromolécula linear com unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, enquanto a amilopectina é um polímero ramificado, com unidades de D-glicose ligadas através de ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ e ramificações em $\alpha(1\rightarrow6)$ (Figura 2). A variação entre estes dois componentes, seja nas proporções e/ou estruturas, pode alterar os grânulos e afetar as suas aplicações industriais. A propriedade de formação de filmes está associada às características químicas, físicas e funcionais da amilose (SHIMAZU; MALI; GROSSMANN, 2007).

Figura 2. Polissacarídeos (amilose e amilopectina) presentes na fécula de mandioca.



Fonte: adaptado de Frazier (2015).

No processo conhecido como gelatinização, ocorre a absorção da água e o inchaço do grânulo, que perde a sua estrutura originalmente organizada, após o aquecimento a temperaturas entre 55 e 70°C. Essa perda é devida ao rompimento das ligações de hidrogênio permitindo o aumento irreversível de tamanho do grânulo e o lixiviamento da amilose até a fase aquosa, que devido à sua linearidade consegue se aproximar o suficiente para formar pontes de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes, diminuindo a afinidade do polímero pela água e formando filmes (VICENTINI, 2003; FRAZIER, 2015). Ao conjunto de alterações que ocorre nas moléculas de amido após a gelatinização, voltando à sua forma cristalina, dá-se o nome de retrogradação e consiste no mais importante fenômeno que leva ao envelhecimento dos filmes (AZEVEDO et al., 2018).

O amido/fécula tem sido considerado como um componente promissor para elaboração de filmes e revestimentos de alimentos graças, além da abundância e variedade de fontes disponíveis, às suas propriedades funcionais e o baixo custo envolvido na produção (ROCHA et al., 2014). Outros pontos interessantes na sua utilização como barreira para aumentar a vida útil de alimentos estão relacionados às características do próprio invólucro que mostra ser insípido, inodoro, incolor, não tóxico, biodegradável, seguro e nutritivo, além da sua baixa permeabilidade ao oxigênio (PARETA; EDIRISINGHE, 2006). No entanto,

apesar das vantagens apresentadas, não são observados muitos estudos explorando seu uso como revestimento de produtos frescos, como o queijo.

Neste grupo tem-se então o trabalho de Sousa & Costa (2015), que avaliou o uso de revestimentos à base de amido de milho e fécula de mandioca sobre os parâmetros físico-químicos do queijo de coalho em um período de dois meses, e notou que estes se mostraram viáveis à sua conservação. Díaz, Reales & Torres (2017) realizaram a medição de transmitância do revestimento comestível à base de gel de aloe vera e amido de mandioca na conservação do queijo costeño usando fibras ópticas trifurcadas, disponibilizando resultados importantes à seleção de tratamentos na produção de filmes comestíveis e utilização como revestimento e, no caso do estudo, a solução mais adequada consistiu em 25% de gel de aloe vera e 3% de amido de mandioca.

No entanto, um inconveniente quanto à sua aplicação está na fragilidade do filme formado, gerando propriedades mecânicas inadequadas que podem ser superadas pela utilização de agentes plastificantes (TONGDEESOONTORN et al., 2011).

2.2.2 Aditivos

2.2.2.1 Plastificantes

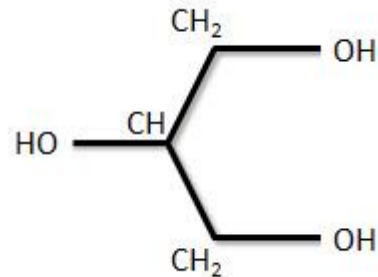
Os plastificantes são definidos como substâncias, com alto ponto de fusão, capazes de alterar as propriedades físicas, químicas e mecânicas do material ao qual serão adicionadas. Sobre as propriedades mecânicas, estes atuam tornando-o mais flexível e resistente (CARVALHO, 1997).

Sabendo que as características do próprio plastificante vão interferir na sua capacidade de romper a ligação de cadeia do polímero, bem como de atrair a água ao sistema biopolimérico, a sua seleção deve ser baseada, entre vários fatores, na compatibilidade entre o plastificante e o polímero, ou seja, apresentar uma estrutura química similar. No entanto, para filmes comestíveis à base de polissacarídeo, plastificantes hidrofílicos contendo grupos hidroxila, são os mais indicados, como é o caso do glicerol (NAVARRO-TARAZAGA; SOTHORNVIT; PÉREZ-GAGO, 2008), amplamente utilizado graças à sua estabilidade e comestibilidade, permitindo uma melhora nas propriedades mecânicas dos filmes (TONGDEESOONTORN et al., 2011).

Os grupos hidroxila presentes no glicerol são os responsáveis pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. Comercialmente, recebe o nome de glicerina e se apresenta

como um líquido incolor, com gosto adocicado, sem cheiro e muito viscoso (BEATRIZ; ARAÚJO; LIMA, 2011) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura química do glicerol.



Fonte: adaptado de Beatriz, Araújo & Lima (2011).

De modo prático, os plastificantes reduzem as interações entre as cadeias dos polímeros, aumentando a sua mobilidade e melhorando a flexibilidade, alongamento e resistência dos filmes formados. Porém, essa menor interação afeta a sua funcionalidade, pois permite o aumento na permeabilidade ao gás, vapor de água e soluto, como relatado por Navarro-Tarazaga, Sothornvit & Pérez-Gago (2008).

Tais dados podem ser confirmados por Shimazu, Mali & Grossmann (2007), em seu trabalho sobre o efeito da adição de glicerol e sorbitol em filmes de amido de mandioca, onde foi observada uma ação mais efetiva do plastificante glicerol, aumentando a capacidade de interação dos filmes com a água, bem como o seu grau de flexibilidade. Bertuzzi et al. (2007) demonstraram que o glicerol favorece a permeabilidade ao vapor de água em filmes a base de amido, e permite uma maior mobilidade da cadeia polimérica.

2.2.2.2 Lipídios

Os lipídios são moléculas orgânicas que desempenham importantes funções no organismo dos seres vivos, como na estrutura das células e no armazenamento de energia. Todos os tipos de lipídios são solúveis em solventes orgânicos apolares e apresentam uma baixa solubilidade em água. Essas moléculas são formadas a partir da associação entre ácidos graxos e álcool e podem ser classificadas em três grupos principais, como lipídios simples, compostos e derivados. Para os lipídios simples, apenas duas classes de produtos são produzidas após a hidrólise: ácidos graxos e álcoois. Nesta categoria estão incluídas as ceras (FRAZIER, 2015; FIB, 2016).

Os lipídios usados na produção de filmes são classificados em dois grupos: polares e não polares. As ceras pertencem à classe de lipídios não polar, não possuindo qualquer constituinte capaz de interagir com a água. Dessa forma, as ceras configuram-se como uma eficiente barreira lipídica, diminuindo, por exemplo, a permeabilidade ao vapor de água em filmes comestíveis (AYDIN; KAHVE; ARDIC, 2017).

2.2.2.2.1 Cera de abelha

O mel e o pólen são as matérias-primas essenciais à produção desse tipo de cera, uma vez que as abelhas utilizam tais elementos como alimento, transformando-os em gordura. A cera consiste em um importante produto apícola, secretada pelas abelhas através de glândulas cerígenas, localizadas na parte inferior do abdômen. Como coloração, a cera secretada é branca, adquirindo cor amarelada após a incorporação de outros elementos residuais, e é formada, basicamente, por uma mistura de hidrocarbonetos, ácidos graxos livres, álcoois de cadeias longas, monoésteres, hidroximonoésteres e ésteres complexos (PERANOVICH et al., 2009).

Tratando sobre os filmes biopoliméricos, é importante destacar que apesar das vantagens disponibilizadas na sua utilização, alguns entraves ainda se apresentam e tornam os plásticos convencionais mais atraentes ao público, como, por exemplo, deficiência nas propriedades mecânicas. Dessa forma, muitos tratamentos físicos e químicos têm sido estudados para suprir tal carência. Um exemplo é a adição da cera de abelha aos filmes, que individualmente ou combinada a outros aditivos irá afetar as propriedades destes graças aos seus componentes hidrofóbicos (SAURABH et al., 2016).

Segundo Villadiego et al. (2005), a cera de abelha apresenta boas propriedades de barreira, já que os seus cristais ortorrômbicos permitem uma estrutura mais compacta, com pouco espaço livre para migração das moléculas de água. No entanto, seu alto ponto de fusão (61°C) dificulta a incorporação às soluções biopoliméricas, que, além da rápida solidificação, forma partículas distintas na secagem (GONTARD et al., 1994). Para facilitar essa incorporação são utilizados então os chamados tensoativos. Oliveira et al. (2018), por exemplo, empregaram o óleo de girassol saponificado para incorporação da cera de abelha a filmes biopoliméricos de fécula de mandioca, amido de milho e gelatina.

2.2.2.3 Tensoativos

Os tensoativos, também chamados de surfactantes, são compostos que influenciam a superfície de contato entre duas fases, tal como óleo-água. Estes são caracterizados por possuir duas regiões distintas na mesma molécula, sendo uma polar hidrofílica e outra não polar hidrofóbica. De modo prático, os compostos tensoativos são amplamente utilizados com a finalidade de melhorar a estabilidade das partículas de lipídios na matriz biopolimérica (DAVANÇO; TANADA-PALMU; GROSSO, 2007).

Alguns tensoativos podem ser obtidos como resultado de uma reação de saponificação, ou hidrólise básica, na qual ocorre a preparação de álcoois e ácidos partindo de ésteres. Nela, o produto é resultante, por exemplo, da adição de um hidróxido ao lipídio juntamente com a elevação de temperatura (HIJAZIN; SIMÕES; SILVEIRA, 2010). Partindo deste princípio, neste trabalho será utilizada a cera de abelha saponificada para incorporação ao filme biopolimérico.

2.2.2.4 Bioativos

Os bioativos são compostos naturais que podem ser encontrados em espécies vegetais com potencial antioxidante e antimicrobiano capazes de contribuir na defesa do corpo humano, já que a proteção contra o estresse oxidativo e bactérias patogênicas depende não só de mecanismos endógenos, mas também de componentes presentes em alimentos e bebidas (ŠILER et al., 2014). Exemplo de alimento rico em compostos bioativos é a romã.

2.2.2.4.1 *Punica granatum* L.

A romã tem o nome científico de *Punica granatum* L., sendo pertencente à família Punicaceae e muito utilizada como planta frutífera, ornamental de parques e jardins (SANTOS et al., 2014). Consiste em um antigo fruto comestível, que tem despertado maior interesse graças aos benefícios disponibilizados à saúde do consumidor, como sua potente capacidade antioxidante, em especial pela presença da punicalagina, composto fenólico encontrado na casca (HMID et al., 2013). Além da sua atividade frente aos radicais livres, a romã se apresenta como um agente anti-inflamatório e antimicrobiano, podendo ter todas as suas partes aproveitadas, como relatado por Shaygannia et al. (2016). Em seu trabalho, os autores destacam a utilização da casca, flores, folhas, sementes e do fruto no combate a parasitas intestinais, distúrbios estomacais, hemorroidas (SHAYGANNIA et al., 2016), prevenção e tratamento do câncer, doenças cardiovasculares, condições dentárias, entre

outras. Um dado importante, obtido a partir de estudos preliminares, é a relativa não-toxicidade do fruto, mesmo em alta quantidade (PAGLIARULO et al., 2015).

De modo sucinto, as propriedades terapêuticas da romã têm sido atribuídas à presença de componentes como ácido elágico, elagitaninos (incluindo punicalaginas), ácido púrico, flavonoides e antocianinas. Em particular, nota-se a obtenção de extratos da casca, ricos em elagitaninos, como uma alternativa antimicrobiana notável frente a *Staphylococcus aureus* patogênico, necessitando maior estudo sobre outras cepas causadoras de enfermidades (PAGLIARULO et al., 2015). Exemplo dessa atividade pode ser observada em trabalho de Silva et al. (2013), que comprovou a atividade de extratos de *Punica granatum* L., inclusive da casca do fruto seco, sobre a multiplicação de *S. aureus*.

Assim, pode se destacar que diferentes matrizes biopoliméricas, como, por exemplo, as formadas a partir de polissacarídeos, podem ser usadas para incorporar agentes antimicrobianos e/ou antioxidantes e atuar na conservação dos alimentos (MEI et al., 2015).

2.2.3 Método *casting*

Para formação dos filmes comestíveis é utilizado o método *casting*, que consiste em depositar a solução filmogênica em uma superfície lisa para que ocorra a evaporação e consequente secagem do material (COSTA et al., 2012).

De modo mais detalhado, após a gelatinização térmica dos grânulos de amido/fécula em excesso de água, os polímeros de glicose amilose e amilopectina se dispersam na solução e reorganizam-se na secagem, formando uma matriz contínua. Essa secagem interfere diretamente na estrutura cristalina e propriedades dos filmes produzidos (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

2.2.4 Caracterização de filmes

A caracterização é uma etapa importante na confecção de filmes biodegradáveis, uma vez que revela as propriedades do material bem como a possibilidade da sua utilização na produção de embalagens.

2.2.4.1 Espessura

A espessura é uma importante avaliação física, definida como a distância perpendicular entre duas superfícies principais do material e sendo o seu controle essencial para estimar a uniformidade dos componentes trabalhados, permitindo também a repetibilidade da medida. Essa variável está associada a outras, visto que por meio dela podem ser obtidas informações mecânicas e de barreira (HENRIQUE; CEREDA; SARMENTO, 2008).

2.2.4.2 Permeabilidade ao vapor de água (PVA)

A permeabilidade é uma propriedade decorrente da interação do filme com o componente a ser permeado, no caso, o vapor de água, e expressa a facilidade com que as moléculas de água conseguem se difundir através do filme, em condições bem definidas de temperatura, umidade, espessura e pressão parcial. De modo prático, é o produto resultante da mobilidade das moléculas através do biopolímero pela diferença de concentração do permeante entre as duas faces do filme (CARVALHO, 1997). O aumento da PVA é um dos fatores de extrema importância na degradação de embalagens biopoliméricas, bem como do alimento acondicionado (BRANDELERO; GROSSMANN; YAMASHITA, 2013).

