

Quitosana em queijo Minas frescal: ação antibacteriana sob cepa patogênica e nos atributos sensoriais**Chitosan in cheese Mines frescal: antibacterial action under pathogenic strain and in sensory attributes**

Recebimento dos originais: 22/08/2018

Aceitação para publicação: 26/09/2018

Rosana Bezerra de Melo Pereira

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco

Endereço: R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil

E-mail: annarsms@gmail.com

Roberta Albuquerque Bento da Fonte

Professora Doutora do departamento de Nutrição

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

E-mail: robertabentonutricionista@hotmail.com

Dayane de Melo Barros

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Fisiologia

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil

E-mail: dayane.mb@hotmail.com

Erilane de Castro Lima Machado

Professora Doutora do departamento de Nutrição

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

E-mail: erilanevet@hotmail.com

Michelle Galindo de Oliveira

Professora Doutora do departamento de Nutrição

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: R. Alto do Reservatório, S/n - Bela Vista, Vitória de Santo Antão - PE, Brasil

E-mail: michellegnutri@hotmail.com

Danielle Feijó de Moura

Doutoranda do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil
E-mail: danielle.feijo@hotmail.com

Celiane Gomes Maia da Silva

Professora Doutora do departamento de Ciências Domésticas
Instituição: Universidade Federal Rural de Pernambuco
Endereço: R. Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, Brasil
E-mail: celianemaia@yahoo.com.br

RESUMO

O queijo Minas frescal é um laticínio de ampla aceitação no mercado, entretanto, é bastante suscetível a contaminações por patógenos como *Staphylococcus aureus*, necessitando de atenção quanto à forma de conservação. Buscando prolongar a vida útil, mantendo a qualidade do alimento, o uso de antimicrobianos naturais como a quitosana, tem recebido grande enfoque. Diante disso, objetivou-se avaliar a ação antibacteriana da cobertura de quitosana em queijo minas frescal sob *Staphylococcus aureus*. A CBMe CIM foram determinadas pelo teste de macrodiluição em caldo queijo. Os ensaios de interferências da quitosana sobre a cinética de inibição bacteriana foi realizado através do método de contagem de células viáveis. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas e sensoriais. O comportamento da de *S. aureus* frente à quitosana foi comprovado em todas as concentrações utilizadas (5mg/mL e 20mg/mL). As análises físico-químicas com quitosana demonstraram discretas diferenças comparadas a amostra controle. Sensorialmente, ambas as amostras com quitosana apresentaram bons resultados, com notas variando entre 6,30 a 8,35. Portanto, os resultados refletem uma boa perspectiva de utilização de quitosana para a conservação de queijo Minas frescal.

Palavras-chave: laticínio, patógenos, conservação, qualidade, segurança.

ABSTRACT

Minas frescal cheese is a widely accepted dairy product in the market, however, it is very susceptible to contamination by pathogens such as *Staphylococcus aureus*, requiring attention on the way of preservation. Seeking to extend the useful life, maintaining the quality of the food, the use of natural antimicrobials like chitosan, has received great focus. The objective of this study was to evaluate the bioactivity of the chitosan gel in the inhibition of *Staphylococcus aureus* in Minas Frescal type cheese. CBM and MIC were determined by the cheese broth macrodilution test. Chitosan interference tests on bacterial inhibition kinetics were performed using the viable cell counting method. The samples were submitted to physical-chemical and sensorial analysis. The behavior of *S. aureus* against chitosan was confirmed in all the concentrations used (5mg/mL and 20mg/mL). The physico-chemical analyzes with chitosan showed discrete differences compared to the control sample. Sensorially, both samples with chitosan presented good results, with scores ranging from 6.30 to 8.35. Therefore, the results reflect a good perspective of the use of chitosan for the conservation of Minas frescal cheese.

Keywords: dairy, pathogens, conservation, quality, safety.

1 INTRODUÇÃO

A mudança nos padrões nutricionais e os benefícios creditados a uma alimentação saudável conduziram os setores responsáveis pela produção de alimentos a buscarem alternativas de

transformação e conservação dos produtos comercializados. Inovações no processamento e a crescente exigência do consumidor por alimentos mais naturais, com uma vida útil prolongada, mantendo a qualidade nutritiva e sensorial impulsionam a pesquisas de novos conservantes (SOUZA, 2017; FAI et al., 2008).

A produção leiteira no Brasil tem uma grande importância econômica e social, sendo 60% deste total destinado à fabricação de queijos, o qual atinge 450 mil toneladas anuais. (IBGE, 2012). O queijo Minas frescal é um dos queijos mais consumidos no país, produzido a partir do leite de vaca pasteurizado, apresentando como características pouca acidez e pequena durabilidade, podendo ser classificado como um queijo macio, semi-gordo e de alta umidade. Suas formas de fabricação e a intensa proteólise, decorrente das enzimas proteolíticas do coalho adicionado, influenciam decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto (MONTEIRO; PIRES; ARAÚJO, 2007).

A contaminação do queijo pode ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima ou por formas cruzadas durante ou após o processamento do produto (ROCHA, BURITI e SAAD, 2006). Devido a sua constituição, o leite torna-se um excelente meio de cultura para o desenvolvimento de microrganismos podendo ser responsável pela transmissão de bactérias patogênicas e causando intoxicações e/ou infecções ao homem (AMARAL et al., 2004). Esta contaminação pode ocorrer no leite durante ou após a ordenha e, conseqüentemente, nos derivados de leite, os quais podem ainda sofrer contaminação durante processamento e estocagem.

A fabricação artesanal de queijos fora dos padrões de higiene adequados pode ocasionar contaminações por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor. A ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode trazer graves conseqüências, como: febre, dor de cabeça, diarreia e até a morte, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública (LOGUERCIO e ALEIXO, 2001).

Dentre vários patógenos alimentares a contaminação por *Staphylococcus sp.* tem ocorrido com maior evidência, por este estar presente normalmente nas mãos e antebraços de manipuladores, sendo provavelmente a fonte de recontaminação do queijo (ASSUMPÇÃO et al., 2003).

