



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



**Influência da cobertura de quitosana nas
características físico-químicas, sensoriais e na
inibição de *staphylococcus aureus* em queijo
Minas frescal**

RECIFE, 2013

ROSANA BEZERRA DE MELO PEREIRA

**Influência da cobertura de quitosana nas
características físico-químicas, sensoriais e na
inibição de *staphylococcus aureus* em queijo
Minas frescal**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PGCTA), da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Celiane Gomes Maia da Silva (Departamento de Ciências Domésticas/UFRPE)

Co-Orientadora: Profa. Dra. Roberta de Albuquerque Bento (Núcleo de Nutrição/Centro Acadêmico de Vitória/UFPE)

Recife, 2013

Ficha catalográfica

P436i Pereira, Rosana Bezerra de Melo
Influencia da cobertura de quitosana nas
características
físico-químicas, sensoriais e na inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal / Rosana Bezerra de Melo Pereira. – Recife, 2013.
63 f. : il.

Orientadora: Celiane Gomes Maia da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2013.
Inclui referências e apêndice(s).

1. *Staphylococcus aureus* 2. Queijo minas frescal
3. Antimicrobianos naturais 4. Quitosana I. Silva,

Celiane

Gomes Maia da , orientadora II. Título

CDD 664

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOMÉSTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

Influência da cobertura de quitosana nas características físico-químicas, sensoriais e na inibição de *staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal

Por Rosana Bezerra de Melo Pereira

Esta dissertação foi julgada para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos e aprovada em 28/08/2013 pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimento em sua forma final.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a. Celiane Gomes Maia da Silva (Orientadora e Presidente da Mesa)
Departamento de Engenharia Química / UFPE

Prof^a Dr^a. Samara Alvachian Cardoso Andrade (Membro examinador)
Departamento de Engenharia Química / UFPE

Prof^a Dr^a. Roberta de Albuquerque Bento (Membro examinador)
Núcleo de Nutrição / Centro Acadêmico de Vitória / UFPE

Prof^a Dr^a. Silvana Magalhães Salgado (Membro examinador)
Departamento de Nutrição / UFPE

Dedico

Dedico esse trabalho a minha mãe, que hoje já não se encontra mais nesse mundo, mais desde do dia que se foi não tem um só dia da minha vida que não me lembre dela. Aprendi tantas coisas com você minha mãe que não seria suficiente essa página para descrevê-las, mas sem dúvida os maiores exemplos que pode ter deixado foi de superação, perseverança e amor não conheci alguém tão determinada, inteligente e corajosa quanto você, lembro-me das nossas conversas, dos seus carinhos, das suas palavras, dos seus elogios. Sempre desejei que você vivesse eternamente, mais por ironia, você se foi cedo demais. Mas quem somos nós para sabermos quando é chegada à hora certa de cada um, parece que nem sempre há explicação para o que acontece, mas no fim os fatos são justificados pela própria maneira como nos comportamos durante essa ou talvez outras existências e assim completamos mais um ciclo do que chamamos vida. Obrigada por todo esforço que fez para me conduzir por bons caminhos; Sinto tanto, por você ter partido, sem ter visto tantas bênçãos que recebi de Deus. Mesmo assim, essa vitória também te pertence. O teu exemplo foi meu maior incentivo nas horas difíceis, eu te amo mãe sempre.

AGRADECIMENTOS

Considerando a dissertação o resultado de muito estudo e dedicação, agradeço a todas as pessoas que nesse período passaram por minha vida e que de alguma forma contribuíram na construção de quem sou hoje, conseqüentemente no resultado desse trabalho. A ordem de agradecimentos não indica maior ou menor importância da contribuição, mas apenas a cronologia, visto que sem a ajuda, incentivo e apoio de qualquer um destes colaboradores o percurso seria muito mais difícil. Mas agradeço particularmente aos que marcaram de uma forma especial:

Em primeiro lugar a Deus, por me dar coragem o suficiente para não desistir, por me fazer acreditar ser possível realizar as coisas mais inesperadas e surpreendentes, pelas oportunidades que surgiram nesse caminho, pela saúde que me manteve forte e pelo amor mais puro que me confortou nas horas difíceis.

A virgem Maria, por passar na minha frente e resolver tudo aquilo que fui incapaz de resolver.

A minha mãe Darialva, pelo exemplo de mãe, pela mulher corajosa e inteligente que sempre foi.

Obrigada, por todos os momentos dedicados a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto, pela amizade.

Ao meu grande amor, Sérgio, por ser sempre parceiro e amigo, por nunca deixar de me incentivar a caminhar, e a ter forças para continuar; você é o porto seguro de todas as minhas angústias, medos e ansiedade; Sem o seu amor nada na minha vida, seria possível, muito obrigada meu amor, por nunca deixar de acreditar em mim, te amo.

Aos meus filhos Serginho, Matheus e Anna Sophia, por serem parte fundamental da minha existência, por compartilham dos meus dias e das minhas dificuldades de vencer cada momento. Vocês me fazem sentir especial e me dão coragem para continuar enfrentando os obstáculos da vida! Jamais se esqueçam do meu amor infinito por vocês.

Aos meus sogros Socorro e Pereira, o meu “muito obrigada” pois nos momentos mais difíceis, eu não consigo me lembrar de nenhum instante em que não tivesse recebido apoio e carinho da parte de vocês, sempre fui tão bem consolada e amparada que só posso mesmo agradecer por tudo.

Ao meu único e amado irmão Ricardo, você foi a maior e mais bela herança que minha mãe me deixou. Amo você.

A minha psicóloga Zoraide, obrigada por cuidar de mim, por me ensinar a tirar de dentro de mim, as ferramentas para vencer todas as minhas dificuldades. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido ter nenhum progresso livre de culpas.

As minhas amigas Cris, Ana Carla e Flávia, vocês sem sombra de dúvidas foram às melhores que se pode ter e cada qual com sua particularidade, mas indiscutivelmente especiais, obrigado, por taparem os meus buracos e serem muito mais que amigas; Obrigada por terem colocado em segundo plano, seus projetos, suas atividades, para me socorrerem no laboratório com todas as análises físico químicas. Cris eu não encontro palavras para agradecer tudo que você fez mim nesses dois anos de mestrado, todo apoio, ajuda, dedicação... Só peço que Deus, lhe cubra de proteção, saúde e felicidade e que você tenha a sorte de encontrar na sua caminhada pessoas, humanas, amigas e de coração puro como você e que lhe estenda as duas mãos como você me estendeu.

A Paula, Jamile e Michele pela disposição em me ajudar, pela dedicação em se mobilizar para me socorrer quando faltava qualquer coisa que pudesse atrapalhar o andamento dessa pesquisa, pela grande ajuda na análises microbiológicas, pelas caronas até o CAV, por toda a consideração que vocês tiveram por mim.

A Prof.^a Dr.^a Celiane Maia, serei eternamente grata por todas as oportunidades ofecidas a mim, desde a iniciação científica até o mestrado.

A Prof.^a Dr.^a Roberta Bento, por ter me acolhido em seu projeto;

A Prof.^a . Dr.^a Samara Andrade, pela colaboração com a estatística deste estudo e por ser uma pessoa tão doce e alegre.

A UFPE- CAV, por ter permitido que eu fizesse parte dos meus experimentos em seus laboratórios.

Ao programa de Pós- Graduação em ciência e tecnologia dos alimentos da UFRPE, pela possibilidade de executar esse trabalho.

A CAPES, pelo auxílio financeiro, concedido.

E por fim agradeço a mim, por ter fé o suficiente para acreditar que seria possível, por ter equilíbrio e paciência para agüentar tantas dificuldades, por tentar dar o melhor de mim, mesmo

que isso muitas vezes não tenha sido o bastante e por ser teimosa e perseverante em busca de crescimento e realização.

MUITO OBRIGADA!

"A fé em Deus faz crer no incrível, ver o invisível e realizar o impossível."