2.2.4.3 Solubilidade

A solubilidade de filmes em água é a propriedade associada à dissolução destes no solvente utilizado. De modo prático, demonstra o quanto o filme se manteve íntegro após o seu contato com ambientes muito úmidos ou aquosos (VICENTINI, 2003) e direciona a aplicação do filme biopolimérico como embalagem, levando-se em consideração as características do alimento. Assim, em alguns produtos será necessária a completa solubilização do filme, enquanto em outros, a sua integridade física deverá ser mantida, como para alimentos úmidos (FAKHOURI et al., 2007).

2.2.4.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes dependem da sua formulação, o que inclui a macromolécula, solvente e plastificante, e do processo de obtenção. De modo geral, estes precisam ser flexíveis e resistentes à ruptura, para que o alimento acondicionado seja protegido. Tais propriedades podem ser medidas através de testes de perfuração, tração e

relaxação. Dentre estes, as propriedades de tração são as mais relatadas e expressam a resistência do material após a sua aplicação, compreendendo a tensão de ruptura, a deformação e o módulo de elasticidade ou de Young (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

2.2.4.5 Propriedades ópticas

As propriedades ópticas dos filmes são relevantes na confecção de embalagens, estando relacionadas à cor, brilho e transparência. Este último é essencial na aceitação do produto alimentício, uma vez que permite a visualização da sua qualidade (FERNANDES et al., 2015). Logo, a transparência e opacidade estão relacionadas, sendo que quanto menor a opacidade, mas transparente é o filme (GONTARD et al., 1994).

2.2.4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho capaz de fornecer, rapidamente, informações sobre as características microestruturais de amostras sólidas, disponibilizando uma alta resolução, com imagem tridimensional resultante da grande profundidade de campo, servindo como uma complementação de informações obtidas pela imagem óptica (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida no Laboratório de Biotecnologia de Alimentos (LABA), no Centro de Ciências Agrárias, e Laboratório de Processos Químicos (LPQ), no Centro de Engenharias, ambos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, Rio Grande do Norte.

O experimento foi desenvolvido em duas partes principais. Inicialmente, foram desenvolvidas as etapas necessárias à produção e caracterização de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã, e, em seguida, foi realizado o processamento do queijo tipo coalho com as coberturas desenvolvidas e avaliação do efeito das mesmas na qualidade do produto produzido.

3.1 Produção e caracterização de filmes e coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã para utilização em queijo tipo coalho

3.1.1 Produção do extrato hidroalcoólico de romã

Os frutos de romã (*Punica granatum* L.) foram obtidos em propriedade particular, com autorização à coleta, no município de Mossoró, localizado no Estado do Rio Grande do Norte, que tem como coordenadas geográficas: 05° 11' 15" S de latitude, 37° 20' 39" W de longitude e 16 m de altitude.

Para produção do extrato, utilizou-se, como base, os trabalhos de Moreira et al. (2014) e Alsaggaf, Moussa & Tayel (2017), com adaptações. De modo inicial, após a coleta, as romãs foram transportadas ao LABA, em caixas isotérmicas, para lavagem com água estéril e sanitização com solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm. Para secagem dos frutos, folhas de papel toalha foram utilizadas. Em seguida, os mesmos foram cortados em quatro partes para separação da polpa e remoção da casca. As cascas foram então colocadas em estufa de circulação de ar a 40°C por um período de 48 horas. A etapa seguinte consistiu na maceração da casca seca, com o auxílio de almofariz e pistilo, para produção do pó. A extração dos componentes presentes no pó da romã foi realizada utilizando 70% de etanol como solvente com agitação constante por 24 horas em agitador magnético (modelo *SL-95*/marca *Solab*), em balão volumétrico com tampa, obtendo ao final do processo um extrato hidroalcoólico a 100 mg/mL. O extrato produzido foi colocado em uma proveta de 100 mL para promover a separação das fases líquida e sólida por um período de 24 horas. Após o tempo determinado,

com o auxílio de uma pipeta estéril, a fase líquida foi recuperada e colocada, sob agitação constante, em agitador magnético com aquecimento (modelo TE-0851/marca Tecnal) a 50°C por 48 horas, permitindo a remoção do álcool pelo não encaixe completo da tampa ao balão graduado. O extrato concentrado foi então armazenado em frascos de vidro âmbar e congelado, até a realização das análises.

3.1.2 Avaliação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de romã frente a micro-organismos isolados de queijos tipo coalho

3.1.2.1 Isolamento de bactérias aeróbias mesófilas de queijo tipo coalho

Para o isolamento de bactérias aeróbias mesófilas, peças de queijo tipo coalho foram adquiridas, de forma aleatória, em estabelecimento varejista local. Logo após a aquisição, os queijos foram transportados, em caixa isotérmica, até o LABA.

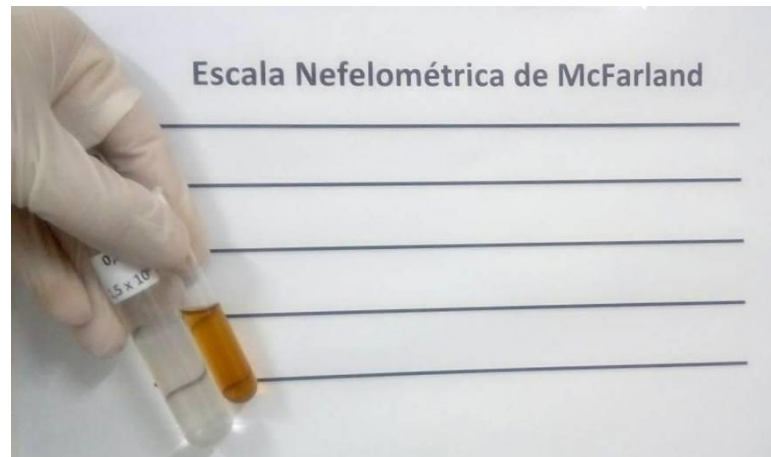
Inicialmente, em ambiente estéril, o queijo foi cortado com bisturi estéril em porção equivalente a 25 g, que foi adicionada a frasco de Erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina peptonada tamponada a 0,1%. A partir desta diluição, 1 mL da amostra foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), sendo o espalhamento realizado com o auxílio de alça de Drigalski até sua completa absorção. Realizou-se a incubação em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por $48 \pm 2\text{h}$ (BRASIL, 2003).

Para produção da suspensão inicial dos inóculos, colônias bacterianas foram recuperadas, preparadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 horas (BONA et al., 2014).

3.1.2.2 Teste de sensibilidade

As suspensões obtidas foram ajustadas, por meio de diluições sucessivas, para atingir uma turbidez equivalente a um padrão McFarland de 0,5 (Figura 4). Com o auxílio de um *swab* estéril, o inóculo foi capturado e varrido sobre a superfície do meio Agar MH (Müeller-Hinton), com incubação das placas a 37°C por 24 horas (QUEIROZ et al, 2014).

Figura 4. Ajuste de suspensão bacteriana em escala nefelométrica de McFarland.



Fonte: Acervo próprio.

Na etapa seguinte, discos estéreis de papel filtro de 6 mm de diâmetro foram produzidos e adicionados a placa com o auxílio de uma pinça, sendo pressionados levemente para garantir o completo contato com a superfície do meio. Os discos de papel filtro foram dispostos juntamente com o controle positivo (cefotaxima) e receberam 5 μ L do extrato de romã bruto. As placas foram incubadas, em estufa bacteriológica, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas, e após esse período verificou-se a formação dos halos de inibição, segundo metodologia proposta por Moreira et al. (2005) com adaptações. A leitura foi então realizada com auxílio de uma régua milimetrada, e o resultado expresso em milímetros (QUEIROZ et al., 2014).

3.1.2.3 Avaliação antimicrobiana *in vitro* de diferentes concentrações do extrato de romã

Após a obtenção do extrato bruto de romã (Tópico 3.1.1) e avaliação do seu efeito (Tópico 3.1.2.2), diferentes concentrações foram produzidas (5, 20, 35, 50, 65, 80 e 95 mg/mL) e testadas sobre bactérias aeróbias mesófilas isoladas de queijo tipo coalho.

Com a obtenção das bactérias em caldo BHI (Tópico 3.1.2.1) e ajuste em escala McFarland de 0,5, diluições seriadas foram realizadas transferindo-se 15 μ L do inóculo a tubos estéreis de caldo BHI (3 mL), com auxílio de micropipetas.

Em seguida, 15 μ L da última diluição foram adicionados a placas de Petri estéreis juntamente com 150 μ L do extrato (em cada concentração-teste) para plaqueamento em profundidade utilizando-se Agar MH fundido. Foram produzidas também placas controle, onde o inóculo foi adicionado sem a presença do extrato. Após completa solidificação, as

placas foram incubadas a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Os valores utilizados foram adaptados de Bona et al. (2014).

Foram produzidas cinco placas por concentração-teste e realizada a contagem das colônias, sendo as médias expressas em UFC/g. Essa etapa foi realizada com o intuito de definir a melhor concentração de extrato, ou seja, a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo para ser então utilizada nos filmes e coberturas comestíveis.

3.1.3 Desenvolvimento dos filmes e coberturas comestíveis

Os filmes e coberturas foram desenvolvidos a partir da mistura de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã. A fécula de mandioca desidratada foi adquirida da Indústria Primícias do Brasil Ltda., com teores de amilose e amilopectina em torno de 29% e 70%, respectivamente, baseando-se nos dados obtidos por Oliveira et al. (2018) para o mesmo produto. A cera de abelha foi obtida de apicultores locais do município de Mossoró, Rio Grande do Norte, na forma purificada, sendo utilizada como tensoativo após processo de saponificação de 50%, realizado no LPQ. As composições dos filmes/coberturas comestíveis encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Diferentes composições de filmes/coberturas comestíveis para aplicação em queijo de coalho.

Filme/Cobertura	Fécula de mandioca	Cera de abelha	Extrato de romã
1	3%	Ausência	Ausência
2			Presença*
3		10%	Ausência
4			Presença*

Legenda: *Percentual definido a partir dos testes *in vitro* (Tópico 3.1.2.3).

Na produção dos filmes/coberturas, foi utilizada a metodologia descrita em Oliveira et al. (2018), com algumas adaptações. Inicialmente, a fécula de mandioca a 3% recebeu água destilada e glicerol (20% em relação à massa seca do biopolímero) e permaneceu sob agitação manual e constante por 15 minutos, com auxílio de bastão de vidro, em banho-maria a 75°C .

Para manter as propriedades da cera de abelha e torná-la, parcialmente, um tensoativo, realizou-se o processo de saponificação em aparelho de refluxo (Figura 5).

Os valores para o cálculo do índice de saponificação com o NaOH foram obtidos com base em estudo prévio utilizando-se o hidróxido de potássio (KOH) na saponificação da cera de abelha (NOGUEIRA et al., 2018). Assim, para 50% de saponificação utilizou-se 31,8 mg de NaOH por grama de cera de abelha.

A concentração de cera utilizada foi de 10% em relação à massa seca do biopolímero, e a ela foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 1% em etanol, sendo os componentes mantidos em ebulição branda por 1 hora e 30 minutos. O etanol foi utilizado a fim de favorecer a formação dos produtos.

Figura 5. Saponificação da cera de abelha em aparelho de refluxo.



Fonte: acervo próprio.

Na formação dos filmes/coberturas 3 e 4, a fécula de mandioca gelatinizada e a cera saponificada foram misturadas a mesma temperatura (75°C). O extrato hidroalcoólico da casca da romã foi incorporado (10% em relação à mistura) as soluções após estas alcançarem a temperatura de 50°C, produzindo então as coberturas 2 e 4 (Tabela 1).

O aspecto visual das soluções filmogênicas formadas encontram-se na Figura 6.

Figura 6. Aspecto visual das soluções filmogênicas de FM (fécula de mandioca), FMER (fécula de mandioca e extrato de romã), FMCA (fécula de mandioca e cera de abelha) e FMERCA (fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha).

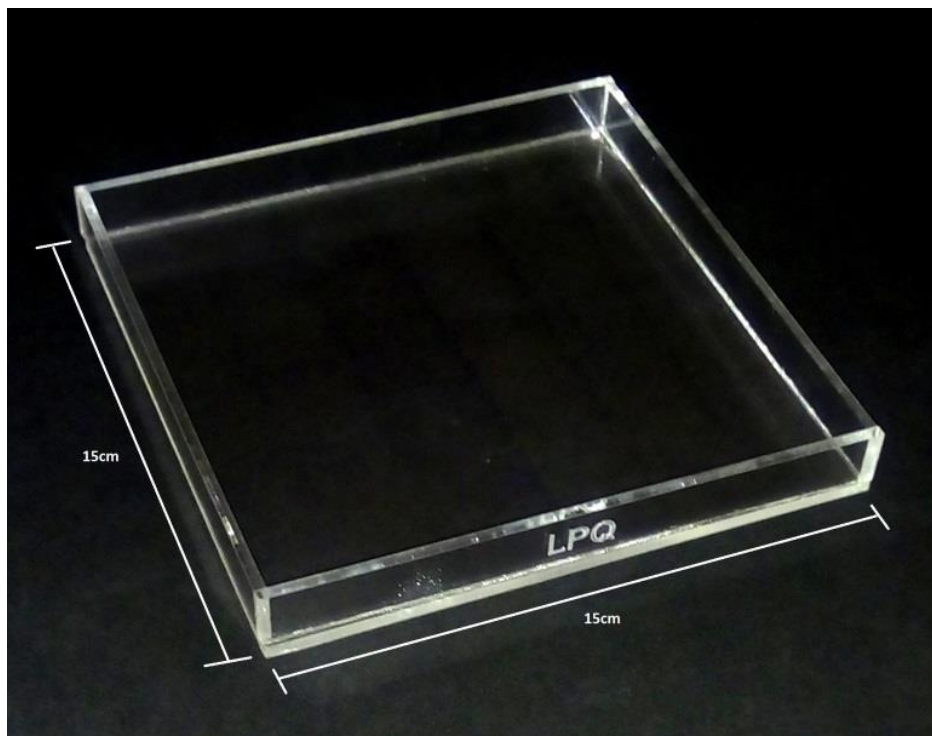


Fonte: acervo próprio.

3.1.4 Caracterização dos filmes comestíveis

Os filmes foram produzidos pelo processo de “*casting*”, em placas de acrílico (15x15cm) (Figura 7), adicionando-se 60 mL de solução filmogênica, de acordo com os componentes e proporções contidos na Tabela 1. Para secagem, as placas foram colocadas em estufa de secagem com circulação e renovação de ar (*Tecnal/TE-394/1*) a 50°C por 4 ± 1 h.