Assim, o emprego das Boas Práticas de Fabricação, portaria 368/97 associado a métodos de conservação torna-se essencial para a garantia do fornecimento de alimentos seguros (FAI et al., 2008).

Na escolha de métodos para prolongar a vida útil e manter a qualidade de produtos frescos, congelados ou processados, o uso de antimicrobianos naturais destaca-se pela sua natureza saudável e segura. Dentre várias substâncias utilizadas, a quitosana tem recebido grande enfoque nos últimos anos considerando suas propriedades físico-químicas e o reconhecido potencial antioxidante e

antimicrobiano contra diferentes grupos de microrganismos, tais como, bactérias, leveduras e fungos. (FAI et al., 2008).

Portanto, pesquisas com intuito de verificar a bioatividade deste composto inovador como aditivo alimentar na inibição de microrganismos patogênicos em queijo Minas frescal é de grande importância, uma vez que este produto é artesanal, de fácil produção e sem maturação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Para produção do queijo Minas frescal foi utilizado leite integral pasteurizado padronizado com 3% de gordura, adquirido no comércio local, Cloreto de cálcio (VETEC) diluído na proporção de 5g para 10mL de água destilada, coagulante líquido (HA-LA[®]) na proporção de 0,4ml para cada litro de leite, cloreto de sódio 1g em relação ao peso da massa; A quitosana (Sigma-Aldrich), sendo, segundo informação inscrita, é procedente da purificação de quitina extraída da carapaça de crustáceo.

Métodos

Elaboração do queijo Minas frescal

O queijo Minas frescal foi elaborado de acordo com o fluxograma adaptado por Pereira, LIMA e SANTANA (2006). O leite foi aquecido a 36°C, com posterior adição de cloreto de cálcio e coalho líquido enzimático para promover a coagulação. Após a homogeneização e a formação do coagulo, permanece em repouso até obter a consistência lisa, firme e compacta, sendo em seguida, realizado o corte e a mexedura. Logo após foi realizada a dessoragem utilizando formas plásticas de formato cilíndrico, próprias para queijo Minas frescal, previamente sanitizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 100ppm (100mg/L) de cloro ativo por litro de água por 20 minutos. Logo em seguida foi realizada a enformagem da massa na mesma forma, a fim de formar blocos de massa homogêneos e firmes. Após a enformagem foi realizada a pesagem da massa para ser realizada a salga, já que a proporção de cloreto de sódio a ser adicionado a massa deve ser de 1% em relação ao peso da massa. A salga foi realizada, distribuindo o sal diretamente e uniformemente em um dos lados da massa (salga seca).

O queijo Minas frescal, assim como o comercializado, não foi prensado, nem maturado, permanecendo assim em temperatura de refrigeração até que fossem realizadas as etapas posteriores.

Elaboração do gel de quitosana e imersão dos cubos de queijo Minas Frescal

Os géis de quitosana a 5mg/mL e 20mg/mL foram preparados por dissolução do pó de quitosana em ácido acético a 1%, mantidos sob agitação moderada em agitador magnético (TECNAL) durante 24 horas em temperatura ambiente, até a total dissolução do pó e obtenção do gel homogêneo.

Cubos de queijo Minas frescal, com aproximadamente 2cm de aresta e 10g foram individualmente mergulhados nos géis de quitosana com ajuda de um suporte metálico, sendo após escoamento do excesso as amostras assepticamente transferidas para recipientes de vidros estéreis com tampa plástica, e armazenadas em condições de refrigeração a 4° C.

Preparação das cepas bacterianas reveladoras da atividade antimicrobiana

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, do Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPE (Recife, Pernambuco, Brasil).

Os inóculos das cepas utilizados nos ensaios antimicrobianos foram obtidos através da preparação de suspensões de tais cepas em solução salina (NaCl a 0.85% p/v) estéril a partir de culturas *overnight* cultivadas em BHI inclinado a 35°C. Tais suspensões tiveram sua turbidez padronizada de acordo com a turbidez do tubo 0.5 da escala McFarland correspondendo à concentração de aproximadamente 10⁸ Unidades Formadoras de Colônia por mL (UFC/mL). Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (1:9 v/v) em solução salina (0.85%) estéril para obtenção do inóculo desejado (aproximadamente 10⁶ UFC/mL).

Elaboração do caldo queijo para cultivo das cepas microbianas

Os ensaios de dinâmica de crescimento do *S. aureus* foram realizados utilizando caldo queijo como substratos de cultivo. Para preparação do caldo queijo, aproximadamente 150g de queijo Minas Frescal foram misturados com 300mL de água destilada durante 20 minutos sob aquecimento a 100°C em bico de bunsen. Em seguida, a mistura foi submetida à filtração com a utilização de bomba a vácuo. O filtrado obtido foi esterilizado através do uso de sistema de filtração Millipore (0,45µm).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da quitosana em caldo queijo

De acordo com o método padrão descrito pela National Comitê for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (NCCLS,1999), a concentração inibitória mínima (CIM) é a concentração mais

baixa de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento visível, após um período de incubação predeterminado (geralmente 18-24h).