Santa Terezinha do Menino Jesus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. Queijo	05
2.1.1 Queijo Minas frescal	07
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> spp	10
2.3. Aditivos em alimentos	11
2.3.1 Quitosana na conservação de alimentos	13
3. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	19
4. OBJETIVOS	31
4.1. Geral	31
4.2. Específicos	31
5. RESULTADOS	33
5.1. ARTIGO 1: Bioatividade de Quitosana na inibição de <i>Staphylococcus aureus</i> spp em queijo tipo Minas frescal	33
6. CONCLUSOES GERAIS	61
7. ANEXOS	63

RESUMO

RESUMO

O queijo tipo Minas frescal tem ampla aceitação no mercado, devido à facilidade de produção, bom rendimento e curto período de maturação. Entretanto, por ser um produto com constituição rica em nutrientes e alta umidade, é bastante suscetível a contaminações por patógenos como *Staphylococcus aureus*, necessitando de atenção quanto ao método de conservação. Buscando prolongar a vida útil mantendo a qualidade de produtos processados e prontos para o consumo, o uso de antimicrobianos naturais como a quitosana, tem recebido grande enfoque ultimamente devido à ação antimicrobiana, biodegradabilidade e segurança. Assim, este estudo objetivou avaliar a bioatividade do gel de quitosana em diferentes concentrações na inibição de cepas de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal, bem como avaliar as modificações da adição desse antibacteriano nas características de qualidade (físico-química e sensorial) do produto. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada através do teste de macrodiluição em caldo queijo contendo quitosana em 5 diferentes concentrações, sob cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*. O queijo Minas frescal foi produzido em laboratório, e adicionado da quitosana por imersão do gel, na CBM encontrada, e a 20 mg/ml (concentração da quitosana utilizada como cobertura comestível). Os ensaios de interferências da quitosana sobre a cinética de inibição bacteriana foram realizados através do método de contagem de células viáveis nos intervalos de 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias pós-incubação com as amostras sob refrigeração a 4°C. As amostras com e sem quitosana, foram submetidos às análises físico-químicas (lipídeos, Aw, cinzas, proteínas e acidez) e sensoriais. Os resultados apontaram que a CBM em caldo queijo foi 5,0 mg/mL. O comportamento da cepa de *S. aureus* frente à quitosana foi comprovada nas concentrações utilizadas, entretanto, apesar da concentração de 20 mg/mL ter obtido maior redução, a utilização a 5 mg/ml conseguiu retardar o crescimento não diferindo estatisticamente da maior concentração. Os resultados da composição centesimal, pH e acidez do queijo Minas frescal com quitosana demonstraram discretas diferenças comparadas a amostra controle (sem quitosana), não levando a alterações na qualidade do produto final. Sensorialmente, ambas as amostras com quitosana apresentaram bons resultados, com notas variando entre 6,3 a 8,35, com destaque para o queijo com 5mg/mL de quitosana no atributo sabor. Portanto, os resultados obtidos refletem uma boa perspectiva de utilização de quitosana no processo de conservação de queijo Minas frescal.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, queijo Minas frescal, antimicrobianos naturais, quitosana.

ABSTRACT

ABSTRACT

The Minas fresh cheese is a cheese wide acceptance in the market due to the ease of production, good yield and short maturation period. However, this type of cheese is highly susceptible to contamination by pathogens such as *Staphylococcus aureus*, requiring attention as the method of preservation. Seeking to extend the life maintaining the quality of processed and ready for consumption, use of natural antimicrobials as chitosan has received much focus lately due to antimicrobial action, biodegradability and safety. Thus, this study aimed to evaluate the bioactivity of chitosan gel in different concentrations in inhibiting strains of *Staphylococcus aureus* in Minas fresh cheese type, as well as evaluating the modifications adding that the antimicrobial characteristics of quality (physico- chemical and sensory) of product. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was determined by testing broth macrodilution cheese containing chitosan at 5 different concentrations , in bacterial strains *Staphylococcus aureus*. The Minas fresh cheese was produced in the laboratory and added quitosona by immersion of the gel in the CBM found, and the 20 mg / ml (concentration of chitosan used as the edible coating) . Assays interference of chitosan on the kinetics of bacterial inhibition made by the method of viable cell count in the ranges of 1, 2, 5, 10, 15 and 20 days post-incubation with the sample under refrigeration at 4 ° C. Samples with and without chitosan, were subjected to physicochemical analysis (lipids , Aw , pH , ash , protein and acidity) and sensory. CBM found in cheese broth was 5.0 mg / ml. The behavior of the strain of *S. aureus* front chitosan was confirmed at the concentrations used, however, although the concentration of 20 mg / mL have obtained a greater reduction, the use of 5 mg / ml could slow the growth did not differ statistically highest concentration. The results of the proximate composition, and acidity of Minas fresh cheese with chitosan showed subtle differences compared to the control sample (without chitosan), not leading to changes in the quality of the final product. Sensory, both samples with chitosan showed good results, with grades ranging from 6.3 to 8.35, highlighting the cheese with 5mg/mL chitosan in flavor attribute. Therefore, the results obtained reflect a good perspective on the use of chitosan in the preservation of Minas fresh cheese .

Keywords: *Staphylococcus aureus*, Minas fresh cheese, natural antimicrobial, chitosan.

INTRODUÇÃO

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 (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 et al., 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).

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 consequências, como: febre, dor de cabeça, diarreia e até a morte, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública (LOGUERCIO, et al., 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)

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).

Quitosana é um polissacarídeo que pode ser obtido a partir de crustáceos e alguns fungos, mas usualmente é obtida a partir da desacetilação da quitina em meio alcalino. Por ser um polímero muito versátil, a aplicabilidade da quitosana tem sido cada vez mais ampliada, indo desde o uso para a terapia genética, até a indústria alimentícia, como base na elaboração de suplementos nutricionais, emulsificantes, fibras em biscoito dietéticos, estabilizantes em alimentos em conserva, clarificantes de bebidas (SHAHIDI *et al.*, 1999; BORDERÍAS *et al.*, 2005; BORGOGNI *et al.*, 2006; LI *et al.* 2007); como agente conservante em macarrão, molho de soja, sardinha (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002), bacalhau (SHAHIDI *et al.*, 2002), carne de cordeiro (KANATT *et al.*, 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI *et al.*, 2006), patê de carne (BENTO, 2011); suco de acerola (ALBUQUERQUE e STAMFORD, 2011); como biofilme protetor em caju (OLIVEIRA, 2011), mamões (ALI *et al.*, 2011), e em maçãs (ASSIS e LEONI, 2003). As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas; além de uma capacidade de interagir com várias substâncias, como lipídeos e proteínas (CAMPANA *et al.*, 2007).

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.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEIJO

Historicamente o queijo remonta ao berço da civilização antiga (6000 – 7000 a.C.), na região entre os rios Tigres e Eufrates. Estudos arqueológicos revelaram que provavelmente a descoberta deste alimento tenha sido por acaso. Desenhos de cabras sendo conduzidas ao pasto com alguns sacos de pele pendurados em tumbas egípcias nos anos de 100 a.C. Por serem um meio adequado para armazenamento de líquidos, acreditava-se que estes sacos poderiam ser usados para guardar e transportar leite. Por causa do intenso calor da região os açúcares do leite eram fermentados resultando, em contato com enzimas presentes no couro, em uma coalhada que por causa da agitação resultante do transporte se romperia separando então o soro do que foi chamado de queijo primitivo (salgado) (PERRY, 2009).

O primeiro evento de importância para o desenvolvimento da indústria queijeira no Brasil ocorreu em 1880, quando o português Carlos Perreira de Sá Fortes trouxe dois mestres queijeiros da Holanda, Bock e Young que introduziram na Zona da Mata (mais precisamente em Palmyra, hoje Santos Dumont) uma adaptação do queijo Edam. Como todos os produtos importados de Portugal recebiam a denominação “Do Reino”, este queijo ficou assim conhecido. Porém, há relatos datados do século XVIII de que o mais antigo queijo brasileiro seja o queijo Minas (SEBRAE, 2009).