Figura 7. Placa de acrílico utilizada na produção de filmes comestíveis.



Fonte: acervo próprio.

Em seguida, os filmes foram destacados cuidadosamente das placas com o auxílio de pinça inox e, antes da caracterização, acondicionados em estufa incubadora com demanda bioquímica de oxigênio (BOD), com umidade relativa controlada de 54% e temperatura de 25°C por 24 horas, como realizado por Faria, Vercelheze & Mali (2012), mas com ajuste nas condições empregadas. Essa é uma etapa importante para se obter o estado definido da amostra em relação à atmosfera, permitindo a reprodutibilidade dos resultados e o conhecimento sobre o comportamento do material estudado frente as condições ambientais (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010).

3.1.4.1 Espessura

A espessura dos filmes foi medida através de um micrômetro manual (Mitutoyo, modelo MDC-25M, MFG/Japão). Dez medidas foram realizadas, aleatoriamente, ao longo do filme e calculada a espessura média do mesmo, bem como o intervalo de confiança a 95% (FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012).

3.1.4.2 PVA

Na avaliação da PVA, foram selecionados filmes com espessura média variando dentro de uma faixa de $\pm 3\%$ e utilizou-se o método proposto por Zhao et al. (2018), com adaptações. Os filmes foram usados para selar a abertura circular de células de permeação contendo água destilada e sendo mantidas em dessecador com sílica, sob umidade (10%) e temperatura (28,6°C) controladas (Figura 8). A massa dos frascos foi medida a cada hora e a permeabilidade ao vapor de água determinada através da Equação 01, sendo os resultados expressos em $\text{g}\cdot\text{mm}/\text{h}\cdot\text{KPa}\cdot\text{m}^2$.

$$PVA = \frac{(TPVA \times H)}{\Delta P} \quad (01)$$

Onde:

TPVA = taxa de permeabilidade ao vapor de água ($\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{h}$);

H = espessura do filme (mm);

ΔP = diferença de pressão parcial (KPa).

Figura 8. Avaliação da permeabilidade ao vapor de água (PVA) de filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.



Fonte: acervo próprio.

3.1.4.3 Solubilidade em água

A solubilidade dos filmes em água foi determinada por gravimetria, tomando como base o trabalho de Ribeiro et al. (2015). Discos de 2 cm de diâmetro foram produzidos para os diferentes filmes e a massa foi obtida, em balança analítica, após secagem em estufa a 105°C por 24 horas. Os discos foram então imersos em 50 mL de água destilada a 29°C e mantidos sob agitação (70 rpm) por 24 horas em incubadora orbital TE-4200. Após esse tempo foram retirados, secos nas mesmas condições citadas anteriormente e sua massa final foi medida. Para cada tratamento foram realizadas cinco repetições, sendo a solubilidade em água, S_w , calculada pela Equação 02.

$$S_w(\%) = \frac{(w_i - w_f)}{w_i} \times 100 \quad (02)$$

Onde:

w_i = massa inicial do disco (g);

w_f = massa final do disco (g).

3.1.4.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes (módulo de elasticidade, a tensão de ruptura e deformação) foram determinadas em máquina de ensaios de tração (DL5000/10000 Series EMIC 23), que opera segundo a norma ASTM D-882-91. Os ensaios foram realizados em quintuplicata, cujos corpos de prova apresentavam as seguintes propriedades: comprimento de 80 mm, largura de 5 mm, espessura em torno de 0,080 mm e área média de 0,40 mm².

3.1.4.5 Cor e opacidade

A cor dos filmes foi estabelecida através dos parâmetros a*, b* e L*, medidos com o auxílio de um colorímetro de reflectância (CR 10 Minolta). A opacidade dos filmes foi determinada segundo a Equação 03 (ZAVAREZE et al., 2012).

$$Op(\%) = \frac{Op_b}{Op_w} \times 100 \quad (03)$$

Onde:

Op_b = leitura contra um fundo preto;

Op_w = leitura contra um fundo branco.

3.1.4.6 MEV

Eletromicrografias dos filmes (superfície e seção transversal), com dimensões de 50 µm, foram obtidas, após metalização das amostras com ouro (camada de 5 nm), utilizando-se um Microscópio Eletrônico de Varredura Modelo VEGA 3. A tensão e a magnitude empregadas foram de 15KV e 1Kx, respectivamente. Para realização da análise, as amostras foram fixadas a *stubs* com auxílio de fitas de carbono, pinça e tesoura.

3.2 Produção do queijo coalho e aplicação das coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã

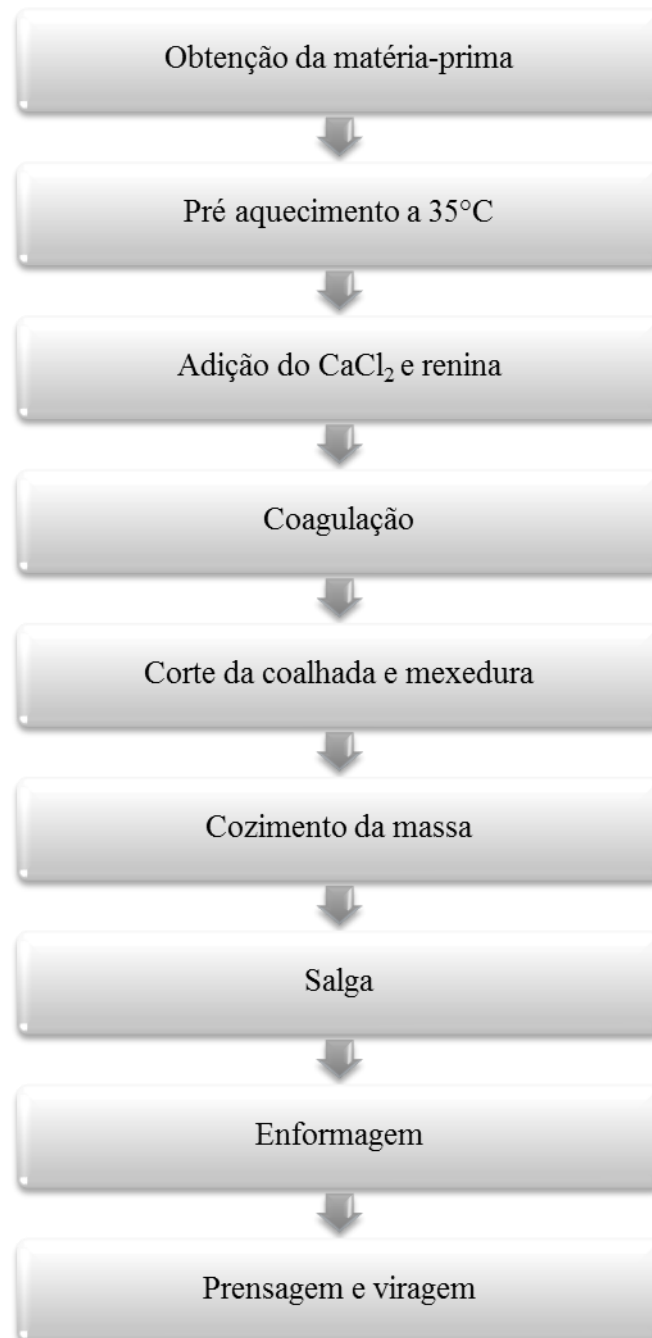
O processamento do queijo foi realizado com leite industrializado, do tipo pasteurizado, obtido de comércio varejista local, em condições de refrigeração adequada. Imediatamente após a aquisição, a matéria-prima foi acondicionada em caixas isotérmicas e

transportada ao LABA, para produção do queijo tipo coalho de acordo com metodologia proposta por Nassu, Macedo & Lima (2006) e Araújo et al. (2012), com adaptações.

O leite pasteurizado foi pré-aquecido a 35°C para adição de cloreto de cálcio (CaCl_2) (1 mL/10 L) e coalho/renina (4 g/10 L). Durante a etapa de coagulação, o leite contendo o coalho permaneceu em repouso por um tempo mínimo de 50 minutos, possibilitando a formação da coalhada e do ponto de corte. A massa foi então cortada manualmente com auxílio de liras verticais e horizontais e submetida à mexedura, para permitir o desprendimento do soro em relação ao coágulo.

A massa, durante a etapa de cozimento, feita pelo aquecimento de parte do soro desprendido (75°C), alcançou uma temperatura em torno de 50°C. A salga foi realizada por meio de salmoura aquecida (100°C) contendo 1 L de soro adicionado de 100 g de cloreto de sódio iodado, por cinco minutos, em movimento constante com auxílio de colheres de silicone. Após a etapa de salga, realizou-se a moldagem do queijo em formas retangulares perfuradas e prensa manual para permitir a saída do soro, com viragem das peças a cada três horas. Todas essas etapas encontram-se resumidas na Figura 9.

Figura 9. Etapas envolvidas no processo de produção de queijo tipo coalho.



Fonte: adaptado de Nassu, Macedo & Lima (2006).

Após o processamento, o queijo coalho produzido foi submetido a dois processos distintos: 1) aplicação dos tratamentos correspondentes às coberturas comestíveis (Tabela 1) nas peças inteiras, secagem e refrigeração (amostras utilizadas na avaliação da aceitação sensorial) e 2) corte das peças em cubos, indução ao abuso térmico por 24 horas, aplicação das coberturas, secagem e refrigeração (amostras para avaliação qualitativa). No entanto, essas etapas e processos serão mais bem abordados nos itens 3.3 e 3.4, respectivamente.

Em ambos os processos, as coberturas foram aplicadas utilizando-se o método “*dipping*” (COSTA et al., 2012), realizando a imersão dos queijos em solução filmogênica. Para o primeiro processo, bandejas de plástico esterilizadas foram utilizadas; no segundo, a imersão foi realizada com auxílio de palitos de madeira, previamente sanitizados em solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm. Os queijos foram postos para secar em placas de isopor dispostas sobre bancada, em sala climatizada ($14 \pm 2^\circ\text{C}$), por cinco horas ou até a completa secagem das peças. Em seguida, as peças secas foram acondicionadas em bandejas de isopor, cobertas com papel filme e levadas à refrigeração ($7 \pm 1^\circ\text{C}$).

Os tratamentos utilizados foram: CO (Controle/sem cobertura), FM (Fécula de mandioca), FMER (Fécula de mandioca + Extrato de romã), FMCA (Fécula de mandioca + Cera de abelha) e FMERCA (Fécula de mandioca + Extrato de romã + Cera de abelha).

3.3 Avaliação da aceitação de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã

A aceitação dos queijos recobertos foi avaliada por meio de análise sensorial, conduzida logo após o processamento, em até 24 horas da aplicação dos tratamentos. A avaliação foi realizada por meio de método afetivo, que fornece, justamente, informações de aceitação e preferências sobre os produtos (STONE; BLEIBAUM, 2015).

A análise sensorial seguiu os critérios do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, estando de acordo com a Resolução 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012). O presente trabalho faz parte do projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, sob número de registro CAAE 79974517.0.0000.5294 e parecer 2.444.611.

Para avaliação, utilizou-se uma escala hedônica estruturada de nove pontos (1 – “Desgostei muitíssimo”/9 – “Gostei muitíssimo”), que levou em consideração as características globais do queijo submetido às diferentes coberturas (tratamentos), tais como aparência, cor, sabor e textura. Já a escala de cinco pontos (1 – “Certamente não compraria”/5 – “Certamente compraria”), foi aplicada para avaliar a intenção de compra do produto (MANGUEIRA; TRAVASSOS; MOREIRA, 2002; SPADOTI; DORNELLAS; ROIG, 2005) (ANEXO A). A apreciação dos queijos se iniciou após assinatura, pelos voluntários, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (BRASIL, 2012).

Foram utilizados 76 provadores não treinados, selecionados aleatoriamente, constando em ambos os sexos, da cidade de Mossoró (RN) e com idade mínima de 18 anos, além de não

apresentar objeções quanto ao consumo dos queijos ou demais componentes da pesquisa. O cálculo amostral para obtenção do número de participantes foi estabelecido através de metodologia proposta por Levine, Berenson & Stephan (2000) e Miot (2011). Como realizado em trabalho de Manguiera, Travassos & Moreira (2002), as amostras foram servidas em temperatura ambiente, acompanhadas de biscoito água e sal e água mineral para remoção do sabor residual e limpeza das papilas gustativas, entre uma prova e outra. As peças de queijo foram apresentadas simultaneamente aos julgadores voluntários, sendo a ficha preenchida após orientação por parte da equipe.

O teste foi conduzido em sala climatizada, bem iluminada, com bancadas projetadas para acomodação dos produtos, suprimentos e documentos (TCLE e ficha de avaliação).

3.4 Avaliação de aspectos qualitativos de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã estocados em refrigeração

Na avaliação dos aspectos qualitativos de queijo tipo coalho com coberturas, tomou-se como base o estudo de Gorrasi et al. (2016), criando-se, inicialmente, condições de abuso térmico ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) para desenvolvimento de micro-organismos e constatação do efeito destas sobre eles.

No entanto, após 24 horas, os cubos de queijo receberam as coberturas e, após a secagem, foram embalados em bandejas de isopor com filme de policloreto de vinila (PVC), previamente esterilizados por radiação ultravioleta (UV), refrigerados ($7 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos às avaliações microbiológicas e físico-químicas por um período de quinze dias, em intervalos de 72 horas, a partir do dia zero (aplicação dos tratamentos).

3.4.1 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em cabine de fluxo laminar, sendo que todos os utensílios e materiais utilizados seguiram as recomendações de higiene e esterilidade para minimização de interferência externa (Figura 10).

Figura 10. Avaliação microbiológica de queijos tipo coalho com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.



Fonte: Acervo próprio.

Os queijos foram previamente cortados, com faca inox estéril, e separados em porções de 25 g, pesadas por balança analítica de precisão, para aplicação dos tratamentos, cujas etapas encontram-se no Tópico 3.2.

As porções foram então adicionadas a frascos de Erlenmeyer contendo 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, para formação da diluição 10^{-1} (BRASIL, 2003). A partir desta, foram realizadas diluições seriadas necessárias as contagens de bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras, como descrito por Silva et al. (2007), sendo os valores expressos em $\text{Log}_{10}\text{UFC/g}$.