Os testes para determinar a Concentração Inibitória Mínima – CIM e Concentração Bactericida Mínima – CBM da quitosana, foram realizados através da técnica de macrodiluição em caldo queijo (NOSTRO et al., 2001). Inicialmente, 1mL da suspensão de *Staphylococcus aureus* foi inoculado em 5mL de caldo queijo contendo quitosana em diferentes concentrações (10mg/mL, 5mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25mg/mL, 0,625mg/mL). Foram realizados dois controles em amostras triplicatas, um no qual um continha apenas caldo queijo e o outro com caldo queijo e ácido acético, produto este diluente da quitosana. Os sistemas foram incubados a 35°C por 24 horas. Ao término do período de incubação, a mais baixa concentração que não apresentou crescimento microbiano visível (turvação) foi considerada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Após esta observação, alíquotas de 100µL dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível foram inoculados em Baird Parker Agar (HiMedia), sendo este meio específico para *S. Aureus*, por 24-48 horas a 35°C. As placas que não apresentaram crescimento na maior concentração testada foi considerada a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

Ação antimicrobiana da quitosana sob a viabilidade de Staphylococcus aureus em queijo tipo Minas frescal

Os ensaios de interferências da quitosana sobre a cinética de inibição bacteriana foi realizado através do método de contagem de células viáveis. Nestes ensaios foi observado o comportamento dos microrganismos na Concentração Bactericida Mínima e a 20mg/mL. Inicialmente, 1mL da suspensão bacteriana foi inoculado em 10g do queijo Minas Frescal já imerso em gel de quitosana, bem como nas amostras controle. As amostras foram mantidas sob refrigeração e nos intervalos de 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias pós-incubação, o produto foi diluído seriadamente (1:9 v/v) em solução salina 0,1% (10^{-1} – 10^{-6}) estéril inoculada uma alíquota de 100µL das diluições em placa de Petri contendo Baird Parker Agar, uniformemente distribuída com alças Drigalski descartáveis sendo por fim incubada a 35°C. Após o fim do período de incubação, foi realizada a contagem do número de células viáveis, expressa em log de UFC/mL (SAGDIÇ, 2003). Os resultados foram expressos em percentual de redução de UFC/mL do inóculo microbiano inicial ao longo dos tempos analisados.

Análises físico-químicas

Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas no queijo Minas frescal controle (sem quitosana) e com quitosana (Concentrações de 5mg/mL e 20mg/mL): Umidade determinada

por gravimetria em estufa (TECNAL) a 105°C até peso constante da amostra; Resíduo mineral fixo (cinzas) obtido mediante carbonização em fogareiro e calcinação em mufla a 550°C até peso constante (AOAC, 2005); Lipídios totais extraídos e quantificados de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959); Proteínas determinadas pelo método de Kjeldahl (AOAC, 2005); Atividade de água determinada pelo analisador de atividade de água. As análises de acidez foram realizadas por titulação direta com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, com o auxílio de solução de fenolftaleína como indicador.

Análise Sensorial

Para a realização da análise sensorial, a presente pesquisa foi previamente liberada para coleta dos dados e posteriormente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE N° 113/09) (ANEXO 1).

No Laboratório de Análise Sensorial do Núcleo de Nutrição/Centro Acadêmico de Vitória/UFPE (CAV/UFRPE), em cabines individuais iluminadas com luz branca, à temperatura de 24°C, foram realizadas as análises sensoriais utilizando o teste de comparação pareada de diferença (amostras com as duas concentrações) e de aceitação (amostras com ambas as concentrações e controle), para um painel de 15 e 46 provadores respectivamente, não treinados, escolhidos conforme disponibilidade e hábito de consumir queijos magros (ABNT, 1993). Cerca de 30g do produto foram oferecidos em pratos de polietileno em temperatura refrigerada ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), juntamente com água e bolacha. A ficha sensorial de aceitação continha parâmetros de avaliação quanto à aparência global, à cor, ao aroma, à textura e ao sabor, sendo a avaliação realizada pela utilização da escala hedônica estruturada de 9 pontos (1- desgostei; 2- desgostei moderadamente; 3- desgostei regularmente; 4- desgostei ligeiramente; 5- não gostei/ nem desgostei; 6- gostei ligeiramente; 7- gostei regularmente; 8- gostei moderadamente; 9- gostei extremamente), de acordo com a NBR 14141 (ABNT, 1998).

Análise estatística

Os dados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) e Teste de Duncan ao nível de 5% de significância utilizando o programa Statistica 6.0 (STATSOFT, 1997).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ação antimicrobiana da quitosana sob a viabilidade de Staphylococcus aureus em caldo queijo e queijo Minas frescal

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) encontrada foi de 2,5mg/mL, uma vez que foi a menor concentração capaz de inibir a cepa em caldo queijo, visto que ao inocular em Baird Parker Agar houve crescimento bacteriano, demonstrando que não houve a morte bacteriana. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi de 5mg/mL, pois não ocorreu crescimento no caldo e também quando inoculada em meio sólido.

Os valores da CIM e CBM encontrados neste trabalho foram os mesmos obtidos no estudo de Stamford et al. (2013), que encontrou para *S. aureus*, CIM de 2,5mg/mL e CBM de 5mg/mL de quitosana. No entanto, Fai (2008), utilizando diferentes meios de culturas, encontrou valores de 1,5mg/mL para CIM da quitosana ao inibir o *S. aureus*. Resultados positivos demonstrando a ação inibitória da quitosana, também sob o crescimento das enterotoxinas do *S. aureus*, foram encontrados por Ouattara et al. (2000). Dessa forma, observa-se em tais estudos, a intensa busca em analisar a ação da quitosana sob a cepa *S. aureus*.

Outros autores realizaram a determinação de CIM e CBM da quitosana em diferentes pesos moleculares, e em diversas cepas. Kanatt, Chander e Shama (2008) relataram que estes valores da CIM da quitosana podem variar entre 0,1 a 10mg/mL, dependendo da variedade de microrganismos presentes em alimentos. Bento et al. (2011) ao avaliar a bioatividade da quitosana sob *Listeria monocytogenes*, encontrou os valores de 2,5mg/mL para CIM e 5mg/mL para CBM, sendo os mesmos valores de CIM e CBM encontrados para *S. aureus* no presente trabalho. Porter, Black e Drolet(2000) testaram a ação antimicrobiana da quitosana com soluções a 1 e 2%, em testes conduzidos *in vitro*, resultando em três grupos de bactérias quanto a sua sensibilidade à quitosana: completamente inibido (*Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Yersinia enterocolitica*), muito inibido (*Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas lundensis*, *Citrobacter freundii*, *Enterococcus faecalis*) e parcialmente inibido (*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*). Segundo Rhodes e Roller (2000), a quitosana apresenta valores de CIM e CBM mais satisfatórios em comparação a outros antimicrobianos, o que faz com que a efetivação da quitosana seja ainda mais aceita em alimentos.