Segundo a Portaria 146/1996 do Ministério da Agricultura, DIPOA (Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal), entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Do ponto de vista nutricional, o queijo é considerado um alimento altamente nutritivo devido aos teores de proteína, com grande quantidade de aminoácidos essenciais, lipídeos, carboidratos, sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas, principalmente as vitaminas A (retinol), D (calciferol) e as do complexo B

(BERESFORD, et al 2007). O queijo é elaborado com leite integral, creme de leite, leite desnatado, ou uma mistura destes produtos. Um queijo com 48 % de gordura contém aproximadamente 23 – 25 % de proteína. Comparativamente, isto significa que 210 gramas desse produto equivalem a 300 gramas de carne, em quantidade proteica (JENSEN; KROGER, 2008; PERRY, 2009).

Quimicamente, é uma mistura de caseína, gordura láctea e outros componentes do leite que se separa das matérias-primas por técnicas adequadas. Este processo de separação é favorecido adicionando-se enzimas, acidificando e/ou por aquecimento (JENSEN; KROGER, 2008).

No Brasil e no mundo, o queijo é um dos produtos lácteos que mais se difundiu e um dos que mais sofreu adaptações da técnica de elaboração. Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação ocasionam, conseqüentemente, o surgimento dos vários tipos existentes, cerca de 2.000 tipos no mundo. A tecnologia de fabricação compreende as seguintes etapas básicas: seleção e pasteurização do leite, coagulação do leite, corte da coalhada para liberação do lactosoro, enformagem e prensagem, salga e embalagem (PERRY, 2009).

A boa qualidade microbiológica do leite é fundamental para a preparação de bons queijos. É necessário animais sem mastite, utilização de boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados, resfriamento do leite à temperatura e ao tempo adequados e pasteurização eficiente (FURTADO, 2008).

No Brasil a produção de queijos apresenta uma curva crescente. Em 2011 foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país, 9,4% a mais que em 2010. A tendência para os próximos anos é que a produção de queijos aumente, pois a demanda, impulsionada pelo aumento no poder aquisitivo tende a crescer. Em 2012 o crescimento da produção de queijos deve ter sido próximo a 10,0% e em 2013 deve ultrapassar 1,0 milhão de toneladas (ABIQ, 2013).

O Brasil não apresenta uma forte cultura ligada ao consumo de queijos. O hábito alimentar brasileiro inclui queijos basicamente no desjejum e, eventualmente, no lanche que venha substituir o jantar.

De acordo com a classe social, praticamente 50% do volume consumido é realizado pelas de maior poder aquisitivo, ou seja, classes A/B e por famílias com a presença de adolescentes e com filhos adultos, principalmente para requieijão. O

consumo total de queijos é fortemente influenciado pelo consumo fora do lar (restaurantes/*fast food*) e pelo consumo indireto (pratos prontos ou semi-prontos) (SEBRAE, 2008).

Quanto ao consumo domiciliar, com base na Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009 realizada pelo IBGE, os tipos de queijo mais consumidos no Brasil são Minas, principalmente na Região Sudeste, e Mussarela, seguidos por Prato (com destaque para a região Sul) e Requeijão (POF, 2013). Porém, pelo fato do Queijo Minas ser um dos queijos com maior produção informal, seu volume nas estatísticas oficiais de produção de queijo é bem menor que a realidade (SEBRAE, 2008).

2.1.1 Queijo Minas frescal

Segundo a Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 1997), através da Resolução MERCOSUL nº 145/96 (BRASIL, 1996a), o queijo Minas Frescal é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas na forma de uma massa coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada. É classificado como queijo semigordo de alta umidade a ser consumido fresco, de consistência branda e macia, com ou sem olhaduras mecânicas, de cor esbranquiçada, de sabor suave a levemente ácido, sem ou com crosta fina, de forma cilíndrica e com peso de 0,3 a 5 Kg.

O Ministério da Agricultura, em março de 2004, por meio da Instrução Normativa nº 04 (BRASIL, 2004) corrigiu a classificação da umidade, considerando o Minas frescal como queijo semigordo (de 25 a 44,9 % de gordura no extrato seco) de muito alta umidade (não inferior a 55 %).

Produzido com leite de vaca, é caracterizado por sua massa branca, consistência mole, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, sabor suave a levemente ácido (BRASIL, 1997; NASCIMENTO et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009).

Queijos macios, brancos, frescos e que estão sujeitos a processo mínimo antes de empacotar, são altamente perecíveis e assim têm uma vida de prateleira curta, até mesmo sob refrigeração (SILVA et al., 2008). Segundo a Resolução RDC nº145/96 do MAPA - Brasil (1996a), o queijo Minas frescal deve ser embalado em embalagens adequadas e acondicionado a temperaturas não superiores a 8 °C.

As características próprias deste queijo são pH acima de 5,0, baixo conteúdo de sal (1,4 – 1,6 %) e ausência de conservantes (CARVALHO et al., 2007; SOUZA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2008). No entanto, este queijo não foi bem definido quando às suas propriedades físicas e químicas por não ter sido consolidada uma padronização do queijo e pela diversidade de processos de fabricação (ABIQ, 2011).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades da indústria de laticínios. O queijo Minas frescal apresenta bom rendimento, que proporciona na fabricação, além de possuir um processamento simples e breve período necessário para a maturação do produto final. Isto possibilita um retorno rápido do investimento e menores custos de produção por não necessitar de muitos investimentos em estocagem e conservação, possibilitando a comercialização a preços mais acessíveis a uma maior faixa da população (FURTADO; LOURENÇO NETO, 2006).

Os queijos frescos possuem tipicamente um alto teor de umidade, baixa acidez e textura macia. Estas características favorecem o desenvolvimento de bactérias que, em adição da vida de prateleira limitante deste produto, pode torná-lo perigoso à saúde dos consumidores (NALDINI et al., 2009).

O queijo Minas frescal é um produto indicado para consumo imediato e de curta vida de prateleira, devendo ser comercializado logo após a sua fabricação. O prazo de validade estimada pelos fabricantes varia de 15 a 30 dias, no entanto Rocha et al.(2006) encontraram amostras impróprias para o consumo já a partir do sétimo dia da data de fabricação, além dos queijos estudados mostravam-se visivelmente deteriorados já aos 21 dias e, portanto, não foram analisados em períodos posteriores, mesmo quando prazos de validade mais extensos eram indicados na embalagem.

Desta forma, as características do Minas frescal aumentam o risco potencial da incidência de bactérias patogênicas, que estão frequentemente associadas a surtos de doenças alimentares. Contaminações por *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* podem ser encontradas neste produto (CARVALHO et al., 2007; LITTLE et al. 2008; NASCIMENTO et al., 2008).

Após a pasteurização o leite não possui uma microbiota dominante, assim na elaboração de certos queijos procede-se à adição de culturas lácticas, as quais fermentam a lactose, formando ácido láctico, o que diminui o pH e beneficia a ação da renina (ESKIN, 1990). Na fabricação do Minas frescal, isso é opcional, permitindo

a aplicação direta do ácido láctico (BRASIL, 1997). As bactérias lácticas causam transformações bioquímicas de lipídios e proteínas, que aumentam o índice de proteólise e lipólise no queijo Minas frescal produzido com leite pasteurizado (ISEPON; OLIVEIRA, 1993).

Durante a fabricação do queijo Minas frescal podem ocorrer perigos que irão comprometer o produto final, dentre eles destacam-se: alta contaminação microbiológica da matéria-prima, recontaminação do leite pós-pasteurizado e temperaturas inadequadas de fabricação e de armazenamento (SANTOS; NOGUEIRA; CUNHA, 1995). Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são fundamentais para a garantia de um produto de qualidade (PICOLI et al., 2006).

Os tipos de microrganismos no leite e queijo podem ser aumentados tanto pela contaminação quanto pelo crescimento dos microrganismos já presentes. Os métodos de produção, manipulação e manufatura devem ser muito bem delineados para evitá-los. As mais importantes fontes de contaminação são as superfícies de contato com o leite e as mãos dos trabalhadores da indústria leiteira, embora a cultura láctea iniciadora, o cloreto de cálcio, o coalho e a salmoura possam também exercer alguns efeitos sobre a qualidade do queijo (ROBINSON; TAMIME, 2002).