3.4.1.1 Bactérias aeróbias mesófilas

Para a análise de micro-organismos aeróbios mesófilos utilizou-se a técnica de cultivo superficial, onde 1 mL de cada diluição foi inoculado na superfície de placas de Petri contendo meio Ágar Padrão para Contagem (PCA), sendo o espalhamento realizado com o auxílio de alça de Drigalski até sua completa absorção. A incubação das placas invertidas, foi realizada em estufa bacteriológica a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas.

3.4.1.2 Bolores e leveduras

Na análise de bolores e leveduras, por plaqueamento em superfície, 1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri com meio Ágar Batata Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10%, em duplicata, e espalhado com alça de Drigalski. Sem inverter, as placas foram incubadas em BOD a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por cinco dias. Essa técnica baseou-se no crescimento seletivo de fungos em meio com pH 3,5, pela utilização de ácido, associado à temperatura de incubação.

3.4.2 Análises físico-químicas

3.4.2.1 pH

Os valores foram obtidos pela utilização de pHmetro Microprocessado de bancada (Quimis) previamente calibrado (IAL, 2008), com aplicação direta do eletrodo em solução.

3.4.2.2 Acidez Titulável

A acidez foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,01 M, até obtenção da coloração rósea pela utilização de solução de fenolftaleína (IAL, 2008). Os valores obtidos foram expressos em % de ácido láctico (Equação 4):

$$\% \text{ de ácido láctico} = \frac{V \times f \times 0,9}{m} \quad (4)$$

Onde:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação (mL);

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N (0,99);

m = massa da amostra (g).

3.4.2.3 Cor

A análise colorimétrica foi realizada com auxílio de colorímetro Minolta, modelo CR-300, utilizando o sistema CIELAB (a^* , b^* , L^*). Assim, foram obtidas as coordenadas de teor de vermelho (a^*), teor de amarelo (b^*) e luminosidade (L^*), em triplicata (SANTOS et al., 2011).

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos por dia de análise e cinco repetições.

Os dados alcançados na caracterização dos filmes, propriedades mecânicas e na análise sensorial foram expressos em valores de média \pm desvio padrão através do programa estatístico SigmaPlot for Windows (SigmaPlot; Systat Software Inc) versão 12.0. Após análise dos pressupostos paramétricos, diferenças estatísticas, entre os grupos experimentais nas variáveis relacionadas aos filmes e propriedades mecânicas, foram obtidas, quando normal, por Análise de variância (One-way ANOVA) seguida por Tukey e, quando rompida a distribuição gaussiana, por Kruskal-Wallis. As variáveis sensoriais foram analisadas por Friedman. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A matriz gráfica da correlação de Spearman dos atributos sensoriais foi obtida usando o pacote “corrplot” (WEI; SIMKO, 2016) no software estatístico R versão 3.5.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

Os valores obtidos para a microbiologia foram transformados, inicialmente, em \log_{10} UFC/g. Em seguida foram submetidos à Análise de variância (ANOVA), bem como os dados físico-químicos, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade utilizando-se o software estatístico R versão 3.5.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção e caracterização de filmes e coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã para utilização em queijo tipo coalho

4.1.1 Avaliação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de romã frente a micro-organismos isolados de queijos tipo coalho

Sobre o teste de sensibilidade, observou-se um halo de inibição correspondente a 12 mm, configurando o grupo de bactérias aeróbias mesófilas como sensível ao extrato hidroalcoólico de romã. Tal resultado foi obtido observando-se o estudo de Bona et al. (2014), que considerou com atividade inibitória os halos com diâmetro ≥ 6 mm.

A partir dos dados de sensibilidade, diferentes concentrações do extrato foram produzidas e avaliadas quanto à sua atividade antimicrobiana *in vitro*, cujos valores encontram-se descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Contagens obtidas na avaliação antimicrobiana *in vitro* do extrato hidroalcoólico de romã, em diferentes concentrações, sobre bactérias aeróbias mesófilas.

Concentração-teste (mg/mL)	Média de contagem (UFC/g)
Controle	118
5	94
20	18
35	2
50	*
65	*
80	*
95	*

Legenda: *: ausência de crescimento microbiano.

As contagens de bactérias aeróbias mesófilas variaram de 118 UFC/g no controle até a total ausência de colônias ou inibição do grupo microbiano na maior concentração testada (95 mg/mL), configurando o extrato como eficiente antimicrobiano na etapa *in vitro*. De acordo com os dados contidos na Tabela 2, observou-se a concentração 50 mg/mL como a mais

adequada para produção dos filmes e coberturas, correspondendo a menor concentração onde ocorreu a inibição total do crescimento dos micro-organismos em placa.

Os achados deste estudo podem ser atribuídos aos compostos encontrados no fruto, que tem como principais constituintes os alcaloides, taninos, compostos fenólicos e flavonoides, frequentemente associados às suas atividades terapêuticas (MOREIRA et al., 2014). Esses dados são essenciais, tendo em vista a importância e abrangência do grupo estudado, que contém as bactérias patogênicas de origem alimentar e cuja maior parte é causadora de toxinfecções (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SAEKI; MATSUMOTO, 2010).

Estudo de Degáspari & Dutra (2011) traz inúmeros casos que comprovam a ação antimicrobiana da romã frente as mais variadas cepas microbianas, inclusive micro-organismos de virulência, como é o caso dos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, o que corrobora os achados deste estudo.

4.1.2 Caracterização dos filmes comestíveis

Nas Tabelas 3 e 4 e na Figura 11, encontram-se os resultados obtidos na caracterização dos filmes de fécula de mandioca acrescidos de extrato hidroalcoólico de romã e cera de abelha saponificada.

Tabela 3 – Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos com a caracterização dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Variáveis	FM	FMER	FMCA	FMERCA
Espessura (mm)	0,07 \pm 0,01 ^a	0,06 \pm 0,02 ^a	0,07 \pm 0,01 ^a	0,08 \pm 0,01 ^a
Solubilidade (%)	26,91 \pm 1,59 ^a	27,17 \pm 0,73 ^a	28,08 \pm 1,24 ^a	26,2 \pm 2,21 ^a
PVA (g.mm/h.Kpa.m²)	0,45 \pm 0,07 ^a	0,52 \pm 0,15 ^a	0,50 \pm 0,09 ^a	0,48 \pm 0,08 ^a
a	-7,44 \pm 0,47 ^a	-8,12 \pm 0,75 ^{ab}	-11,04 \pm 1,34 ^b	-10,06 \pm 1,71 ^b
b	20,14 \pm 0,09 ^b	22,54 \pm 0,68 ^a	19,64 \pm 0,19 ^c	22,42 \pm 0,19 ^a
L	85,12 \pm 0,15 ^a	85,24 \pm 0,34 ^a	84,98 \pm 0,33 ^{ab}	84,56 \pm 0,41 ^b
Opacidade (%)	43,65 \pm 0,61 ^a	43,43 \pm 1,38 ^a	44,03 \pm 0,24 ^a	43,85 \pm 0,27 ^a

Legenda: FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. PVA: permeabilidade ao vapor de água; a: cromaticidade a*; b: cromaticidade b*; L: luminosidade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística (p<0,05).

Os valores de espessura dos filmes produzidos variaram entre 0,06 e 0,08 mm, não demonstrando, no entanto, diferenças estatísticas entre si (Tabela 3). Trabalho de Shimazu, Mali & Grossmann (2007) obteve resultados semelhantes aos deste estudo para filmes de amido de fécula, cuja espessura variou de 0,07 a 0,10 mm.

Observa-se então que a técnica utilizada (*casting*) na sua produção permitiu um controle satisfatório deste parâmetro, confirmado pelos valores expressos na Tabela 6. Segundo Mali, Grossmann & Yamashita (2010), o controle da espessura dos filmes produzidos por este método precisa de uma maior atenção, já que esta variável influencia outras propriedades, inclusive a permeabilidade ao vapor de água em filmes hidrofílicos. De modo prático, quanto maior a sua espessura, mais permeável ao vapor de água ele é. As variações nas demais propriedades dos filmes biopoliméricos como consequência dos valores de espessura nem sempre são consideradas, mas, de acordo com Sobral (2000), seu estudo é fundamental.

Outra observação a se considerar é que a incorporação dos componentes à solução filmogênica de fécula de mandioca não interferiu na espessura de FMER, FMCA e FMERCA (Tabela 3), o que foi conseguido mantendo-se constante a quantidade de sólidos entre os ensaios.

Quanto a solubilidades dos filmes, os valores obtidos para os tratamentos FM, FMER, FMCA e FMERCA foram de 29,91%, 27,17%, 28,08% e 26,2%, respectivamente. No entanto, com a aplicação do teste estatístico, não foram observadas diferenças significativas entre eles (Tabela 3). Com a análise, notou-se que após as 24 horas de imersão em água, sob agitação constante, os filmes biopoliméricos se mantiveram íntegros e tornaram-se opacos. De acordo com Vicentini (2003), a solubilidade dos filmes em água indica sua integridade em ambientes muito úmidos, sendo que quanto maior esta variável, menor sua resistência à água.

Segundo Kim et al. (2015), quando um filme comestível é exposto à água, as ligações de hidrogênio que existem entre as cadeias poliméricas sofrem dissociação pela competição com as moléculas de água, resultando na sua dissolução. Para filmes de amido, tem sido relatada uma alta associação intermolecular, em especial, entre cadeias de amilose, o que lhe confere uma baixa solubilidade. No entanto, Matta Jr. et al. (2011) afirmam que a adição do glicerol influencia na solubilidade de filmes biopoliméricos de amido por interagir com a sua matriz, aumentando o espaço livre entre as cadeias e facilitando a entrada da água, o que, por consequência, também aumenta a solubilidade.

Assim, os filmes não diferiram entre si, mas apresentaram uma solubilidade considerável pela utilização do glicerol, na concentração trabalhada, sendo este fator

percebido quando comparados os dados obtidos na pesquisa com os relatados na literatura para o mesmo biopolímero. Vicentini (2003), por exemplo, em seu estudo sobre a elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita, apresentou filmes com solubilidade de 1,44%, sendo esse baixo valor justificado pela não incorporação do agente plastificante à composição. Resultados parcialmente semelhantes aos deste estudo foram obtidos por Oliveira et al. (2018) ao utilizar a concentração de glicerol a 20% em relação à massa seca da fécula de mandioca (2%) obtendo um percentual de solubilidade de 30,1% para a FM. No entanto, para amostras acrescidas de cera de abelha foi observada uma solubilidade significativamente menor dos filmes (26,4%).

É importante destacar que a incorporação do extrato hidroalcoólico de romã e da cera de abelha saponificada, nas condições e concentrações empregadas, não resultou em alterações de solubilidade dos filmes produzidos (Tabela 3).

Para a PVA, os valores variaram de 0,45 a 0,52 g.mm/h.Kpa.m², não sendo, de mesmo modo, as variações estatisticamente significativas (Tabela 3). Müller, Yamashita & Laurindo (2008) relacionam a PVA com a solubilidade da água na matriz do filme e concluíram que ambas as variáveis são afetadas pela umidade relativa do ar e o tipo e concentração do plastificante utilizado. Logo, a PVA sofre um aumento quanto maior a concentração do agente plastificante e com a umidade relativa do ar.

Desse modo, os valores obtidos para a PVA, assim como na solubilidade, também podem estar relacionados com o tipo de plastificante utilizado no estudo e a concentração, que foi a mesma para todos os filmes trabalhados, não resultando em diferenças entre estes, mas, possivelmente, tornando-os mais permeáveis.

Na avaliação colorimétrica dos filmes, a cromaticidade a* (teor de vermelho) foi estatisticamente menor para os filmes FMCA e FMERCA, com valores médios de -11,04 e -10,06, respectivamente, provavelmente pela presença da cera de abelha (Tabela 3), conferindo aos filmes uma menor tendência ao vermelho. A cromaticidade b*, que se refere ao teor de amarelo das amostras, revela que FMER e FMERCA foram equivalentes, obtendo valores de 22,54 e 22,42, na ordem anteriormente citada (Tabela 3). Esses valores se apresentam pela presença do extrato de romã que demonstrou, em trabalho de Caruzi et al. (2014), ser caracterizado pela coloração amarelada. Para a variável L, pôde ser observada uma variação com significância apenas para o FMERCA, que se mostrou semelhante também ao FMCA, com média de 84,56. Os demais filmes (FM, FMER e FMCA) não foram diferentes entre si (Tabela 3). A luminosidade consiste na capacidade de determinado objeto em refletir ou transmitir luz. Logo, quanto maior este índice, mais claro é o filme (ANDRADE et al., 2007).

No entanto, os valores médios menores da FMERCA e FMCA demonstraram a obtenção de amostras mais opacas, apesar da opacidade não ter se mostrado significativa entre as diferentes formulações. Os valores de opacidade para estes filmes foram de 43,85 e 44,03% (Tabela 3), respectivamente, ocorrendo, provavelmente, a interação da cera de modo específico com os compostos da fécula de mandioca, não ficando dispersa no sistema, uma vez que não interferiu na opacidade dos filmes, como destacado por Gontard et al. (1994) ao avaliarem a interação do éster diacetiltartárico dos monoglicéridos com as proteínas do glúten.

Resultados parcialmente diferentes aos encontrados neste estudo foram obtidos por Oliveira et al. (2018), ao realizar a caracterização dos filmes de fécula de mandioca e cera de abelha, onde a cromaticidade a^* não diferiu estatisticamente, assim como a luminosidade e a opacidade. A alteração foi notada apenas na cromaticidade b^* , com filmes compostos de fécula de mandioca e cera de abelha, significativamente, mais amarelos. Tais distinções podem ter sido resultantes da forma de incorporação da cera ao biopolímero, já que a proporção do lipídio em ambos os estudos foi a mesma. Na pesquisa citada utilizou-se o óleo de girassol saponificado como tensoativo, enquanto no trabalho em questão a cera foi submetida ao processo de saponificação, modificando, possivelmente, suas características pela utilização da alta temperatura.