Apesar de inúmeras comprovações da atividade antimicrobiana, o mecanismo da ação inibitória da quitosana não é completamente conhecido. Lifeng et al. (2004) relata em seu estudo que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado às propriedades físico-químicas do polímero e às características da membrana do microrganismo. Segundo Soares Filho et al. (2006) e Fai et al.(2008), a atividade antimicrobiana da quitosana, se deve ao fato da quitosana se ligar seletivamente à superfície celular carregada negativamente dos

microrganismos, alterando a atividade celular e a permeabilidade da membrana, resultando na perda de componentes intracelulares e, conseqüente, inibição microbiana.

Burt (2004) apontou em suas pesquisas o interesse na realização de testes que demonstrassem a ação no alimento, visto que este autor relata que apesar da quitosana possuir grande potencial na inibição de microrganismos, existe uma barreira para uso como aditivo devido à interação entre agentes antimicrobianos e os componentes dos alimentos, que poderiam ser responsável por diferentes resultados.

Em paralelo, a preocupação pela contaminação por *S. aureus* em queijos tem sido demonstrada em muitos estudos. Arruda et al. (2007), ao pesquisarem a ocorrência deste microrganismo em queijos tipo Minas Frescal comercializados nas feiras livres de Goiânia, encontraram valores elevados de *S. aureus* nas amostras, o que representa um grande risco para o consumidor.

Em uma pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo Minas Frescal comercializado na Região do Triângulo Mineiro, Ferreira (2010) encontraram muitas amostras em condições sanitárias insatisfatórias, sendo elevada a quantidade de *S. aureus*, dando indícios de práticas impróprias durante a fabricação do produto. Em outro estudo, Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) avaliando 97 amostras de queijo Minas Frescal comercializados na cidade de Campinas, SP, revelaram que 12,9% encontravam-se contaminados, com altas contagens de Estafilococoscoagulase positiva, estando em desacordo com o padrão estabelecido pela legislação vigente (BRASIL, 2001).

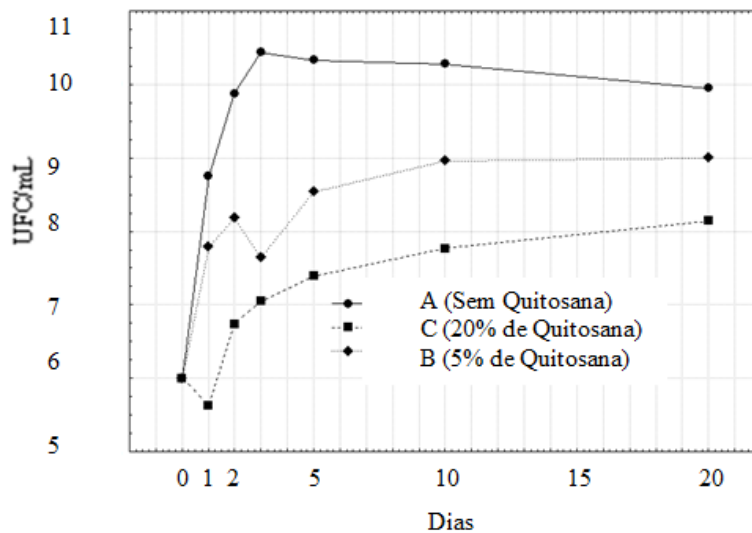
Assim, este estudo procedeu para avaliar o poder da quitosana em diferentes concentrações (5mg/mL e 20mg/mL) em matriz alimentar (queijo), sendo os resultados expressos na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Comportamento do crescimento/morte de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal imerso em diferentes concentrações de gel de quitosana expressos em log UFC/mL

Dias								
Amostras								
	0	1	2	5	10	15	20	
A	6,0±0,0Ab	8,75±0,91Aa	9,88±0,03Aa	10,44±0,35Aa	10,33±0,42Aa	10,28±0,76Aa	9,95±0,95Aa	
B	6,0±0,0Ac	7,79±0,14Bb	8,18±0,45Bab	7,64±0,66Bb	8,54±0,47Bab	8,96±0,10ABa	8,99±0,04ABa	
C	6,0±0,0Aef	5,63±0,42Cf	6,74±0,23Cbde	7,05±0,25Bbc	7,39±0,45Cacd	7,77±0,58Bac	8,14±0,29Ba	

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na horizontal não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de tukey. Médias seguidas de letras maiúscula na vertical iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de tukey. A: queijo sem quitosana; B: queijo imerso em 5% de quitosana; C: queijo imerso em 20% de quitosana.

Figura 1. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal revestidos com gel de quitosana nas concentrações 5 e 20% e controle (sem quitosana)



Ao analisar o comportamento de cada amostra individual ao longo do tempo, foi observado um crescimento contínuo da quantidade de microrganismos em todas as amostras, o que provavelmente foi resultado do método de conservação do queijo, o qual permaneceu sob refrigeração, método este que não elimina as bactérias, apenas retarda o crescimento.

Rosa (2004) ao analisar queijo Minas frescal, também demonstrou que mesmo sob refrigeração e utilização de métodos tradicionais, as bactérias mesófilas, assim como o *S. aureus*, apresentaram um crescimento gradativo no queijo armazenado. Manolopoulou et al. (2003), trabalhando com queijo tipo fresco, também obteve uma evolução das bactérias mesófilas, com valores de 5,18 a 9,35logUFC.g⁻¹ durante um período de 16 dias. Com isso, é demonstrado que mesmo sob refrigeração, e utilizando conservantes químicos já utilizados pela indústria de alimentos, permanece contínuo a taxa de crescimento microbiano em queijos frescos.