Apesar de no Brasil existir a proibição legal de comercialização de queijos frescos e moles, elaborados a partir de leite cru, a comercialização de queijo Minas frescal produzido artesanalmente é realizada abertamente, especialmente em feiras livres e mercados públicos.

Dentre os microrganismos mais relevantes encontrados em leite e derivados, como os queijos, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja transmissão pode ocorrer tanto pelo leite contaminado por vacas que apresentem mastite estafilocócica como pela manipulação e contaminação através do ser humano (GERMANO; GERMANO, 2001). Sua presença em queijos está associada a práticas de higiene e manipulação inadequadas, sendo este alimento um dos principais veículos causadores de toxinfecção alimentar (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

2.2 Staphylococcus Aureus

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococaceae e inclui mais de 30 espécies (JAY, 2005). Tais organismos são ubíquos podendo ser encontrados nas

membranas mucosas e pele dos animais de sangue quente. São cocos Gram positivos, com diâmetro aproximado de 0,8 a 1,0 micrômetros (μm), que se dividem em diferentes planos, formando conjuntos irregulares de células. Não formam esporos, mas são resistentes ao dessecamento, sendo provavelmente disseminados pelas partículas de poeira presentes no ar e superfície (MADIGAN et al., 2004).

São imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos e coagulase positivos ou negativos, fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, podendo multiplicar-se em baixa atividade de água. São mesófilos, podendo crescer na temperatura entre 7 a 48°C, com temperatura ótima de crescimento entre 30° e 37°C. Podem desenvolver-se em concentrações elevadas de sal (7 a 10%), sendo relatados casos de até 20% (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Entre os *Staphilococcus*, as espécies coagulase positiva, *S. aureus*, e duas espécies coagulase negativas, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, são encontradas com frequência em infecções humanas (KONEMAN et al., 2001). Vários indivíduos saudáveis são portadores, entre 20 a 40%, e na maioria dos casos esses estafilococos residentes não provocam doenças sendo as fossas nasais, cavidade da orofaringe e pele os grandes reservatórios (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

S. aureus é um importante patógeno de origem alimentar devido à capacidade de produzir uma grande variedade de proteínas extracelulares, toxinas e fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade (JOHNSON et al., 2007).

Muitas linhagens de *Staphylococcus* são capazes de produzir uma ou mais enterotoxinas (CARMO et al., 2002). As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são polipeptídeos de cadeia simples, hidrossolúveis, de peso molecular entre 26.000 e 29.000 Daltons e resistentes a ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimiotripsina, papaína e renina (BERGDOLL, 2004). Apresentam também a propriedade de termorresistência, o que constitui ponto crucial no controle de qualidade de alimentos, já que estas podem estar presentes no produto final mesmo após processamento térmico (BORELLI, 2006).

As enterotoxinas estafilocócicas são classificadas de acordo com o tipo sorológico. A produção destas enterotoxinas é afetada pela qualidade nutricional e pH do substrato, temperatura, atmosfera, quantidade de NaCl (sal) e atividade de água (aw), outros compostos químicos e microrganismos competidores. Os alimentos que contêm a enterotoxina pré-formada são geralmente inalterados no que se refere ao odor, aparência e sabor (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Acredita-se que seja necessária entre 10^5 e 10^6 UFC (unidades formadoras de colônias) de *Staphylococcus aureus* por grama ou mL de alimento para que haja produção de enterotoxinas em quantidade suficiente para causar intoxicação alimentar (FERNANDES et al., 2006).

Durante muito tempo *Staphylococcus aureus* foi considerado a única espécie do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, bem como de produzir coagulase. Posteriormente outras espécies relacionadas a surtos de intoxicação alimentar foram identificadas, em função deste fator houve uma mudança na legislação brasileira que passou a estabelecer a pesquisa e enumeração de estafilococos coagulase positiva ao invés da enumeração *Staphylococcus aureus* (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

De acordo com a resolução RDC nº. 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), o padrão microbiológico para *Staphylococcus* coagulase positiva é de no máximo 5×10^2 UFC/g.

Pesquisa realizada por Ferreira et al. (2011) em queijo minas frescal artesanal comercializados em diferentes feiras livre da cidade de Uberlândia – MG, verificaram que de 20 amostras analisadas quanto a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, apenas 2 (10%) estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 2001).

Salotti et al. (2006) verificaram que de 30 amostras de queijo minas frescal artesanal analisadas na cidade de Jaboticabal, SP, 6 (20%) apresentaram contagens acima do padrão permitido para *Staphylococcus* coagulase positiva, variando entre 5×10^3 UFC/g a $> 5 \times 10^4$ UFC/g.

2.3 ADITIVOS EM ALIMENTOS

Segundo a Portaria nº 540/97 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997), aditivo é definido como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação do alimento. Ao agregar-se, poderá resultar na conversão do próprio aditivo ou de seus derivados em componente(s) do alimento.

Esta definição não inclui os contaminantes ou as substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

A utilização de aditivos químicos na matriz alimentar é uma das práticas mais discutidas e polêmicas. Seus aspectos negativos e positivos relacionados à toxicidade de muitas dessas substâncias, tem gerando controvérsias. Dessa forma a indústria alimentícia adota uma nova postura com o crescimento de uma política decrescente de uso de aditivos químicos e estimulação de medidas eficientes e menos prejudiciais a saúde na preservação de produtos industrializados, como a utilização de antimicrobianos naturais (FAI et al., 2008).

A polêmica em torno do uso de conservantes em alimentos ocorre, principalmente, em virtude da possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica. Dessa forma, é imprescindível estabelecer medidas preventivas substanciais para efetivar o controle de qualidade e a vigilância sanitária objetivando minimizar os efeitos tóxicos causados pela adição de aditivos (MELO et al. 2004).

Diante das crescentes mudanças no processamento industrial e exigência do consumidor por alimentos mais naturais, nutritivos, com uma vida útil prolongada, que seja mantida a qualidade nutricional e sensorial, novos tratamentos ganham destaque como as tecnologias não térmicas, diferentes sistemas de embalagens, biopreservação e produtos antimicrobianos naturais como sistema lactoperoxidase, bacteriocinas, lisozima, quitosana e os derivados vegetais (DEVLIEGHERE et al., 2004; FAI et al., 2008).

O aumento na procura por antimicrobianos naturais, que apresentem uma ação sinérgica à dos conservantes químicos para o emprego em produtos alimentícios, tem sido difundido desde os anos 80, uma vez que os aditivos químicos do tipo conservante estão sendo gradativamente restringido devido aos efeitos causados (MOREIRA et al., 2005).

Dentre os antimicrobianos naturais, a quitosana vem sendo estudada em queijo de alta umidade, uma vez que possuem um amplo espectro bactericida sob microrganismos patogênicos contaminantes do queijo (CHI et al., 2006; FAI et al., 2008; BENTO et al., 2011).

2.3.1 Quitosana na conservação de alimentos

Quitosana é um polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza, atóxico, obtido por processo de baixo custo, de grande interesse ambiental (biodegradável), produzido através dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e parede celular de fungos (BORDERÍAS et al., 2005).

A quitosana é um polímero de D-glucosamina, derivada da desacetilização da quitina, sendo encontrada naturalmente na parede celular de fungos, principalmente aqueles da classe *Zygomycetes* (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008), que podem apresentar até 50% deste na sua estrutura (ZAMANI et al., 2010). Esse polissacarídeo é solúvel em soluções aquosas, diluídas de ácidos orgânicos e inorgânicos e apresenta: uma excelente biocompatibilidade; quase nenhuma toxicidade ao ser humano e animais; alta bioatividade; biodegradabilidade; reatividade do grupo amino desacetilado; permeabilidade seletiva; ação polieletrólítica; atividade antimicrobiana; habilidade em formar gel e filme; habilidade de quelação e capacidade adsortiva (SINGH; VESENTINI; SINGH, 2008).