Na Tabela 4, encontram-se descritos os valores obtidos na avaliação das propriedades mecânicas (tensão na ruptura, deformação e módulo de elasticidade) dos filmes biopoliméricos de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Tabela 4 – Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos na avaliação das propriedades mecânicas dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Variáveis	FM	FMER	FMCA	FMERCA
TR (MPa)	21,19 \pm 9,63 ^a	24,4 \pm 10,16 ^a	20,28 \pm 0,88 ^a	22,38 \pm 1,49 ^a
DE (%)	1,91 \pm 0,55 ^{ab}	1,55 \pm 0,28 ^b	1,69 \pm 0,22 ^b	2,3 \pm 0,14 ^a
ME (MPa)	1648,52 \pm 518,28 ^a	1648,34 \pm 403,39 ^a	1284,95 \pm 187,42 ^a	785,14 \pm 105,28 ^b

Legenda: FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. TR: tensão de ruptura; DE: deformação; ME: módulo de elasticidade. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Sobre a tensão na ruptura, que representa a resistência do filme ao alongamento até a ruptura (PASTOR et al., 2010), não foram observadas diferenças estatísticas entre os filmes avaliados, cujos valores mínimo e máximo foram de 20,28 a 24,4MPa, respectivamente (Tabela 4).

Os valores obtidos para o módulo de elasticidade ou de Young foram de 1648,52 (FM), 1648,34 (FMER), 1284,95 (FMCA) e 785,14MPa (FMERCA) (Tabela 4). Estatisticamente, os filmes FM, FMER e FMCA foram equivalentes, ocorrendo uma variação apenas no FMERCA. De modo prático, o FMERCA se apresentou mais elástico que os demais filmes, tendo em vista que quanto maior o módulo de Young, maior a rigidez do material e quanto menor, mais elástico (AMARAL, 2014).

A partir desses valores, pode se afirmar que a incorporação de aditivos não atuou de modo significativo na matriz do filme, uma vez que não foi capaz de reduzir a tensão na ruptura e o módulo de elasticidade, exceto para FMERCA, mas diminuindo o percentual de deformação dos filmes FMER e FMCA, tornando-os mais quebradiços (Tabela 4).

Os resultados foram semelhantes aos obtidos por Pastor et al. (2010), em seu trabalho sobre o efeito da incorporação de extrato hidroalcoólico de própolis nas propriedades do filme de hidroxipropilmetilcelulose, não existindo interferência deste sobre o módulo de elasticidade e a tensão de ruptura dos filmes, mas reduzindo a deformação com o seu aumento. Esse fato foi justificado pela distribuição dos diferentes constituintes na amostra, as interações entre eles e o estado físico do material.

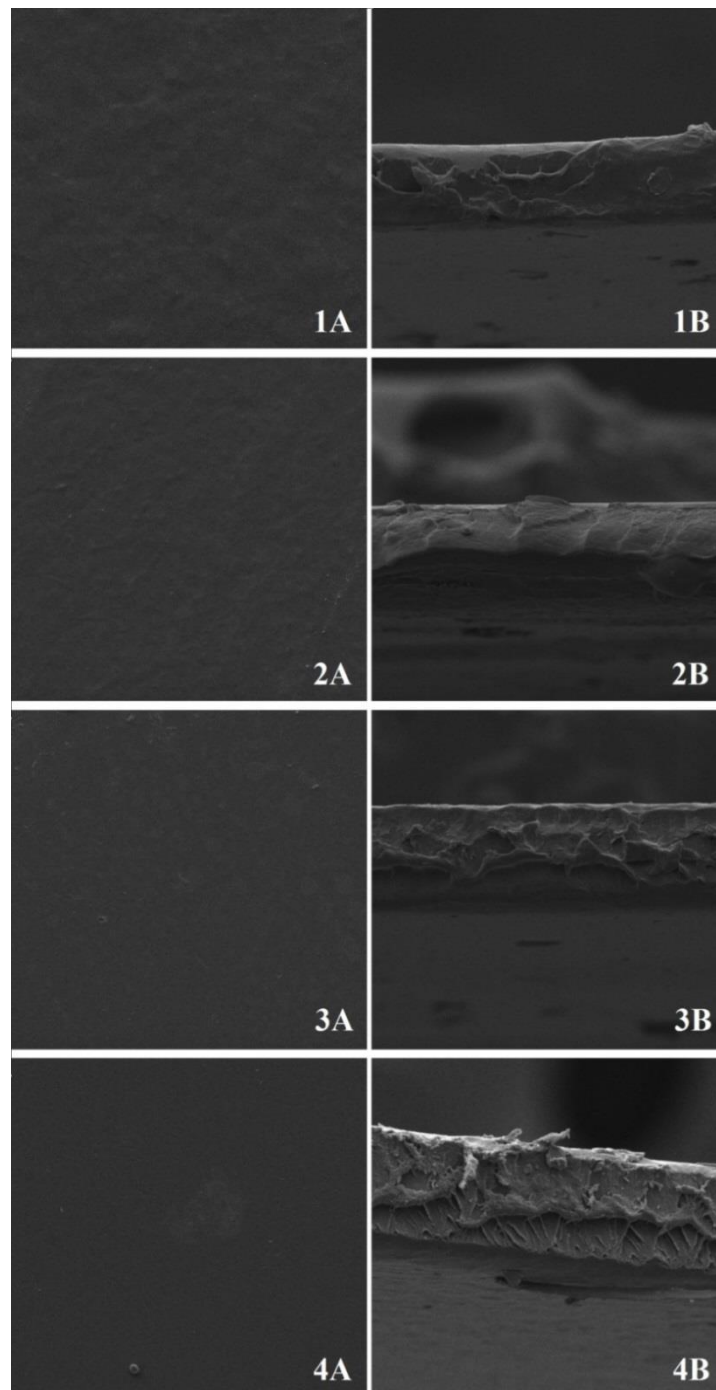
Trabalho de Oliveira et al. (2018) mostra uma variação significativa na tensão de ruptura e no módulo de elasticidade, e o aumento na deformação do filme pela aplicação da cera de abelha à matriz de fécula de mandioca, que pode ter sido atribuída à interação polímero-lipídio resultante da adição do tensoativo, diminuindo as forças de agregação da cadeia polimérica.

Sucintamente, o filme de FMERCA demonstrou-se como uma possibilidade de embalagem eficiente na conservação de alimentos, tendo em vista a sua maior resistência a quebra e flexibilidade, sendo justificada, possivelmente, pela interação entre o biopolímero e aditivos como o plastificante, lipídio e extrato (VILLADIEGO et al., 2005). Cuq, Gontard & Guilbert (1995) destacam que as ceras, apesar de conferirem melhores propriedades aos filmes biopoliméricos, apresentam problemas relacionados à estabilidade oxidativa. Isso pode ter sido evitado graças à ação da romã, rica em polifenóis compostos, que apresenta atividade antioxidante já bem relatada (NAVEENA et al., 2008; ENDO et al., 2010), conferindo então

uma maior estabilidade da cera na presença do composto natural (FMERCA) quando comparado aos filmes de FMCA.

Na Figura 11 encontram-se os resultados obtidos na avaliação dos filmes biopoliméricos por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura dos filmes comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, com dimensões de 50 μm e magnitude de 1Kx.



Legenda: 1A: superfície do filme FM; 1B: corte transversal do filme FM; 2A: superfície do filme FMER; 2B: corte transversal do filme FMER; 3A: superfície do filme FMCA; 3B: corte transversal do filme FMCA; 4A: superfície do filme FMERCA; 4B: corte transversal do filme FMERCA. FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Por meio da MEV, a microestrutura dos filmes foi avaliada, sendo observada uma homogeneidade na superfície, com ausência de partículas insolúveis a olho nu, falta de poros ou defeitos aparentes para FM e FMER, como também uma organização interna, sem irregularidades consideráveis e apresentando-se em monocamada (Figura 11 – 1A/B, 2A/B). Com isso, notou-se que a adição do extrato, na concentração testada, não interferiu na estrutura interna da matriz biopolimérica obtida pela fundição da fécula, garantindo a sua integridade estrutural. Dados parcialmente similares foram obtidos por Piñeros-Hernandez et al. (2017), em seu trabalho sobre a incorporação de extratos de alecrim em filmes de amido de mandioca, observando que as amostras controle (amido, glicerol e água destilada) apresentaram estrutura homogênea, enquanto os filmes com as diferentes concentrações do extrato aquoso (5 g, 10 g e 20 g) apresentaram rachaduras.

No entanto, para FMCA e FMERCA verifica-se a presença de algumas partículas sólidas, tanto na superfície quanto nos filmes em corte transversal (Figura 11 – 3A/B, 4A/B), o que pode ser atribuído, possivelmente, à presença da cera de abelha, apesar de menos aparente em FMCA.

Tais resultados relacionam-se aos obtidos para as propriedades mecânicas de FMCA e FMERCA, em especial, ao seu módulo de elasticidade, disponibilizando filmes mais flexíveis (Tabela 6) graças à descontinuidade gerada na matriz biopolimérica pela presença da cera, como observado por Jiménez et al. (2010). Ainda segundo o autor, o processo de secagem dos filmes promove mudanças estruturais, superficiais e/ou internas, por conta, por exemplo, das alterações nas concentrações dos componentes e na viscosidade da fase líquida (JIMÉNEZ et al., 2010).

Oliveira et al. (2018) confirmam os achados deste estudo, destacando a obtenção de uma estrutura biopolimérica livre de poros e contínua para os filmes de fécula de mandioca, e presença de aglomerados lipídicos, sendo observadas pequenas gotas pela micrografia, nos filmes incorporados de cera de abelha, não gerando, no entanto, irregularidades aparentes na sua superfície.

Trabalho de Auras, Arroyo & Selke (2009) concluiu que filmes produzidos pela utilização de cera de abelha apresentaram propriedades satisfatórias, sendo o lipídio considerado como um excelente aditivo na produção de estruturas estáveis de filmes biopoliméricos.

4.2 Avaliação da aceitação de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã

A Tabela 5 e a Figura 12 apresentam os resultados obtidos na avaliação sensorial do queijo tipo coalho com diferentes tratamentos (controle e com coberturas biopoliméricas de fécula de mandioca, extrato hidroalcoólico de romã e cera de abelha) pela adoção dos parâmetros de aparência, cor, sabor, textura, aceitação global e intenção de compra.

Tabela 5 - Valores de média \pm desvio padrão dos dados obtidos na análise sensorial de queijos tipo coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.

Variáveis	CO	FM	FMER	FMCA	FMERCA
Aparência	7,64 \pm 0,99 ^a	6,71 \pm 1,56 ^c	6,81 \pm 1,5 ^{bc}	7,04 \pm 1,56 ^{abc}	7,24 \pm 1,59 ^a
Cor	7,49 \pm 1,19 ^a	7,01 \pm 1,49 ^a	7,03 \pm 1,45 ^a	7,06 \pm 1,5 ^a	7,31 \pm 1,46 ^a
Sabor	7,56 \pm 1,46 ^a	6,96 \pm 1,41 ^{cd}	6,67 \pm 1,51 ^d	7,01 \pm 1,42 ^{bcd}	7,2 \pm 1,65 ^{ab}
Textura	7,71 \pm 1,22 ^a	7,12 \pm 1,26 ^{ab}	6,82 \pm 1,39 ^b	7,07 \pm 1,31 ^b	7,23 \pm 1,25 ^{ab}
Aceitação global	7,6 \pm 1,28 ^a	7,0 \pm 1,4 ^{ab}	6,7 \pm 1,54 ^b	7,17 \pm 1,3 ^{ab}	7,09 \pm 1,61 ^{ab}
Intenção de compra	4,29 \pm 0,93 ^a	3,7 \pm 1,0 ^{cd}	3,37 \pm 1,11 ^d	3,76 \pm 1,04 ^{bc}	4,03 \pm 1,04 ^{ab}

Legenda: CO: controle; FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na linha significam diferença estatística ($p < 0,05$).

Houve uma variação estatística do controle em relação aos tratamentos para alguns parâmetros estudados. Detalhadamente, para as variáveis “aparência”, “cor” e “aceitação global”, os tratamentos FM e FMER apresentaram médias inferiores as do CO, sendo, em maior parte, estatisticamente significativas, exceto para a “cor” e na aceitação da FM (Tabela 5).

A aparência do alimento e a sua coloração, interferem diretamente na aceitação ou rejeição do produto pelo consumidor, influenciando na aceitação global (OLIVEIRA, 2015).

Tal afirmação confirma os dados obtidos nesta pesquisa, que mostram essa relação entre os filmes FM e FMER e os parâmetros de avaliação.

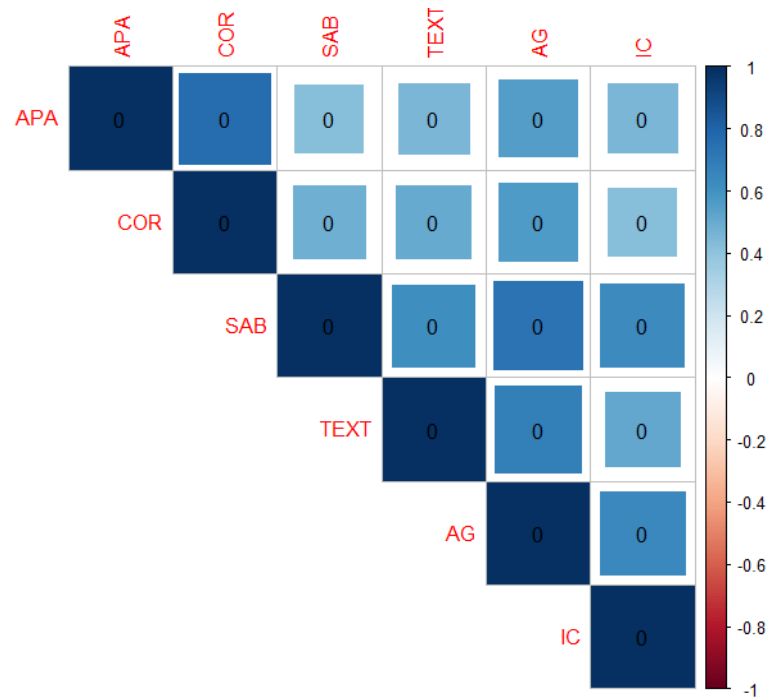
Para a variável “sabor”, a FMERCA se assemelha as amostras testemunha (CO) e FMCA, ocorrendo variação estatística entre as demais (Tabela 5). A característica sensorial é crucial na aplicação das coberturas comestíveis, resultante da combinação de diferentes componentes para sua formação, que devem se apresentar neutras, sem sabor característico, de modo a não interferir na aceitação final do alimento (CARVALHO, 1997).