Na amostra sem quitosana (A), houve um crescimento significativo estatisticamente no 1º dia, entretanto, a partir do 10º dia, é possível perceber um decréscimo da carga microbiana em relação à quantidade de microrganismo, que vai decorrendo até o 20º dia. Este fato pode ter ocorrido devido à elevada quantidade de microrganismos na amostra sem quitosana, provocando assim a morte microbiana ou fase de declínio devido à alta competitividade entre os microrganismos.

Na amostra B ocorreu um crescimento de forma significativa no 1º tempo. Quanto à amostra C, esta foi à única em que houve redução da carga microbiana no 1º dia do armazenamento, seguindo um crescimento linear ao longo dos demais tempos.

Ainda analisando a Tabela 1, ao comparar as 3 amostras observou-se logo no 1º dia de avaliação, uma diferença significativa entre as amostras A (queijo sem quitosana), B (queijo com 5mg/mL de quitosana) e C (queijo com 20mg/mL de quitosana), sendo a redução de microrganismo proporcional a maior quantidade de quitosana adicionada, o que permaneceu também no 2º dia.

No 5º dia, as amostras com quitosana (B e C) passaram a não mais diferir estatisticamente entre si, apresentando diferença apenas quando comparadas com a amostra sem quitosana (A), que apresentou maior número de *S. aureus*. Entretanto, nos tempos 15º e 20º dia, foi observado que a amostra B (5mg/mL) passou a não mais apresentar diferença estatística em relação à amostra (A) e (C), enquanto que a amostra C (20mg/mL) permaneceu diferindo da amostra sem quitosana (A). Estes resultados apontam que apesar da quitosana a 20mg/mL ter obtido maiores reduções e diferir significativamente da amostra controle, a quitosana a 5mg/ml promoveu o controle desejável das cepas até o 20º dia, utilizando menores quantidades dos antibacteriano, processo estes desejável pela indústria alimentícia.

Resultados similares aos do presente trabalho, foram encontrados por Ali et al.(2011) que ao aplicar diferentes concentrações de quitosana (5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL) em mamões, verificou que a concentração de 15mg/mL apresentou-se mais promissora do que as concentrações mais baixas. Camili et al. (2007) ao empregar a solução de quitosana nas concentrações 15 e 20mg/mL, encontrou que maiores concentrações supriu de forma mais eficaz o crescimento

microbiano. Miranda (2004) quando aplicou em maçãs, filme de quitosana com a mesma concentração utilizada neste trabalho (20mg/mL), obteve também resultados positivos em relação à vida útil.

Entretanto, outros autores encontraram resultados satisfatórios mesmo em menores concentrações. Assis (2009) comprovou a eficiência do biofilme de quitosana quando utilizou concentração de 10mg/mL como envoltório protetor em morangos. Dotto et al. (2008) ao aplicar filme de quitosana a 5g/L em mamões papaia, verificou que a contaminação foi reduzida em 60%, não sendo necessário o uso de concentrações maiores para aumentar a vida útil dos mamões. Bento et al. (2011) ao adicionar 5mg/mL de quitosana em patê de carne também encontrou atividade antimicrobiana satisfatória, porém vale mencionar que neste estudo a quitosana foi incluída na massa do patê e não como cobertura comestível.

Avaliação Físico-Química

Os resultados da composição centesimal estão apresentados na Tabela 2. Quanto ao teor de umidade, houve diferença significativa entre as amostras. Sendo a amostra A (controle) com maior diferença significativa em relação a B (5mg/mL de quitosana) e C (20mg/mL de quitosana). Quanto maior o teor de umidade no queijo, mais rápido ocorrerá à proteólise, tendo como consequência a modificação da consistência e do sabor do queijo (OLIVEIRA, 1986). As médias obtidas nas amostras quanto ao teor de umidade estão de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos que estabelece uma faixa de umidade não inferior a 55,0% (BRASIL, 1996). As amostras analisadas neste estudo classificam-se de acordo com este Regulamento como queijos de muita alta umidade.

A concentração de quitosana no gel reflete diretamente sobre a afinidade pela água e demais soluções aquosas. O alto grau de hidrofiliabilidade da quitosana tem sido atribuído aos grupos desacetilados presentes na cadeia polimérica, ao redor dos quais é favorecida uma grande migração de moléculas de água (JOLLES e MUZZARELLI, 1999). Estas afirmações foram confirmadas neste estudo onde as amostras revestidas com gel de quitosana foram as que apresentaram menores valores de umidade, sendo a amostra C com 20mg/mL de quitosana significativamente menor que a amostra B com 5mg/mL de quitosana no gel (Tabela 2).

Tabela 2. Composição centesimal e parâmetros físico-químicos do queijo Minas frescal

Análises	Amostras		
	A	B	C
Umidade (%)	71,96±0,60a	67,50±0,75b	62,33±0,50c
Lipídios (%)	8,81±1,14a	8,50±0,36a	7,50±0,30a
Aw	0,972±0,004a	0,979±0,005a	0,947±0,029a
Cinzas (%)	1,38±0,17b	1,77±0,04ab	1,91±0,30a
Proteínas (%)	12,56±0,04a	10,79±0,67b	11,02±0,69b
Acidez (%)	0,11±0,01c	0,40±0,01a	0,30±0,01b

Médias seguidas de letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de tukey. A: queijo sem quitosana; B: queijo imerso em 5% de quitosana; C: queijo imerso em 20% de quitosana.

Quanto ao teor de lipídeos, não houve diferença significativa entre as amostras (Tabela 2). Vale ressaltar que mesmo a quitosana se ligando quimicamente às moléculas de gordura do sistema, a imersão em gel de quitosana a 5mg/mL e 20mg/mL nas amostras de queijo em estudo não interferiu no teor de gordura dos produtos, quando comparado ao controle. Entretanto, supõe-se que o menor teor de lipídio nas amostras a 20mg/mL, pode ser consequência da ligação desta com a gordura devido à alta afinidade, deixando a mesma menos disponível durante a análise.