Além das vantagens apresentadas, a quitosana está inclusa pela ANVISA (BRASIL, 1999) na lista de "Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos", tendo como propriedade o auxílio na redução da absorção de gordura e colesterol, devendo o seu consumo estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. A mesma legislação exige que no rótulo dos produtos contenham a frase de advertência em destaque e negrito: "Pessoas alérgicas a peixes e crustáceos devem evitar o consumo deste produto". Quando apresentada isolada em cápsulas, tabletes, comprimidos, pós e similares, a seguinte informação, em destaque e em negrito, deve constar no rótulo do produto: "O consumo deste produto deve ser acompanhado da ingestão de líquidos".

Por ser um polímero muito versátil, a aplicabilidade da quitosana tem sido cada vez mais ampla, indo desde o uso para a terapia genética, até a indústria alimentícia, como base na elaboração de suplementos nutricionais, emulsificantes, conservantes, fibras em biscoito dietéticos, estabilizantes em alimentos em conserva, clarificantes de bebidas (SHAHIDI et al., 1999; BORDERÍAS et al., 2005; BORGOGNI et al., 2006; LI et al., 2007); como agente conservante em macarrão, molho de soja, sardinha (RODRÍGUEZ et al., 2002), bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro

(KANATT et al., 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI et al., 2006), patê de carne (BENTO, 2011); suco de acerola (ALBUQUERQUE e STAMFORD, 2011); como biofilme protetor em caju (OLIVEIRA, 2011), mamões (ALI et al., 2011), e em maçãs (ASSIS e LEONI, 2003;). As possibilidades de aplicações são ainda enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas; além de uma capacidade de interagir com várias substâncias, como lipídeos e proteínas (CAMPANA *et al.*, 2007).

Quitosana e seus derivados têm sido amplamente pesquisados como agentes antimicrobianos, e nos últimos anos têm recebido uma atenção especial, graças aos resultados apresentados na inibição do crescimento de bactérias, fungos e leveduras. A quitosana apresenta propriedades biológicas, como biocompatibilidade, biodegradação, bioreabsorção e bioatividade (HIRANO et al., 2008).

Alguns trabalhos sugerem que a atividade antimicrobiana da quitosana é devido ao grupamento amino em sua forma policatiônica, na presença de pH abaixo de 6. Nessas condições, a quitosana é capaz de interagir com as cargas negativas da membrana celular do microrganismo, causando mudanças na permeabilidade da membrana plasmática, e perda de componentes intracelulares (AVADI et al., 2004; TSAI; HUANG, 2004; YADAV; BHISE, 2004). Essa propriedade da quitosana, foi testada por Liu *et al.* (2004) que observaram efeito inibitório do crescimento dos microrganismos *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Candida albicans* na presença do complexo quitosana-betaína, sendo que o mesmo ocorreu utilizando apenas a quitosana, com exceção de *C. albicans*. Esses autores também sugerem que a quitosana pode se ligar a superfície da célula formando um filme ao redor desta, dificultando o transporte de nutrientes pela membrana plasmática.

De acordo com AZEVEDO et al. (2007); o mecanismo de ação da quitosana sobre os microrganismos ainda não está bem definido, mas várias propostas são sugeridas, como:

- Ligação da quitosana à membrana da célula do microrganismo carregada negativamente, resultando na perda de componentes intracelulares.

- Outra possibilidade é dada em função da ação quelante da quitosana, que se liga seletivamente a traços de elementos ou nutrientes essenciais, bem como inibir o crescimento bacteriano.

Associado a isso, a quitosana possui ação de ativação de diversos mecanismos de defesa nos hospedeiros, pois age sequestrando água e inibindo várias enzimas (SANTOS et al., 2008).

Possui uma estrutura molecular semelhante, quimicamente, a celulose (Figura 1), diferenciando-se somente nos grupos funcionais (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana é geralmente obtida pela desacetilação da quitina, que é tido como o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, que constitui os exoesqueletos de insetos e crustáceos e que ocorre naturalmente em alguns fungos, como aqueles pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes* (KAFETZOULOS et al., 2003).

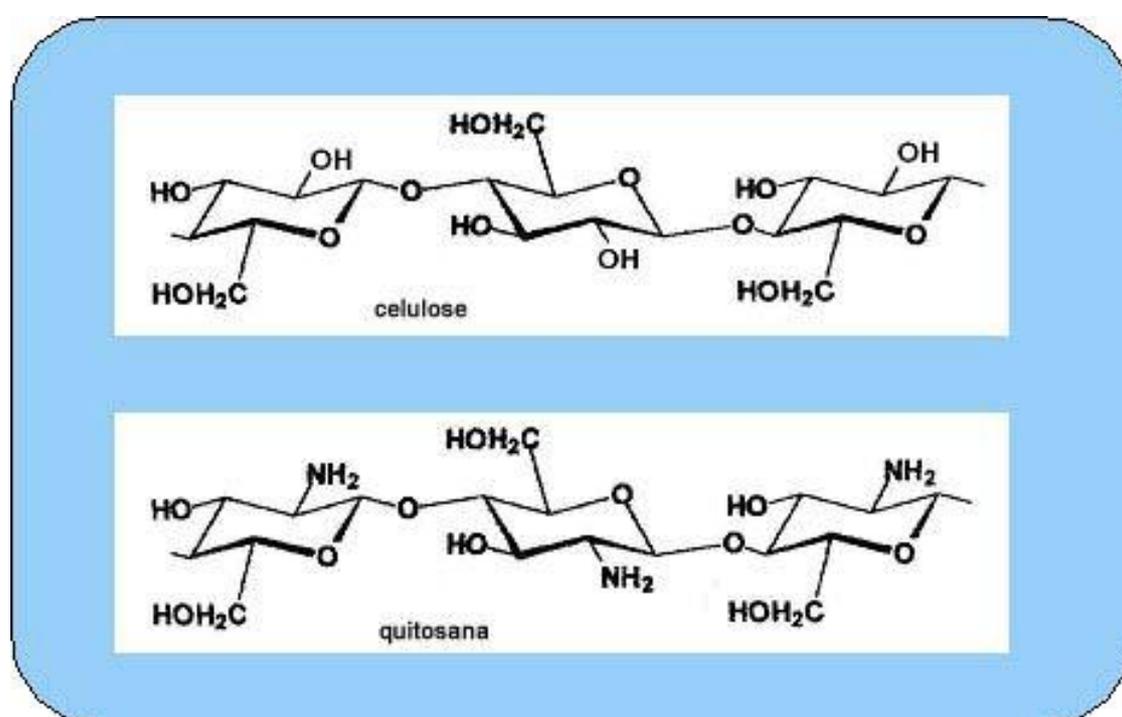


Figura 1. Comparação das estruturas moleculares da celulose e da quitosana

Fonte: AZEVEDO et al., 2007

Quitosana já está regulamentada pela ANVISA como novo ingrediente, de acordo com a Resolução nº 16/99 (BRASIL, 1999) que defini alimentos e ou novos ingredientes como alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto, venham ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular.

Polímeros naturais têm sido utilizados na elaboração de filmes e revestimentos comestíveis, demonstrando ser uma técnica eficaz de preservação de frutas e hortaliças, para manter a aparência, frescor, firmeza e o brilho, aumentando seu valor comercial. A quitosana possui habilidade de formar um filme semi-permeável, podendo modificar a atmosfera ao redor de vegetais diminuindo as perdas por transpiração e desidratação, além de atrasar o amadurecimento e o escurecimento enzimático de alguns frutos (VILLADIEGO et al., 2005).

Estudo avaliando a ação antifúngica de filmes de quitosana sobre uva “Itália” demonstrou que as soluções de quitosana, nas concentrações de 1,5 e 2,0%, suprimiu o crescimento micelial e retardou a germinação do bolor *Botrytis cinérea*, considerado o agente de maior incidência na deterioração desta fruta durante seu transporte e armazenamento (CAMILLI et al., 2007).

Botreal et al. (2007) submetem alho minimamente processado à revestimentos comestíveis antimicrobianos a base de amido de mandioca, quitosana e glicerol. O tratamento composto pelos constituintes combinados, sendo a amostra com 0,5% de quitosana a que apresentou menores contagens de psicotróficos e bolores e leveduras durante 20 dias de armazenamento a 10°C.