Na avaliação da “textura”, nota-se que FMER e FMCA apresentaram médias diferentes do CO, enquanto os demais tratamentos apresentaram notas estatisticamente semelhantes. Na “intenção de compra”, o FMERCA foi o único tratamento que se mostrou similar ao controle. De modo geral, as peças de queijo com coberturas de FMERCA não diferiram estatisticamente da amostra controle, em nenhum dos atributos estudados, demonstrando sua boa aceitação sensorial (Tabela 5).

Trabalhos têm sido desenvolvidos com a finalidade de avaliar a aceitação sensorial de queijos recobertos, reforçando a aceitação das coberturas comestíveis utilizadas na conservação destes. Exemplo é o trabalho de Mei et al. (2015) sobre a utilização do revestimento comestível à base de quitosana-amido na vida útil do queijo Bod Ljong, no qual utilizou membros da equipe, treinados, na avaliação de atributos como aparência, textura, odor e sabor das amostras ao longo de 25 dias de armazenamento. Como resultado, observaram que no dia zero (após 12 horas a 4°C) de análise alguns parâmetros não diferiram estatisticamente dos queijos sem revestimento. Tavares et al. (2014) em seu estudo sobre a aplicação de coberturas comestíveis de alginato e óleos essenciais de alecrim e de orégano em ricota também não observaram uma variação entre os tratamentos e os atributos avaliados.

Para melhor explorar a relação existente entre os atributos sensoriais e a aceitação global das peças de queijo recobertas, construiu-se uma matriz de correlação, conforme apresentada na Figura 12.

Figura 12. *Heatmap* da correlação de Spearman entre os atributos sensoriais do queijo tipo coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha.



Legenda: As cores da barra da escala denotam a natureza da correlação (1 – indica um resultado perfeitamente positivo (azul escuro); -1 – indica uma correlação perfeitamente negativa (vermelho escuro)). Correlações fortes são indicadas por quadrados grandes, enquanto correlações fracas são indicadas por quadrados pequenos. Valores no centro do quadrado representam o *P*-valor.

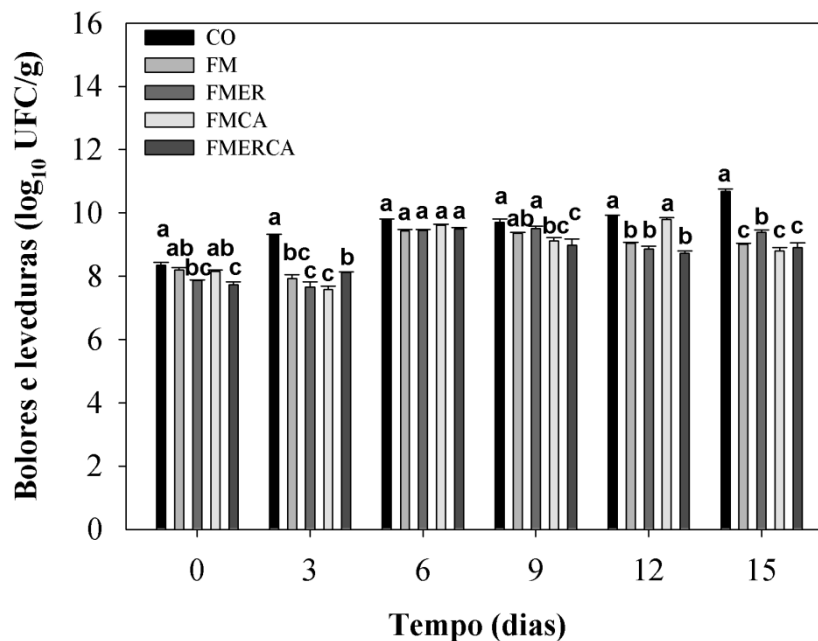
A forte correlação positiva observada entre “aparência” e “cor” é um indicativo de que a satisfação com a aparência do queijo é, seguramente, influenciada pela cor do produto. A ausência de diferença significativa entre os tratamentos e o CO para a “aceitação global”, exceto para FMER (Tabela 5), e a forte correlação positiva entre o “sabor” com a “aceitação global” (Figura 12), mostram que as coberturas comestíveis não alteraram os aspectos característicos do queijo tipo coalho, obtendo índices de aprovação semelhantes ao queijo não tratado.

4.3 Avaliação de aspectos qualitativos de queijo tipo coalho recoberto com coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã estocados em refrigeração

4.3.1 Análises microbiológicas

Os resultados das avaliações de bolores e leveduras e bactérias aeróbias mesófilas, para os diferentes tratamentos, em função do tempo de armazenamento, são mostrados nos Gráficos 1 e 2, respectivamente.

Gráfico 1. Avaliação de bolores e leveduras em queijos de coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, e estocados sob refrigeração durante quinze dias.



Legenda: CO: controle; FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

As contagens iniciais de bolores e leveduras foram de 8,36 (CO), 8,20 (FM), 7,87 (FMER), 8,15 (FMCA) e 7,74 (FMERCA) \log_{10} UFC/g. Com o armazenamento, após 15 dias de estocagem, observou-se um aumento progressivo nas contagens, atingindo os valores de 10,69, 9,01, 9,38, 8,81 e 8,91 \log_{10} UFC/g, respectivamente (Gráfico 1).

Estatisticamente, observa-se que no dia zero (aproximadamente 24 horas após o final do processamento) apenas os tratamentos FMER e FMERCA foram diferentes do CO, com médias relativamente menores. No primeiro momento, os resultados podem estar associados ao potencial antifúngico da romã, relatado em trabalhos como o de Degáspari & Dutra (2011), Santos, Pereira & Nóbrega (2014) e Santos et al. (2017), principalmente pela presença de fenóis, taninos e flavonóides (DAHAM et al., 2010). Mei et al. (2015) destacam que os

fungos são mais sensíveis aos compostos fenólicos e isso se deve às propriedades da sua parede celular, que se apresenta menos complexa que a de micro-organismos Gram-negativos.

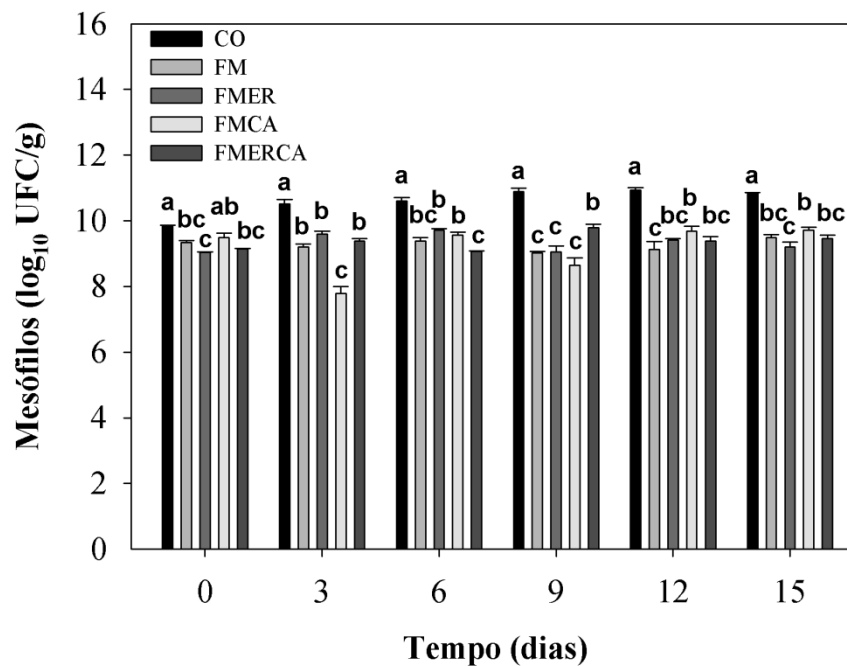
No entanto, aos seis dias de estocagem refrigerada não foi constatada diferença significativa na contagem de bolores e leveduras entre controle e tratamentos. De modo prático, observa-se que as amostras começaram a apresentar um padrão a partir do dia nove de análise, no qual o FMERCA encontra-se estatisticamente diferente do CO e se mantém assim até o dia 15. Além deste, o FMER também apresenta uma atividade satisfatória, mas apenas nos dias 12 e 15 (Gráfico 1).

Assim, estes resultados estão, possivelmente, associados à aplicação das coberturas, tendo em vista que não houve uma ação de destaque entre os tratamentos ao longo dos dias, mas uma redução em comparação ao grupo CO. Isso se deve, de modo provável, às boas propriedades de barreira ao oxigênio da fécula de mandioca (MALI; GROSSMANN; YAMASHITA, 2010), o que pode ter dificultado o crescimento dos bolores aeróbios, mas não de leveduras (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008).

A avaliação do grupo fúngico é essencial, tendo em vista que os bolores são micro-organismos capazes de provocar alterações sensoriais no queijo, levando, por conseguinte, a perdas de ordem econômica. De mesmo modo as leveduras, que comprometem o produto antes mesmo do aparecimento de colônias visíveis (ZACARCHENCO et al., 2011).

No Gráfico 2 encontram-se distribuídos os resultados obtidos na avaliação bacteriológica dos queijos tipo de coalho controle e com coberturas comestíveis.

Gráfico 2. Avaliação de bactérias aeróbias mesófilas em queijos de coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, e estocados sob refrigeração durante quinze dias.



Legenda: CO: controle; FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Na contagem de bactérias aeróbias mesófilas, os valores iniciais obtidos foram: 9,86 (CO), 9,35 (FM), 9,04 (FMER), 9,49 (FMCA) e 9,14 (FMERCA) \log_{10} UFC/g. Após os 15 dias em refrigeração, as contagens passaram a 10,84 (CO), 9,49 (FM), 9,21 (FMER), 9,71 (FMCA) e 9,46 (FMERCA) \log_{10} UFC/g (Gráfico 2).

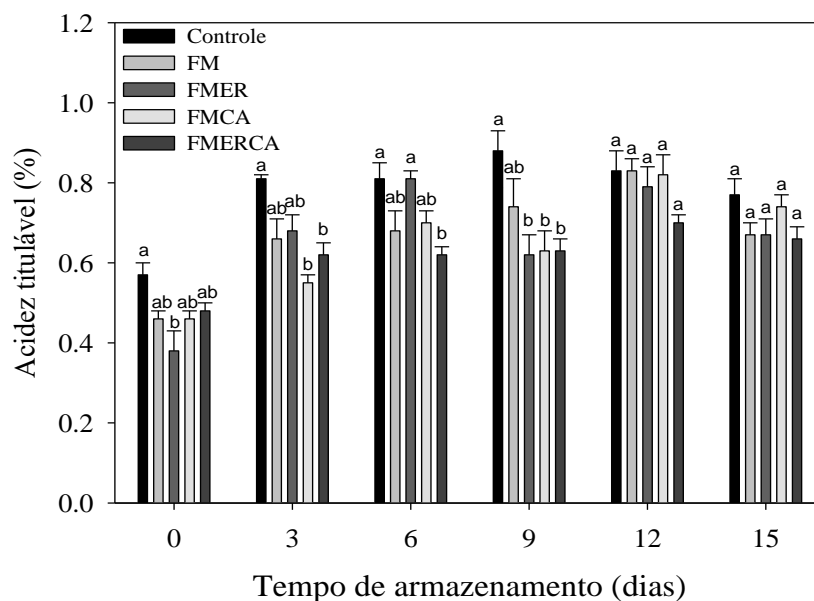
De modo geral, observa-se que os tratamentos foram estatisticamente diferentes do CO em todos os dias de avaliação, exceto o FMCA no dia zero. Tal dado demonstra o potencial de conservação das coberturas aplicadas no queijo de coalho frente ao grupo de bactérias estudado (Gráfico 2). Na ocasião, observa-se a possível formação de um ambiente com menor teor de oxigênio, mantendo-se durante a estocagem do produto. Como consequência, a contagem desses micro-organismos foi significativamente reduzida. Essa atividade pode ser devida à presença da fécula de mandioca como base à composição de todos os tratamentos, que apresenta uma importante propriedade de barreira graças à sua baixa permeabilidade ao oxigênio, como destacado por Chiumarelli et al. (2010) e Luvielmo & Lamas (2012).

Além de indicar a qualidade sanitária do alimento e o grau de comprometimento das suas características organolépticas, a avaliação de bactérias aeróbias mesófilas é essencial para aferir sobre a segurança do mesmo, uma vez que a maior parte das bactérias patogênicas de origem alimentar está inserida neste grupo (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

4.3.2 Análises físico-químicas

Os dados obtidos para as análises físico-químicas do queijo coalho e seus tratamentos correspondentes encontram-se dispostos nos Gráficos 3, 4 e 5.

Gráfico 3. Avaliação da acidez titulável em queijos de coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, e estocados sob refrigeração durante quinze dias.



Legenda: FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

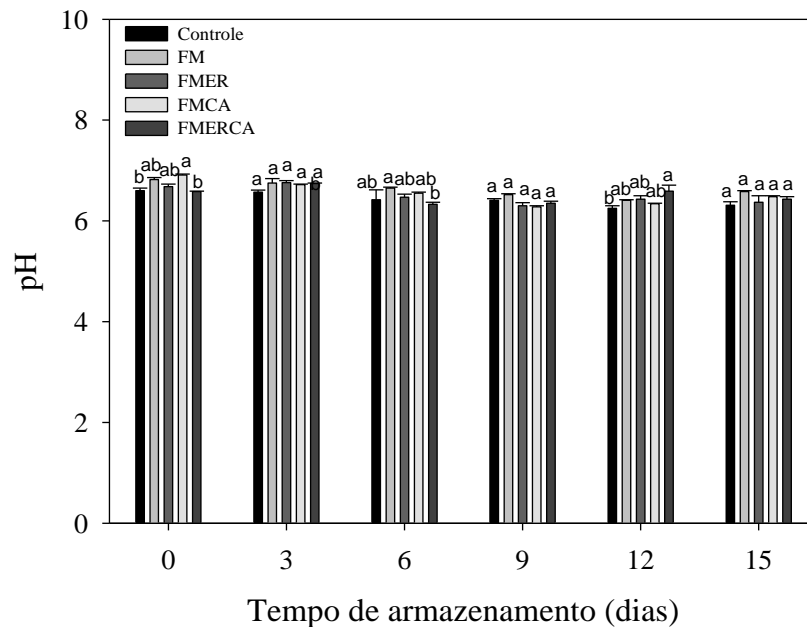
Houve efeito significativo de algumas coberturas utilizadas em relação ao CO, no parâmetro de acidez titulável, ao longo da estocagem refrigerada dos queijos tipo coalho. Avaliando-se os grupos por dias de armazenamento, uma variação estatística ao nível de 5% de probabilidade no teste de Tukey pôde ser observada nos tratamentos FMER, FMCA e FMERCA, ao longo dos nove primeiros dias. No dia nove, os tratamentos FMCA e FMERCA reduziram, significativamente, em 28,41% a acidez, enquanto FMER reduziu em 29,55% quando comparados à amostra CO, que apresentou uma tendência de média mais elevada em todos os dias de avaliação, para todos os tratamentos, não sendo estatisticamente relevante após doze dias de análise (Gráfico 3).