Variação nos percentuais de gordura em queijo Minas frescal também é justificada pela ausência de padronização do leite e por diferentes manejos nutricionais dos rebanhos, além da presença de microbiota lipolítica em leite (ORNELAS, 2005).

Quanto à atividade de água não houve diferença significativa entre as amostras. Todas apresentaram valores de aW acima de 0,90 (Tabela 2). Contudo, é importante ressaltar que a maior preocupação com relação à alta aW, é a probabilidade de interferir como fonte de risco para desenvolvimento de microrganismos.

Em relação à acidez titulável verificou-se um maior valor na amostra B (5mg/mL de quitosana) estatisticamente superior às outras amostras (Tabela 2). Este resultado pode ser atribuído a uma maior concentração em ácido acético presente no gel de quitosana a 5mg/mL. Um maior valor de acidez está diretamente relacionado com o aumento da população dos microrganismos mesófilos, psicotróficos e principalmente as bactérias lácticas, as quais são os principais agentes na transformação da lactose em ácido láctico.

Quanto ao teor de cinzas (Tabela 2), a amostra C foi a que apresentou maior teor, sendo estatisticamente superior a amostra A (controle), não havendo diferença significativa entre as amostras B e C, que foram revestidas com gel de quitosana. O teor de cinzas significa o aporte de sais minerais no alimento, elementos significantes e de suma importância para atividades biológicas no organismo humano.

O teor de proteínas foi superior estatisticamente na amostra A (Controle) comparado às amostras B e C (Tabela 2), podendo ser atribuído à capacidade da quitosana em formar complexos

com proteína pela interação iônica entre os grupos aniônicos das proteínas e os grupos amino da quitosana (MENDES et al., 2011). Resultados superiores foram encontrados por Machado (2010) onde os teores de proteínas entre as amostras de queijo Minas frescal avaliadas variaram de 16 a 22g/100g.

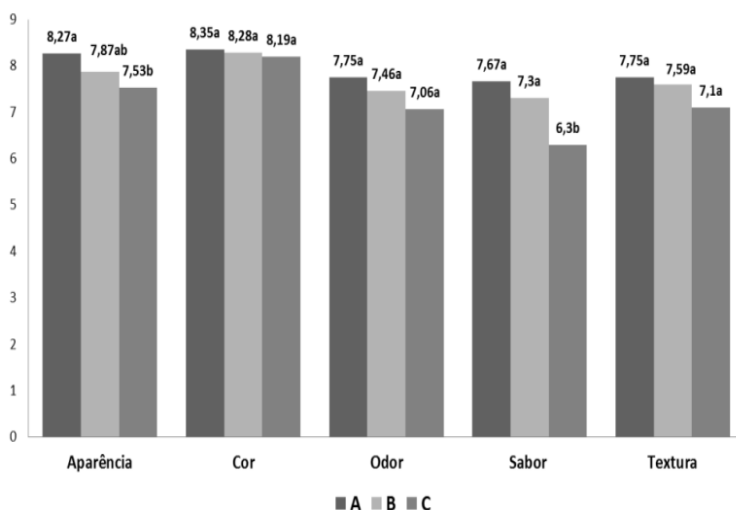
Analise Sensorial

As amostras foram submetidas aos testes sensoriais, visto que esses antimicrobianos, apesar de possuir uma grande aplicabilidade em diversos produtos industriais e *in natura*, ainda apresentam poucos estudos demonstrando a interferência nesse principal atributo de qualidade.

No teste de comparação pareada dos queijos com as concentrações de 5mg/mL e a 20mg/mL, para detectar se a diferença entre as duas amostras era perceptível, foi observado que dos 15 provadores, 14 perceberam a diferença. Assim, pelo teste monocaudal $15 < 14$, foi comprovado que existe diferença sensorial entre as duas amostras ao nível de 0,1% de significância.

A Figura 4 expressa às médias das notas atribuídas pelos provadores no teste de aceitação, no qual foi observada a influência da variável do processo (adição ou não de quitosana, em diferentes concentrações), sobre os atributos de qualidade (aparência, cor, odor, sabor e textura).

Figura 2. Médias das notas obtidas na no Teste de Aceitação de queijo Minas frescal revestido com gel de quitosana (amostra B: 5mg/ml de quitosana; amostra C: 20mg/mL de quitosana) e controle (amostra A: sem revestimento de quitosana).



Médias seguidas de letras iguais no mesmo atributo não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de tukey.

Quanto ao atributo aparência a amostra A (controle) apresentou maior média entre os provadores, de 8,27, porém, não houve diferença significativa em comparação à amostra B

(5mg/mL de quitosana). Porém a amostra A variou estatisticamente da amostra C (20mg/mL de quitosana), e as amostra B e C não variaram entre si. Estes resultados demonstram que quanto maior a concentração de quitosana no gel, mais perceptível fica para o consumidor as modificações sobre a aparência geral do produto. As médias obtidas para este atributo compreenderam entre a nota 7,0, que reflete em “gostei regularmente” (amostras com 5mg/mL e 20mg/mL de quitosana) e a nota 8,0 “gostei moderadamente” (amostras sem quitosana). A aparência é um atributo que reflete diretamente nas características global, sendo muitas vezes responsável pela aceitação, rejeição, ou preferência de um produto. Estudos realizados por Dotto et al. (2008) também constataram que houve diferença significativa na aparência, quando aplicado quitosana em mamão.

As médias obtidas para os atributos cor, odor e textura não apresentaram diferença significativa entre as amostras, sendo as maiores médias observadas para a amostra A (controle), com médias também entre 7,0 e 8,0.