Bento et al. (2011) avaliou a bioatividade de quitosana produzida por *Mucor rouxii* no controle de *Listeria monocytogenes* em patê de carne e verificaram inibição deste microrganismo, com redução de 3 log UFC.mL ao longo de 6 dias a 4°C. Neste mesmo estudo, ao longo dos intervalos avaliados, o patê com quitosana mostrou contagens significativamente inferiores ($p < 0,01$) de *L. monocytogenes* em relação ao ensaio de controle.

Garcia (2010) em estudo utilizando 1% de quitosana na formulação de salsichas embaladas à vácuo não verificaram diferença significativa entre a amostra controle (sem quitosana) e o tratamento sobre o crescimento microbiano durante seis dias de armazenamento. Este resultado foi atribuído pelos autores à concentração de quitosana utilizada na formulação.

Na produção de queijos, por exemplo, os conservantes são adicionados diretamente na massa ou, em alguns casos, o produto é imerso em uma solução do antimicrobiano. Modernamente se propõe que o agente antimicrobiano esteja no próprio invólucro e seja liberado ao longo do maior tempo possível, de maneira a preservar o produto, aumentando sua vida de prateleira.

Diante dessa perspectiva, a tecnologia de biofilmes antimicrobianos vem despertando o interesse de pesquisadores que procuram compreender e controlar os mecanismos que determinam a transferência para a superfície do alimento de agentes ativos incorporados na matriz polimérica de que é constituído o filme. Diante da constatação de que na maioria dos alimentos sólidos e semi-sólidos o crescimento microbiano ocorre na superfície, surge a possibilidade da utilização de menores quantidades de conservantes químicos em relação ao que se utiliza quando adicionados diretamente no produto.

Tsai e Hwang (2004), avaliando a atividade antimicrobiana *in vitro* frente a algumas bactérias patogênicas e probióticas, verificaram que para a quitosana com grau de desacetilação entre 70% e 95%, a concentração mínima letal para *E. coli*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *V. parahemoliticus*, *L. monocytogenes* e *Shigella dysenteriae*, variou de 50 ppm a 200 ppm, enquanto que, para *Clostridium perfringens* e bactérias probióticas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, oscilou entre 250 ppm e 1.000 ppm. Altieri et al. (2005) constataram em queijo mussarela inibição do crescimento de coliformes e *Pseudomonas* spp. e relataram que a presença desse polissacarídeo não afetou a viabilidade e o crescimento das bactérias ácido-láticas, utilizadas como culturas iniciadoras no processamento desse queijo. Esses resultados sugerem que o uso de quitosana pode ser uma opção viável e vantajosa para o prolongamento da vida útil desse produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Informações sobre tipos de queijo no Brasil.** (2011) Disponível em: <www.abiq.com.br>. Acesso em: abril de 2013.

ABIQ - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Informações sobre Produção de queijos no Brasil em 2013.** Disponível em: <www.abiq.com.br>. Acesso em: maio de 2013.

ALBUQUERQUE, T. O.; STAMFORD, T. L. M. 2011. Ação antifúngica da quitosana para estender a vida de prateleira do suco de acerola. **XIX CONIC, III CONITI, VII JOIC**, Recife, UFPE.

ALI, A.; MUHAMMD, M. T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI. 2011. 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.

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, Oct. 2004.

ASSIS O.B.G., LEONI A.M., Quitosana como biofilme protetor em maçãs Biotec. **Ciênc. Desenv.**, 30, 33. 2003.

ASSUMPÇÃO, E. G.; PICCOLI-VALLE, R. H.; HIRSCH, D. et al. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 3, p. 366-370, 2003.

AVADI, M.R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as na antimicrobial agente: syntesis, characterization, and antibacterial effects. **Eur Polym J**, v. 40, p. 1355-1361, 2004.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v.2, n.3, p. 27-34, dez. 2007.

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, mar. 2011.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11; p. 259-274, 2007.

BERGDOLL, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2004. p.463-523.

BORDERÍAS, A. J.; SÁNCHEZ-ALONZO, I.; PÉREZ-MATEOS, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. **Trends in Food Science e Technology**, v. 16, p. 458-465, 2005.

BORELLI, B.M. **Melhoria da qualidade do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), 2006. 19 p

BORGOGNI, C. F., POLAKIEWICZ, B., PITOMBO, R. N. M. 2006. Estabilidade de emulsões de D-limoneno em quitosana modificada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p. 502-508.

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. Portaria n° 368, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos elaboradores/ industrializadores de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1.

BRASIL. Portaria n°. 540, de 27 de outubro de 1997. ANVISA/MS. **Regulamento Técnico de Aditivos Alimentares** – definições, classificação e emprego, Diário Oficial da União, Brasília, DF, (Brasil): Ministério da Saúde, 1997. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. **Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos**. Brasília, 1999.

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.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 16, de 30 de abril de 1999, **Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de alimentos e ou novos** – definições, classificação e emprego, Diário Oficial da União, Brasília, DF, (Brasil): de 03 de dezembro de 1999.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. MAPA. Resolução RDC nº145 de 13 dez de 1996. **Regulamento técnico MERCOSUL de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal**, 1996a.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite e produtos lácteos**. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p.19684.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Instrução Normativa nº44**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 05 mar. 2004. Seção 1, p. 5.

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.

CAMPANA, S. P. et al. Extração, estruturas e propriedades de α - e β - quitina. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M.E. de; PENA, E.C.; JETT, M.; HENEINE, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

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.

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. 2005. Efeito da quitosana na digestibilidade aparente da gordura e na qualidade de salsichas Frankfurt. **Tese (Doutorado em nutrição)**. Florianópolis, Brasil.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v.21, n. 6, p. 703–714, ago. 2004.

ESKIN, M. N. A. **Biochemistry of foods**. 2 ed. London: Academic Press, 1990. 557 p.

FAI, A. E. C. Potencial do efeito antibacteriano *in vitro* de quitosana extraída de *Mucor circinelloides* UCP 050: uma abordagem para uso em teste de conservação de alimentos. 2008. 943 p. **Dissertação (Mestrado em Nutrição)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

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.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C. A.F.; Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: Questão de saúde pública. **Higiene Alimentar**, v. 20, p.49 - 56, 2006.

FERREIRA, R.M.; Spini, J. C. M.; Carrazza, L. G.; Sant'ana, D. S.; Oliveira, M. T.; Alves, L. R.; Carrazza, T. G. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 5, Ed. 152, Art. 1021, 2011.

FRANCO, Bernardete D. G. M.; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Ed.Globo, 2008. 297p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. Tecnologia de queijos. São Paulo: Dipemar, 2006. 112p. **Manual técnico para a produção industrial de queijos**.

GARCIA, M., Influência da adição de quitosana sobre a qualidade de salsichas embaladas a vácuo. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 2010, vol.30, n.2, pp. 560-564.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda. 629 p. 2001.

HIRANO, S. (2008). Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administrations. **Polymeric Materials Science and Engineering**, Washington, v.59, p.897-901.

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

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas frescal. **Ciência Agrícola**, v. 50, n. 3, p. 451-454, out./dez. 1993

JAY, J. M. **Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Editora Acribia, 711 p., 2005.

JENSEN, R. G.; KROGER, M. The importance of milk and milk products in the diet. In: MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; McBEAN, L. D. Handbook of **Dairy Foods and Nutrition**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008. p. 51–52.

JOHNSON WM, TYLER SD, EWAN EP, ASHTON FE, POLLARD DR, ROZEE KR . Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxin shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase chain reaction, 2007 **J. Clin. Microbiologi.** 29: 426-430.

KAFETZOULOS, D.; MARTINOV, A.; BOURIOTIS, V. **Em Chitin Enzymology;** Muzzarelli, R. A. A., ed., European Chitin Soc: Ancona, 2003, p. 147.

KANATT, S. R., CHANDER, R., SHARMA, A. 2004. Effect of irradiated chitosan on the rancidity of radiation-processed lamb meat. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p. 997-1003.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**. 5.ed., Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. 1465p.

LITTLE, C. L.; RHOADES, J. R.; SAGOO, S. K.; HARIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI. V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiology**, v. 25, p. 304–312, 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.

LIU, H.; DU, Y.; YANG, J.; ZHU, H. Structural characterization and antimicrobial activity of chitosan/betaine derivative complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 291-297, 2004.