Esse aumento do CO ao longo dos dias pode ser explicado, possivelmente, pelo acúmulo de produtos de degradação de lactose (YILMAZ; DAGDEMIR, 2012) por bactérias, já que muitas são capazes de fermentar a lactose a ácido lático. De modo prático, pode ser atribuído à atividade microbiana durante a vida de prateleira do queijo, resultando em uma acidez excessiva, além de alterações das propriedades reológicas e organolépticas do produto (MADERA et al., 2003). Dessa forma, é possível afirmar que as coberturas apresentaram diferentes respostas ao longo dos dias de armazenagem, mas aquelas com presença de extrato de romã e cera de abelha na formulação forneceram uma proteção aos queijos pela redução de micro-organismos até o nono dia. Neste último caso, a ação antimicrobiana da cera de abelha foi evidenciada por Kacániová et al. (2012) ao produzir o extrato e testar, *in vitro*, contra diferentes espécies microbianas. Chen (1995) relata em seu estudo que filmes a base de polissacarídeos possuem a capacidade de manter uma alta concentração de componentes antioxidantes ou antimicrobianos na superfície de alimentos. A partir do dia doze ocorreu a equivalência entre a acidez do CO com as demais amostras.

Trabalho de Pagani et al. (2012), sobre a influência da aplicação de revestimentos comestíveis a base de parafina, açafão e fucsina na vida de prateleira do queijo de coalho, confirma os dados obtidos na pesquisa, mostrando valores estatisticamente inferiores de acidez em comparação ao controle quando utilizada a parafina com o maior tempo de submersão, concluindo que os revestimentos com açafão e a fucsina são úteis na conservação do alimento, uma vez que promovem também um efeito antibacteriano. No entanto, Yilmaz & Dagdemir (2012) em seu estudo sobre a utilização da cera de abelha sobre os parâmetros qualitativos do queijo Kashar durante a maturação, demonstraram que a acidez titulável dos queijos aumentou linearmente durante os primeiros dois meses em todas as amostras, ocorrendo uma equivalência dos tratamentos ao final do período de maturação.

Os dados para a acidez total titulável, encontram-se, em parte, relacionados aos obtidos para as análises microbiológicas, relatados nos Gráficos 1 e 2.

Gráfico 4. Avaliação do pH de queijos de coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, e estocados sob refrigeração durante quinze dias.



Legenda: FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

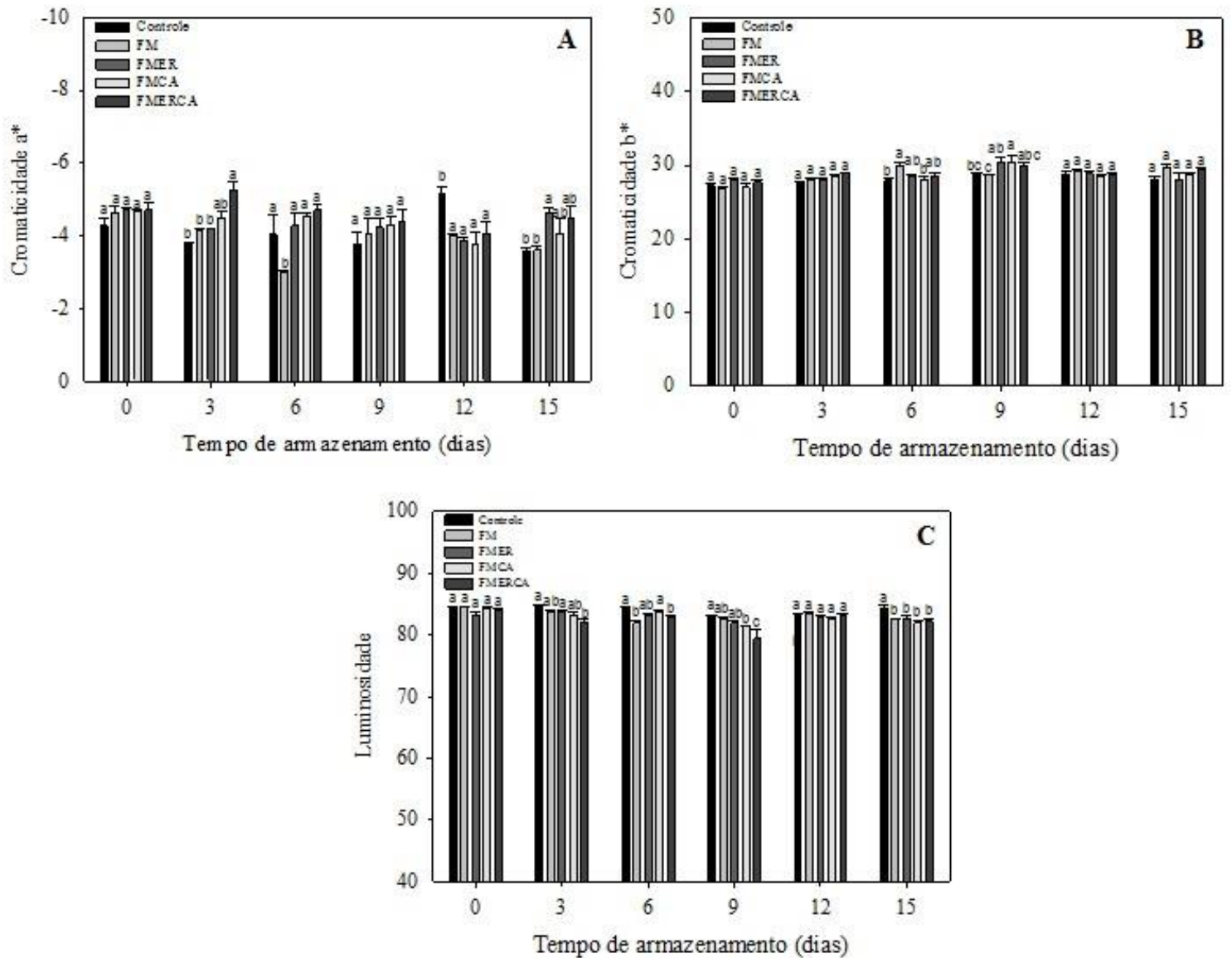
Na avaliação de pH, os valores médios no dia zero foram de 6,599 (CO), 6,818 (FM), 6,674 (FMER), 6,905 (FMCA) e 6,574 (FMERCA). Ao final dos 15 dias, os valores chegaram a 6,313, 6,583, 6,373, 6,485 e 6,426 para os respectivos tratamentos (Gráfico 4). A partir da observação dos resultados, uma relação parcial com os dados obtidos para a acidez total titulável (Gráfico 3) pode ser construída. Assim, os maiores valores de acidez no CO resultaram em menores de pH (MADERA et al., 2003), não apresentando, no entanto, um efeito claro e significativo ao longo dos dias de estocagem sob refrigeração (Gráfico 4).

Resultado parcialmente semelhante ao encontrado neste estudo foi obtido por Di Pierro et al. (2011), em seu trabalho com revestimento ativo de quitosana e soro do leite em ricota, não observando diferenças no pH dos queijos controle e revestidos ao longo de 30 dias em armazenamento. Estudo de Pagani et al. (2012), ao utilizar uma solução alcoólica de Fucsina e Açafrão como cobertura de queijo coalho, bem como de parafina, obteve níveis de pH estatisticamente mais altos que o controle em ambos os dias de avaliação.

Apesar dos resultados obtidos na pesquisa, é sabido que o pH é um fator importante para atestar sobre a qualidade de queijos, já que influencia diretamente na aceitação do seu sabor, textura e na atividade microbiana (SOUSA et al., 2014). Segundo Pinto et al. (2016), o

pH se configura como um atributo relacionado ao crescimento microbiano, inclusive de patógenos, pois o seu controle limita este potencial.

Gráfico 5. Avaliação da cor de queijos de coalho com diferentes coberturas comestíveis a base de fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha, e estocados sob refrigeração durante quinze dias.



Legenda: FM: fécula de mandioca; FMER: fécula de mandioca e extrato de romã; FMCA: fécula de mandioca e cera de abelha; FMERCA: fécula de mandioca, extrato de romã e cera de abelha. A: cromaticidade a*; B: cromaticidade b*; C: luminosidade. Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

No Gráfico 5 encontram-se os dados referentes à avaliação colorimétrica dos filmes biopoliméricos, sendo os resultados expressos como cromaticidades a* e b* e luminosidade.

Realizando a avaliação por dias de armazenamento, observou-se que na cromaticidade a^* , de modo geral, o tratamento FMERCA se apresentou relativamente mais vermelho que os demais, possivelmente pela presença do extrato de romã combinado com a cera de abelha (Gráfico 5A). Para a cromaticidade b^* , os valores obtidos nos diferentes tratamentos não foram estatisticamente significativos, mostrando a manutenção da coloração do queijo (Gráfico 5B). Para a luminosidade, o tratamento FMERCA apresentou uma variação estatística com relação ao controle, mantendo o padrão durante, praticamente, todo o período de análise, exceto aos dias zero e doze (Gráfico 5C). Tais valores vão de encontro com os obtidos na Tabela 5, na caracterização da cor dos filmes biodegradáveis, apresentando as amostras uma tendência maior à opacidade.

Os achados desta pesquisa mostram que a aplicação das coberturas no queijo de coalho, ao longo dos dias, não interferiu negativamente na sua coloração (Gráfico 5). Os valores obtidos no dia zero para as três variáveis estão relacionados com os dados relatados na Tabela 5, não existindo alteração na cor das peças de queijo, de acordo com os provadores voluntários. De modo geral, estes dados são úteis, uma vez que propriedades sensoriais neutras são essenciais à aplicação de coberturas comestíveis, já que estas, além de estender a vida útil do alimento, precisam também não interferir na sua qualidade (FAKHOURI et al., 2007). Carvalho (1997) confirma esta afirmação, mas destaca que as características sensoriais dependem da aplicação, sendo a cor, em alguns casos, particularmente interessante. Além disso, o estudo apresenta informações complementares e parcialmente encontradas na avaliação, como a maior opacidade das formulações contendo lipídios.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na caracterização dos filmes a base de fécula de mandioca, cera de abelha e extrato de romã, nas concentrações e condições empregadas, não foram observadas diferenças significativas entre as amostras, exceto nos parâmetros de cor, microestrutura e propriedades mecânicas. Quanto às coberturas, estas se mostraram como uma alternativa na conservação de parâmetros de qualidade do queijo tipo coalho, não afetando negativamente a aceitação sensorial desse alimento, mantendo as suas características físico-químicas e, ao mesmo tempo, apresentando efeito antimicrobiano frente aos micro-organismos estudados. Destaca-se que, dos tratamentos aplicados, os melhores resultados foram obtidos com a combinação dos três componentes de pesquisa: fécula de mandioca, extrato hidroalcoólico de romã e cera de abelha.

REFERÊNCIAS

- ABIQ. **Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. 2017. Disponível em: <
<http://www.abiq.com.br/default.asp>>. Acesso em: 24 de setembro de 2018.
- ALSAGGAF, M. S.; MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A. Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia fillets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 499–505, 2017.
- AMARAL, F. G. **Desenvolvimento de filme comestível a base de fécula de açafrão (*Curcuma longa* L.) e lipídios**. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Goiás. 2014.
- ANDRADE, A. A. et al. Medidas instrumentais de cor e textura em queijo de coalho. In: 15° Congresso LatinoAmericano de Analistas de Alimentos, 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: LACEN, 2007.
- ARAÚJO, M. C. G. et al. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de currais novos. **Holos**, v. 4, 2009.
- ARAÚJO, J. B. C. et al. Produção Artesanal de Queijo Coalho, Ricota e Bebida Láctea em Agroindústria Familiar: Noções de Boas Práticas de Fabricação. Embrapa, Brasília – DF, 2012.
- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.
- ASTM D882-91 (1996). Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Annual Book of Standards.
- AURAS, R.; ARROYO, B.; SELKE, S. Production and Properties of Spin-Coated Cassava Starch-Glycerol-Beeswax Films. **Starch**, v. 61, n. 8, p. 463–471, 2009.

AZEVÊDO, L. C. et al. Propriedades do amido e suas aplicações em biopolímeros. **Cadernos de Prospecção**, v. 11, Edição Especial, p. 351-358, 2018.

AYDIN, F.; KAHVE, H. I.; ARDIC, M. Lipid Based Edible Films. **Journal of Scientific and Engineering Research**, v. 4, n. 9, p. 86-92, 2017.

BARROS, D. M. et al. Aspectos do queijo de coalho com ênfase na importância das Boas Práticas de Fabricação no sistema de produção. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 1, p. 67-93, 2019.

BATISTA, J. A.; TANADA-PALMU, P. S.; GROSSO, C. R. F. Efeito da adição de ácidos graxos em filmes a base de pectina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 781-788, 2005.

BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2011.

BERTUZZI, M. A. et al. Water vapor permeability of edible starch based films. **Journal of Food Engineering**, v. 80, p. 972–978, 2007.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218-225, 2014.

BORGES, M. F. et al. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BOURTOOM, T.; CHINNAN, M. S. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 1633-1641, 2008.

BRANCO, M. A. A. C. et al. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 393-408, 2003.

BRANDELERO, R. P. H.; GROSSMANN, M. V.; YAMASHITA, F. Hidrofilicidade de Filmes de Amido/Poli(Butileno Adipato Co-Tereftalato) (Pbat) Adicionados de Tween 80 e Óleo de Soja. **Polímeros**, v. 23, n. 2, p. 270-275, 2013.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de Março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 11 de março de 1996.