Referente à avaliação da cor, Botrel et al.(2007) ao recobrir quitosana em alho minimamente processado obteve resultados satisfatórios, afirmando que as alterações na coloração superficial do produto não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para a variação da tonalidade de cor e da saturação de cor durante o tempo de estocagem a 10°C em relação ao controle, onde a quitosana promoveu um pequeno retardamento na alteração da tonalidade da cor. Outras respostas positivas relacionados à melhoria da cor pela inclusão de quitosana foram observados em suco de maçã (GRECO,CUBITTO e RODRÍGUEZ, 2007), mamão papaia (DOTTO, et al., 2008), uva (CAMILI, 2007) e maçãs cortadas (ASSIS; ALVES, 2002), devido ao processo de retardamento do escurecimento enzimático, e sua influência sob a formação da quinona, agente promotor dos pigmentos escuros. Em contrapartida, foram relatados por outros autores resultados negativos, como no estudo de cookies (VIEIRA, 2001) e de pêssegos douradão (SANTOS et al., 2008), onde foi relatado o escurecimento do produto (coloração escura) devido ao uso da quitosana. No caso do queijo Minas frescal foi observado visivelmente uma leve tonalidade amarelada nos queijos com quitosana, porém, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Em relação à textura, Altieri et al. (2005) estudando a eficiência de quitosana em queijo muçarela, também observou que a quitosana não comprometeu a funcionalidade tecnológica e modificação na textura do queijo. Damian (2005) relata que é possível produzir salsichas Frankfurt de baixo teor de gordura adicionadas de quitosana, sem alterar significativamente suas características sensoriais de textura, uma vez que a análise sensorial não apresentou diferenças significativas entre assalsichas contendo quitosana e as do controle.

Em relação ao atributo sabor não houve diferença significativa entre a amostra sem quitosana e a amostra com quitosana a 5mg/mL, porém, houve diferença entre ambas as amostras

comparada a amostra com 20mg/mL. A hipótese para tal resultado se deve ao fato de que a adição da quitosana em altas concentrações promove um sabor residual perceptível uma vez que a quitosana é diluída em ácido acético. Han et al. (2005) ao estudarem o emprego da quitosana no armazenamento de morangos, afirmaram que apesar da quitosana ser um bom conservante, ao ser dissolvida em soluções ácidas, desenvolveu adstringência e amargura no sabor das frutas, o que poderia também ter ocorrido no queijo em maior concentração. Entretanto, vale ressaltar que apesar da diferença encontrada, a amostra com quitosana em maior concentração obteve a nota 6,0 equivalente a “gostei ligeiramente”, isto é, todas as médias obtiveram valores compreendidos no termo “gostei”, o que indica uma boa aceitação do produto.

Resultados satisfatórios pelo uso da quitosana foram também encontrados por Júnior et al. (2010), que em estudo realizado com mamão e cobertura de quitosana, encontraram em todos os atributos o termo “nem gostei e nem desgostei”, o que demonstrou a não influência negativa nos atributos sensoriais de produtos adicionados de quitosana.

Gerla et al. (2011) avaliando atributos sensoriais como sabor, cor, textura, doçura e sabor residual de gelados comestíveis de leite de búfala adicionados de quitosana e farinha de linhaça, constataram uma boa aceitação pelos consumidores do produto, conforme os atributos avaliados.

4 CONCLUSÕES

Evidenciou-se o potencial antimicrobiano da quitosana, onde cepas de *S. aureus* foram inibidas pelo revestimento com gel de quitosana em queijo tipo minas frescal durante o período de 20 dias de estocagem sob refrigeração.

Os dados resultantes das avaliações físico-químicas demonstraram que o revestimento com quitosana promoveu discretas alterações sobre as características próprias do queijo, porém, não levou a modificações significativas sobre a qualidade do produto final. Sensorialmente, as amostras de queijo com quitosana apresentaram boa aceitação reforçando o potencial de utilização deste polímero como agente de conservação de alimentos.

Estes resultados são satisfatórios do ponto de vista da segurança alimentar, visto que este patógeno possui grande repercussão no desenvolvimento de doenças de origem alimentar e a aplicação de quitosana revelou possuir potencial ação para a conservação do queijo de coalho, podendo ser empregada na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR12994: **Análise sensorial dos alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, 1993.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR14141: **Escalas utilizadas em análise sensorial dos alimentos e bebidas**. Rio de Janeiro, 1998.

ALI, A.; MUHAMMAD, M. T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI, Y. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. **Food Chemistry**, v. 124, p. 620-626, 2011.

ALTIERI, C., SCROCCO, C., SINIGAGLIA, M., DEL NOBILE, M.A, J. Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2683-2688, 2005.

AMARAL, L. A.; DIAS, L. T.; NADER FILHO, A.; ISA, H.; ROSSI JR, O. D. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropédica, v. 24, n. 4, p. 173-177, 2004.

ARRUDA, M. L. T.; NICOLAU, E. S.; REIS, A. P.; ARAÚJO, A. S; MESQUITA, A.J. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 3, p. 292-298, 2007.

ASSIS, A. S. **Produção e caracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos**. 89p.2009. Tese (Doutorado em nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Nutrição. Recife, Brasil. 2009.

ASSIS, O. B. G; ALVES, H. C. Metodologia mínima para a produção de filmes comestíveis de quitosana e avaliação preliminar de seu uso como revestimento protetor em maçãs cortadas. Instrumentação Agropecuária, São Carlos/SP. **Comunicado Técnico - Embrapa**. n. 49, 5p , 2002.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis** of the association analytical chemists. v.1, 18.ed. Maryland: AOAC, 2005.

ASSUMPÇÃO, E. G.; PICCOLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003.

BENTO, R.A.; STAMFORD T.L.M.; STAMFORD, T.C.M.; ANDRADE, S.A.C.; SOUZA, E.L. Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucorrouxii*. **Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 588-591, 2011.

BESINELA JÚNIOR, E; MONARIM, M. M. S.; CAMARGO, M.; MAHL, C. R. A.; SIMÕES, M. R.; SILVA, C. F. Efeito de diferentes biopolímeros no revestimento de mamão (Carica Papaya L) minimamente processado. **Varia Scientia Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 131-142, 2010.

Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911. 1959.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com revestimento comestível antimicrobiano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 32-38, 2007.