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

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10a. ed. Prentice-Hall Inc., 2004. 608p.

MELO, F. A. B.; BISCONTINI, T. M. B.; ANDRADE, S. A. C. Níveis de nitrito e nitrato em salsichas comercializadas na região metropolitana do recife. **Revista Ciência e Tecnologia Alimentos**, v.24, n.3, p. 390-392, 2004.

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

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n. 5, p.565-570, 2005.

NALDINI, M. C. M.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. Behaviour of *Listeria monocytogenes* inoculated into Minas Frescal cheese made by direct acidification or lactic culture during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p. 203-207, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MORENO, I.; KUAYE, A. Y. Applicability of bacteriocinproducing *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as adjunct starter in Minas Frescal cheesemaking. **International Journal of Dairy Technology**, v. 61, n. 4, p.460-465, 2008.

OLIVEIRA, B. S. DE; NUNES, M. L. 2011. Avaliação de quitosana de caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*) como biofilme protetor em caju. **Revista Scientia Plena**, v. 7, n. 4.

PERRY, K. S. P. Queijo: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química nova**, São Paulo, v 27, n. 2 p. 293- 300, 2009.

PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 1, n. 26, p. 64-69, jan./mar. 2006.

POF – Pesquisa de Orçamento Familiar. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/default.shtm, acesso em: janeiro de 2013.

RIBEIRO, E. P.; SIMÕES, L. G.; JURKIEWICZ, C. H. Desenvolvimento de queijo Minas Frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 19-23, 2009.

ROBINSON R. K.; TAMIME A. Y. Maintaining a clean working environment. In ROBINSON R. K. (Ed.). **Dairy microbiology** handbook. New York: Wiley-Interscience, 2002. p. 561–590.

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

RODRÍGUEZ M.S., CENTURIÓN M.E., AGULLÓ E., Quitosana Como Agente Conservante Em Macarrão, Molho De Soja, Sardinha. **J Food Scienci**, 67 (7), 2576 2002.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, C. F. B.; AMARAL, A.; MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas fresco comercializado no

Município de Jaboticabal, SP, no período de julho a dezembro de 2002. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANTOS, C.A.A.; CASTRO, J.V.de; 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.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – CE. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 1, p. 31-36, jan./jun. 1995.

SEBRAE, disponível em www.sebrae.com.br **História do queijo no Brasil**, 2009. Acesso em abril de 2013.

SEBRAE, **Queijos Nacionais – Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM**. Relatório Completo, 2008.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI JK,V.; JEON, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 37-51, 1999.

SHAHIDI F., KAMIL J., JEON Y.J and KIM S.K., 2002. Antioxidant role of Chitosan in a cooked cod (*Gadus morhua*) model system. **J Food Lipids** 9(1): 57-64.

SILVA, W. O.; GROOTENBOER, C. S. Avaliação das práticas adotadas na produção de leite para uma fábrica de laticínios situada no Rio de Janeiro. **PUBVET**, v.2, n.9, 2008.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A.P.; DANIE, L. G. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultrastructural characteristics of wood-degrading fungi. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, v. 62, n. 116, 2008.

SOUZA, C. H. B. de.; BURITI, F. C. A.; BEHRENS, J. H.; SAADI, S. M. I. Sensory

evaluation of probiotic Minas fresh cheese with *Lactobacillus acidophilus* added solely or in co-culture with a thermophilic starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 871–877, 2008.

TSAI, G. J.; HUANG, S. P. In vitro and in vivo antibacterial activity of shrimp chitosan against some intestinal bacteria. **Fisheries Science**, v. 70, n. 4, p. 675-681, 2004.

VILLADIEGO, A. M. D.; SOARES, N. F. F; ANDRADE, N. J.; PUSCHMANN, R.; MINIM, V. P. R.; CRUZ, R. Filmes e revestimentos comestíveis na conservação de produtos alimentícios. **Revista Ceres**, v. 52, n. 300, p. 221-244, 2005.

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: A potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n. 9, p. 1176-1178, 2004.

ZAMANI, A.; EDEBO, L.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M.J. Temperature Shifts for Extraction and Purification of Zygomycetes Chitosan with Dilute Sulfuric Acid. **Int J Mol Sci**. v. 11, n. 8, p. 2976-8297, 2010.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a bioatividade de quitosana na inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal;

4.2 Específicos

- Avaliar a eficácia da quitosana em diferentes concentrações na inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal.
- Avaliar características físico-químicas do queijo tipo Minas frescal cobertos com gel de quitosana em diferentes concentrações.
- Verificar a influência da aplicação do gel de quitosana sobre atributos sensoriais de queijo tipo Minas frescal.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 ARTIGO:

BIOATIVIDADE DE QUITOSANA NA INIBIÇÃO DE *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

RESUMO

O queijo Minas frescal é um queijo de ampla aceitação no mercado, devido à facilidade de produção, bom rendimento e curto período de maturação. Entretanto, esse tipo de queijo é bastante suscetível a contaminações por patógenos como *Staphylococcus aureus*, necessitando de atenção quanto ao método de conservação. Buscando prolongar a vida útil mantendo a qualidade de produtos processados e prontos para o consumo, o uso de antimicrobianos naturais como a quitosana, tem recebido grande enfoque ultimamente devido à ação antimicrobiana, biodegradabilidade e segurança. Assim, com este estudo objetivou-se avaliar a bioatividade do gel de quitosana em diferentes concentrações na inibição de cepas de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal, bem como avaliar as modificações da adição desse antimicrobiano nas características de qualidade (físico-química e sensorial) do produto. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada através do teste de macrodiluição em caldo queijo contendo quitosana em 5 diferentes concentrações, sob cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*. O queijo Minas frescal foi produzido em laboratório, e adicionado da quitosana por imersão do gel, na CBM encontrada, e a 20 mg/ml (concentração da quitosana utilizada como cobertura comestível). Os ensaios de interferências da quitosana sobre a cinética de inibição bacteriana foi realizada através do método de contagem de células viáveis nos intervalos de 1, 2, 5, 10, 15 e 20 dias pós-incubação com as amostras sob refrigeração a 4°C. As amostras sem a cepa bacteriana, foram submetidos às análises físico-químicas (umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, Aw e acidez) e sensoriais. A CBM encontrada em caldo queijo foi 5,0 mg/mL. O comportamento da cepa de *S. aureus* frente à quitosana foi comprovada nas concentrações utilizadas, entretanto, apesar da concentração de 20 mg/mL ter obtido maior redução, a utilização a 5 mg/ml conseguiu retardar o crescimento não diferindo estatisticamente da maior concentração. Os resultados da composição centesimal, pH e acidez do queijo Minas frescal com quitosana demonstraram discretas diferenças comparadas a amostra controle (sem quitosana), não levando a alterações na qualidade do produto final. Sensorialmente, ambas as amostras com quitosana apresentaram bons resultados, com notas variando entre 6,3 a 8,35, com destaque para o queijo com 5mg/mL de quitosana no atributo sabor. Portanto, os resultados obtidos refletem uma boa perspectiva de utilização de quitosana no processo de conservação de queijo Minas frescal.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, queijo Minas frescal, antimicrobianos naturais, quitosana.

1. INTRODUÇÃO

Há um forte debate quanto à segurança dos conservantes químicos utilizados em alimentos, uma vez que são considerados responsáveis por muitos atributos carcinogênicos e teratogênicos, além da toxicidade residual (MOREIRA et al., 2005).

Os antimicrobianos naturais são compostos com capacidade para inibir o crescimento de microrganismos, incluindo bactérias, vírus e fungos, e constituem cada vez mais uma nova alternativa segura a garantir alimentos sãos, mantendo inalterada a qualidade dos alimentos (LEISTNER, 2000).

Dentre os antimicrobianos naturais, a quitosana tem sido amplamente pesquisada, uma vez que possui um amplo espectro bactericida sob microrganismos patogênicos (CHI *et al.*, 2006; FAI *et al.*, 2008; BENTO *et al.*, 2011). Além disso, apresenta propriedades benéficas, atóxico, capacidade de formar filmes biodegradáveis, solubilidade em meio ácido aquoso e ação antimicrobiana, fazem dela um biopolímero com grande potencial na conservação de alimentos.