BRASIL. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa, Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga**. Diário Oficial da União, Brasília - DF, 16 de julho de 2001.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, Brasília – DF, 18 de setembro de 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 263 de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos**. Diário Oficial União, Brasília, 2005.

BRASIL. Resolução 466, de 12 de dezembro de 2012. **Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos**. Diário Oficial da União, Brasília - DF, 13 de junho de 2013.

BRITO, G. F. et al. Biopolímeros, polímeros biodegradáveis e polímeros verdes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.6, n. 2, p. 127-139, 2011.

CARVALHO, R. A. **Desenvolvimento e caracterização de biofilmes a base de gelatina**. 1997. 128f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

CARUZI, B. B. et al. Avaliação do extrato de romã (*Punica Granatum*) como corante natural. In: 2º Congresso Científico Têxtil e de Moda, 2014, São Paulo. **Anais...** São Paulo: CONTEXMOD, 2014.

CHEN, H. Functional properties and applications of edible films made of milk proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2563-2583, 1995.

CHIUMARELLI, M. et al. Cassava starch coating and citric acid to preserve quality parameters of fresh-cut “Tommy Atkins” mango. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, 2010.

CHIUMARELLI, M.; HUBINGER, M. D. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 20-27, 2014.

COSTA, T. L. E. et al. Avaliação de coberturas comestíveis compostas por quitosana e argila no revestimento em tomates sob refrigeração pelo método *dipping*. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 5, p. 12-19, 2012.

CUQ, B.; GONTARD, N.; GUILBERT, S. Edible films and coatings as active layers. In: ROONEY, M.L. (Ed.) *Active food packaging*, London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 111-142.

DAHAM, S. S. et al. Studies on Antibacterial and Antifungal Activity of Pomegranate (*Punica granatum* L.). **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 9, n. 3, p. 273-281, 2010.

DAMACENO, M. N. et al. Aplicação de nisina como revestimento comestível em queijo coalho. **Revista Saúde e Ciência**, v. 3, n. 3, p. 297-304, 2014.

DAVANÇO, T.; TANADA-PALMU, P.; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, 2007.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras: materiais poliméricos, metálicos e semicondutores, EDIPUCRS, Porto Alegre (2007).

DEGÁSPARI, C. H.; DUTRA, A. P. C. Propriedades fitoterápicas da romã (*Punica granatum* L.). **Visão Acadêmica**, v.12, n.1, 2011.

DÍAZ, L.; REALES, J.; TORRES, C. Measurement of the transmittance of edible films of Aloe vera (*Barbadensis miller*) and cassava starch using optical fibers trifurcated. **Journal of Physics: Conference Series**, 2017.

Di PIERRO, P. et al. Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2324-2327, 2011.

ENDO, E. H. et al. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 534-540, 2010.

FAKHOURI, F. M. et al. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatina na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 369-375, 2007.

FARIA, F. O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, 2012.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, 2003.

FERNANDES, A. P. S. et al. Aplicação de filmes biodegradáveis produzidos a partir de concentrado proteico de soro de leite irradiado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 45, n. 2, p. 192-199, 2015.

FIB - Food Ingredients Brasil. Dossiê enzimas: A evolução das enzimas coagulantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 16, 2011a.

FIB - Food Ingredients Brasil. Dossiê conservantes: Conservantes. **Food Ingredients Brasil**, n. 18, p. 29-51, 2011b.

FIB - Food Ingredients Brasil. Os lipídios e suas principais funções. **Food Ingredients Brasil**, n. 37, p. 55-61, 2016.

FIORDA, F. A. et al. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2008. São Paulo: Ateneu, 182p.

FRAZIER, R. A. Química de alimentos. In: CAMPBELL-PLATT, G. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Barueri, SP: Manole, 2015.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, p.39-50, 1994.

GORRASI, G. et al. Active coating for storage of Mozzarella cheese packaged under thermal abuse. **Food Control**, 64, p. 10–16, 2016.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmes biodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HIJAZIN, C. A. H.; SIMÕES, A. T.; SILVEIRA, D. R. Hidrólise ácida, alcalina e enzimática. **Revista Atitude - Faculdade Dom Bosco de Porto Alegre**, ano IV, n. 7, 2010.

HMID, I. et al. Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Morocco. **Arabian Journal of Chemistry** (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.011>.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020p.

JIMÉNEZ, A. et al. Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 585–593, 2010.

KACANIOVÁ, M. et al. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. **Archives of Biological Science**, v. 64, n. 3, p. 927-934, 2012.

KIM, S. R. B. et al. Improvement of water solubility and humidity stability of tapioca starch film by incorporating various gums. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, p. 475-482, 2015.

LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Métodos de conservação de alimentos. **Revista Saúde em Foco**, Edição nº 10, 2018.

LEVINE, D. M.; BERENSON, M. L.; STEPHAN, D. **Estatística: Teoria e Aplicações usando Microsoft Excel em Português**. Rio de Janeiro: LTC, 2000.

LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 1, p. 8-15, 2012.

MADERA, C. et al. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E.; YAMASHITA, F. Filmes de amido: produção, propriedades e potencial de utilização. **Semina Agrárias**, Londrina, v.31, n.1, p.137-156, 2010.

MANGUEIRA, T. F. B.; TRAVASSOS, A. E. R.; MOREIRA, R. T. Teste de aceitabilidade sensorial de queijo de coalho com baixo teor de gordura e enriquecido com ferro. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 279-290, 2002.

MATTA JR., M. D. et al. Propriedades de barreira e solubilidade de filmes de amido de ervilha associado com goma xantana e glicerol. **Polímeros [online]**, v. 21, n. 1, p. 67-72, 2011.

MEI, J. et al. Evaluation of Chitosan-Starch-Based Edible Coating To Improve the Shelf Life of Bod Ljong Cheese. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 7, p. 1327–1334, 2015.

MENDES, B. G. et al. Qualidade e rendimento da mussarela em tempos de armazenamento sob refrigeração da massa acidificada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 9, n. 1, p. 1744-1756, 2015.

MIOT, H. A. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.10, n.4, p. 275-8, 2011.

MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, p. 565–570, 2005.

MOREIRA, G. M. B. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolados de leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.7, 2014.

MÜLLER, C. M. O.; YAMASHITA, F.; LAURINDO, J. B. Evaluation of the effects of glycerol and sorbitol concentration and water activity on the water barrier properties of cassava starch films through a solubility approach. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 82–87, 2008.

- NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de Coalho. Coleção Agroindústria Familiar. **EMBRAPA**, Informação Tecnológica, v. 1, p. 40, 2006.
- NAVARRO-TARAZAGA, M. L.; SOTHORNVIT, R.; PÉREZ-GAGO, M. B. Effect of Plasticizer Type and Amount on Hydroxypropyl Methylcellulose–Beeswax Edible Film Properties and Postharvest Quality of Coated Plums (Cv. Angeleno). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 9502–9509, 2008.
- NAVEENA, B. M. et al. Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. **Meat Science**, v. 80, p. 1304–1308, 2008.
- NOGUEIRA, A. N. et al. Avaliação de métodos de incorporação de fase lipídica em filmes de fécula de mandioca. In: Simpósio de Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2018, Mossoró. **Anais...** Mossoró: SIMPATS, 2018, p. 454-459.
- OLIVEIRA, T. F. M. **Evolução ao longo do tempo de vida útil do teor microbiológico de queijos frescos mantidos sob refrigeração doméstica**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.
- OLIVEIRA, P. G. **Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes***. 2015. 121 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão. 2015.
- OLIVEIRA, V. R. L. et al. Use of biopolymeric coating hydrophobized with beeswax in post-harvest conservation of guavas. **Food Chemistry**, v. 259, p. 55–64, 2018.
- ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, vol. 2, 2005.
- PAGANI, A. A. C. et al. Aplicação de biopelículas pigmentadas em queijo de coalho. **Revista GEINTEC**, v. 3, n. 1, p.41-47, 2012.

- PAGLIARULO, C. et al. Inhibitory effect of pomegranate (*Punica granatum* L.) polyphenol extracts on the bacterial growth and survival of clinical isolates of pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Food Chemistry** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.028>.
- PARETA, R.; EDIRISINGHE, M. J. A novel method for the preparation of starch films and coatings. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 425–431, 2006.
- PASCALL, M. A.; LIN, S. J. The application of edible polymeric films and coatings in the food industry. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 4, n. 2, 2013.
- PASTOR, C. et al. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, v.82, n.4, p.1174-1183, 2010.
- PERANOVICH, D. S. et al. Eficiência de três métodos na extração e purificação da cera apícola. **PUBVET**, v. 3, n. 13, 2009.
- PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids** (2017). doi: 10.1016/j.foodhyd. 2016.09.034.
- PINHEIRO, A. C. et al. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. **Boletim de Biotecnologia**, 2010.
- PINTO, M. S. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros- MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 1, p. 43-52, 2016.
- QUEIROZ, M. R. A. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, supl. I, p. 737-743, 2014.

R DEVELOPMENT CORE TEAM, R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018.

RIBEIRO, W. X. et al. Characterization of biodegradable film based on zein and oleic acid added with nanocarbonate. **Ciência Rural**, v. 45, n. 10, p. 1890-1894, 2015.

ROCHA, G. O. et al. Filmes compostos biodegradáveis a base de amido de mandioca e proteína de soja. **Polímeros**, v. 24, n. 5, p. 587-595, 2014.

SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. Contagem de mesófilos e psicrotrofos em amostras de leite pasteurizado e UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, p. 29-35, 2010.

SANTOS, B. M. et al. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011.

SANTOS, M. G. C.; PEREIRA, J. V.; NÓBREGA, D. R. M. Potencial antifúngico da *Punica granatum* Linn na odontologia. **Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 1, p. 112-117, 2014.

SANTOS, L. A. et al. Avaliação da atividade de *Punica granatum* Linnaeus contra *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina e ação anti-inflamatória “*in vivo*”. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 1, p. 775-784, 2014.

SANTOS, M. G. C. et al. *Punica granatum* Linn. prevenção da candidíase oral em pacientes submetidos a tratamento antineoplásico. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 46, n. 1, 2017.

SAURABH, C. K. et al. Effect of addition of nanoclay, beeswax, tween-80 and glycerol on physicochemical properties of guar gum films. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 109–118, 2016.

SHAYGANNIA, E. et al. A Review Study on *Punica granatum* L. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 21, n. 3, p. 221-227, 2016.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

ŠILER, B. et al. Centauries as underestimated food additives: Antioxidant and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 147, p. 367–376, 2014.

SILVA, E. M. B. et al. Utilização de cera de abelhas na determinação da densidade do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 955-959, 2003.

SILVA, F. I.; CABELLO, C.; PEREIRA, A. C. B. Adaptação da técnica da cromatografia de permeação em gel para determinar os tamanhos das moléculas dos biopolímeros de amidos. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v. 1, p. 1-8, 2005.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, B. T. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato de *Punica granatum* L. sobre *Staphylococcus aureus* isolado em leite bovino. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 974-984, 2013.

SILVA, G. L. et al. Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, n.01: p. 2613-2626, 2018.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 6, p. 1-14, 2000.

SOUSA, A. Z. B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

SOUSA, S.; COSTA, G. F. Biopolímeros comestíveis à base de fécula de mandioca e amido de milho na conservação de queijo de coalho. *Anais do Simpósio Latino Americano de Ciências de Alimentos*, v. 2, 2015.

SPADOTI, L. M.; DORNELLAS, J. R. F.; ROIG, S. M. Avaliação sensorial de queijo prato obtido por modificações do processo tradicional de fabricação. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 705-712, 2005.

STONE, H.; BLEIBAUM, R. N. Avaliação sensorial. In: CAMPBELL-PLATT, G. (Ed.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri, SP: Manole, 2015. p. 289–309.

TAVARES, F. O. et al. Cobertura comestível adicionada de óleos essenciais de orégano e alecrim para uso em ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p. 249-257, 2014.

TONGDEESOONTORN, W. et al. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. **Chemistry Central Journal**, 2011.

VICENTINI, N. M. **Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita**. 2003. 216f. Tese (Doutor em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

VILLADIEGO, A. M. D. et al. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v.52, n.300, p.221-244, 2005.

WEI, T.; SIMKO, V. Corrplot: Visualization of a Correlation Matrix. Disponível em <https://cran.r-project.org/web/packages/corrplot/index.html>. R package version 0.84, elaborado em 2017.

YANGILAR, F. Chitosan/whey protein (CWP) edible films efficiency for controlling mould growth and on microbiological, chemical and sensory properties during storage of Göbek Kashar cheese. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 35, n. 2, p. 216-224, 2015.

YILMAZ, F.; DAGDEMIR, E. The effects of beeswax coating on quality of Kashar cheese during ripening. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 2582–2589, 2012.

ZACARCHENCO, P. B. et al. Bolores e Leveduras em Queijos. **TecnoLat-Expresso**, Ano II, n. 8, p. 92-99, 2011.

ZAVAREZE, E. R. et al. Filmes biodegradáveis à base de proteínas miofibrilares de pescado. **Brazilian Journal of Food Technology**, IV SSA, p. 53-57, 2012.

ZHAO, Y.; TEIXEIRA, J. S.; GÄNZLE, M. M.; SALDAÑA, M. Development of Antimicrobial Films Based on Cassava Starch, Chitosan and Gallic Acid Using Subcritical Water Technology. **The Journal of Supercritical Fluids** (2018).

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.010>

ANEXO A

FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL:

Data: ___/___/___

Faixa etária: até 20 anos () até 30 anos () acima de 30 anos ()

1) Você está recebendo cinco amostras codificadas de queijo tipo coalho. Avalie-as, da esquerda para a direita, utilizando a escala abaixo.

- 9-Gostei muitíssimo
8-Gostei muito
7-Gostei moderadamente
6-Gostei ligeiramente
5-Não gostei, nem desgostei
4-Desgostei ligeiramente
3-Desgostei moderadamente
2-Desgostei muito
1-Desgostei muitíssimo

AMOSTRA	APARÊNCIA	COR	SABOR	TEXTURA	ACEITAÇÃO GLOBAL
231					
502					
176					
354					
290					

2) Se o produto estivesse à venda, você o compraria?

- 5 – Certamente compraria
4 – Provavelmente compraria
3 – Talvez comprasse/talvez não
comprasse
2 – Provavelmente não compraria
1 – Certamente não compraria

AMOSTRA	
231	
502	
176	
354	
290	