BRASIL. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. DIPOA. **Portaria nº 146 de 07 de março de 1996**. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de produtos lácteos, 1996.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº12, de 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológico para Alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, 2001.

BURT, S. Essencial Oils their antibacterial properties and potential application in foods a review. **International Journal of food microbiology**, v. 94, n. 03, p. 223-253, 2004.

CAMILI, E. C.; BENATO, E. A.; PASCHOLATI, S. F.; CIA, P. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-221, 2007.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, n. 18, p. 262–267, 2007.

CHINELATE, G.C.B. **Gelado comestível à base de leite de búfala com ingredientes funcionais: aplicação de linhaça (*linum usitatissimum l*) e quitosana.** Dissertação (Mestrado em ciência e tecnologia de alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza, 2011.

CHI, S.; ZIVANOVIC, S; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology International**, v. 12, n.2, p. 111-117, 2006.

DAMIAN, C. **Efeito da quitosana na digestibilidade aparente da gordura e na qualidade de salsichas Frankfurt.** 154p.2005. Tese (Doutorado em Nutrição). Florianópolis, Brasil, 2005.

DOTTO, G. L.; GREVINELI, A. C.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. A. A. USO de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaia. **Anais do 17º Congresso de Iniciação Científica e 10º encontro de pós-graduação.** Rio Grande, RS., 2008.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 435-451, 2008.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 3, p. 435-451, 2008.

FERREIRA, B. G. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas Frescal comercializado na região do triângulo mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, p. 575-589, 2010.

GRECO F.A, CUBITTO M.A, RODRÍGUEZ M.S. Evaluación de la actividad antimicrobiana del quitosano sobre *Candida Krusei* en jugo de manzana. En **Resumos do IV Simposio Iberoamericano de Quitina (IV SIAQ) 2007.** Natal (Brasil): Sociedade Iberoamericana de Quitina, 2007.

HAN, C.; LEDERER, C.; MCDANIEL, M.; ZHAO, Y. Sensory evaluation of fresh strawberries (*Fragaria ananassa*) coated with chitosan-based edible coatings. **Journal of Food Science**, v.70, p.172-178, 2005.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA/ **Estatística da Produção Pecuária 2012**. Disponível em:<www.ibge.gov.br> acesso em abril de 2013.

JOLLES, P.; MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin and chitinases**. Berlin:Birkhauser, 340 p., 1999.

KANATT, S.; CHANDER, R. SHAMA , A. Chitosan and mint mixture: a new perspective for meat and meat products. **Food Chemical**, v. 107, p. 845-852, 2008.

LI Y., CHEN X.G., LIU N., LIU C.S., LIU C.G., MENG X.H., YU L.J., KENEDY J.F., Physicochemical characterization and antibacterial property of chitosan acetates. **Carbohydrate Polymer**, v. 67, n. 2, p. 227-232, 2007.

LIFENG QI; et al., Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymer**, v. 339, p.2693-2700, 2004.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, 2001.

MACHADO, E. C.; Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2010.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **Int. J.Food Microbiol.** v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quimica Nova**, vol. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIRANDA, M. E. S. **Caracterização físico-química, bioquímica, microscópica, e sensorial, da N-carboximetilquitosana em solução e filme.** 152p. 2004. Tese (Doutorado em ciência e tecnologia de alimentos), Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Santa Catarina, Brasil, 2004.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAÚJO, E. A. **Tecnologia de Produção de Derivados de Leite.** 81p. Viçosa: Editora UFV, 2007.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos.** Editora Icone. São Paulo. 146p. 1986.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra.** 2005. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BEGIN, A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology.** v. 6, p. 2139–148, 2000.

PEREIRA, M. M. G.; LIMA, M. T.; SANTANA, M. de F. S. Queijo Minas Frescal. **Comunicado Técnico,** Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. n. 12, p. 1-4, 2006.

PORTER, W. L.; BLACK, E. D.; DROLET, A. M. Chitin and Chitosan as Novel Protective Food Ingredients .In: U.S Army Natick RD&E Center, Natick, MA, **Marine Polymer Technologies,** Danvers, MA, 2000.

RHODES, J., ROLLER, S. Antimicrobial actions of degraded and native chitosan against spoilage organisms in laboratory media and foods. **App. Environ Microbiol,** v.60, p. 80-86, 2000.

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

ROSA, V.P. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal**. 155p.2004. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2004.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **LWT - Food Science and Technology**, v. 36, n. 55, p. 467-473, 2003.

SANTOS, C. A. A.; CASTRO, J. V.; PICOLI, A. A.; ROLIM, G. S. Uso de quitosana e embalagem plástica na conservação pós-colheita de pêssegos 'Douradão'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.88-93, 2008.

SOARES FILHO, J. M. ; COUTINHO, E. P. ; MOREIRA, R. T. ; SANTOS, E. P. ; HOLANDA, H. D. ; SOUZA, S. ; MENDONCA, S. L. R. . Análise da aceitação de queijos coalhos condimentados com diferentes concentrações de óleo essencial de erva-doce. **In: I Jornada Nacional da Agroindústria, 2006**, Bananeiras-PB. Anais da I Jornada Nacional da Agroindústria, 2006.

SOUZA, N.B. **Ação antimicrobiana de bacteriocina produzida por Lactobacillus sakei: uma análise de resistência e aplicação em queijo minas frescal**. 93p.2017. TCC (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Pampa, Bagé, 2017.

STAMFORD, T. C. M.; MONTENEGRO, T.; CAVALCANTE, H. M. DE M.; OLIVEIRA, R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent. In: Adriano O. Andrade; Adriano Alves Pereira; Eduardo L. M. Naves; Alcimar B. Soares. (Org.). **Microbiological Chitosan: Potential Application as Anticariogenic Agent**. 1ed.Rijeka: InTech, v. , p. 229-244. 2013.

STATSOFT. **Statistic for Windows 5.1. CD ROM**. Tulsa, StatSoft Inc,1997.

VIEIRA, S.M. **Biscoito tipo cookie com adição de quitosana**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2001.