Alimentos com alto teor de umidade, elevado pH e grande manipulação durante a fabricação, como o queijo Minas frescal, são considerados alvo de microrganismos patogênicos e necessitam de maior atenção quanto a sua conservação. Este queijo possui ampla aceitação no mercado, por ter excelente rendimento e facilidade de produção, contudo é extremamente suscetível às alterações físico-químicas e microbiológicas que afetam as características de qualidade, rendimento e consequentemente menor vida de prateleira.

O queijo Minas frescal é um produto indicado para consumo imediato e de curta vida de prateleira, devendo ser comercializado logo após a sua fabricação. O prazo de validade estimada pelos fabricantes varia de 15 a 30 dias, no entanto Rocha et al. (2006), avaliando o tempo de vida útil de queijo tipo Minas frescal, encontraram amostras impróprias para o consumo já a partir do sétimo dia da data de fabricação, além de apresentarem-se visivelmente deteriorados já aos 21 dias, não sendo analisados em períodos posteriores, mesmo quando prazos de validade mais extensos eram indicados na embalagem.

Este produto pode apresentar contaminação por diversos patógenos de importância em saúde coletiva, por ter sua produção em grande parte ser de forma artesanal, proporcionando assim elevada contaminação; destacando-se o *Staphylococcus aureus*, como microrganismo contaminante (JOHNSON et al., 2007).

Staphylococcus aureus é uma bactéria que ocorre na microbiota da pele e mucosa do homem e de outros animais de sangue quente, ou ainda como agente de processos infecciosos. Podem produzir doença tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla nos tecidos, como pela produção de muitas substâncias extracelulares, como enterotoxinas, importante causa de intoxicação alimentar, sendo produzida, principalmente, quando cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em alimentos contendo carboidratos e proteínas (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

Desta forma, diante da preocupação da população cada vez maior em consumir alimentos, como queijos, e enriquecidos com ingredientes funcionais, objetivou-se com este estudo avaliar a bioatividade da quitosana na inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas frescal, e a sua influencia sobre as características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal com quitosana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 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 10 ml 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, procedente da purificação de quitina extraída da carapaça de crustáceo.

2.2 Métodos

2.2.1 Elaboração do queijo Minas frescal

O queijo Minas frescal foi elaborado de acordo com o fluxograma adaptado por Pereira *et al.* (2006), conforme Figura 01.

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, permaneceu em repouso até obter a consistência lisa, firme e compacta, sendo em seguida, realizado o corte e a mexedura. Logo após foi realizada a desoragem utilizando formas plásticas de formato cilíndrico, próprias para queijo Minas frescal, previamente sanitizadas por imersão em solução de hipoclorito de sódio na concentração de 100 ppm (100 mg/ 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).

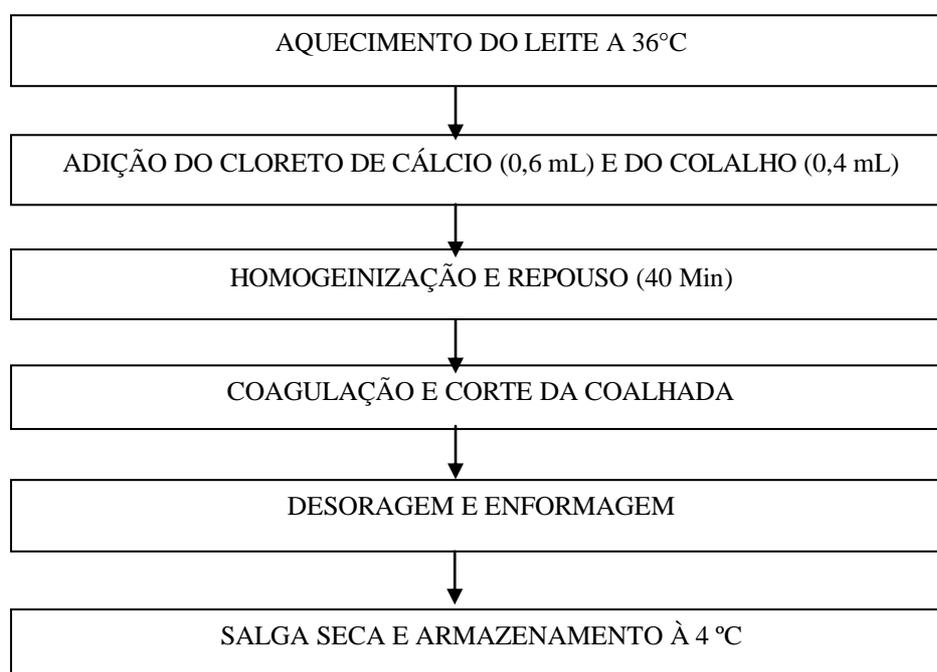


Figura 01: Fluxograma do processamento do queijo Minas frescal.

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.

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

Os géis de quitosana a 5 mg/mL e 20 mg/mL foram preparados por dissolução do pó de quitosana em ácido acético a 1%, mantidos sob agitação moderada em agitador magnético (TECNAL) durante 24 a 48 horas em temperatura ambiente, até a total dissolução do pó e obtenção do gel homogêneo.

Cubos de queijo Minas frescal, com aproximadamente 2 cm 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.

2.2.2 Preparação das cepas bacterianas reveladoras da atividade antimicrobiana;

Foram utilizadas cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, cedidas pelo Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Professora Nonete Barbosa Guerra (LEAAL), 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).

2.2.3 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 150 g de queijo Minas frescal foram misturados com 300 mL de água destilada durante 20 minutos sob aquecimento a 100°C em bico de bunsen. Em seguida, a mistura foi submetida a filtração com a utilização de bomba a vácuo. O filtrado obtido foi esterilizado através do uso de sistema de filtração Millipore (0,45 µm).

2.2.4 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 18-24 h).

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, 1 mL da suspensão de *Staphylococcus aureus* foi inoculado em 5 mL de caldo queijo contendo quitosana em diferentes concentrações (10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL). Foram realizados dois controles em amostras triplicatas, 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 100 µL dos tubos que não apresentaram crescimento microbiano visível foram inoculados em Baird Park Agar (Himedia, Índia), sendo este meio específico para *S. Aureus*, por 24-48 horas a 35°C. As placas que não apresentaram crescimento na maior concentração testada foram consideradas a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

2.2.5 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 20 mg/mL no queijo. Inicialmente, 1 mL da suspensão bacteriana foi inoculado usando pipetador automático em 10 g 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 e inoculada uma alíquota de 100 µL 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.

2.2.6 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 foi determinada em Dcagom AquaLab 4TE water

activity meter. 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.

2.2.7 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 (CAV/UFPE), 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), para um painel de 15 e 46 provadores, respectivamente, não treinados, escolhidos conforme disponibilidade e hábito de consumir queijo Minas frescal (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 (Anexo 2) 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).

2.2.8 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

3.1 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 2,5 mg/mL, uma vez que foi a menor concentração capaz de inibir a cepa em caldo queijo, visto que ao inocular em Baird Park Agar houve crescimento bacteriano, demonstrando que não ocorreu a morte bacteriana. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi de 5 mg/mL, pois não apresentou 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 2,5 mg/mL e CBM de 5 mg/mL de quitosana. No entanto, Fai (2008), utilizando diferentes meios de culturas, encontrou valores de 1,5 mg/mL para CIM e 5 ml/mL para CBM 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 et al. (2008) relataram que estes valores da CIM da quitosana podem variar entre 0,1 a 10 mg/mL, dependendo da variedade de microrganismos presentes em alimentos. Bento (2011) ao avaliar a bioatividade da quitosana sob *Listeria monocytogenes*, encontrou os valores de 2,5 mg/mL para CIM e 5 mg/mL para CBM, sendo os mesmos valores de CIM e CBM encontrados para *S. aureus* no presente trabalho. Porter et al. (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. Jolles e Muzzarelli (1999) assim como Devlieghere et al. (2004) explicam alguns mecanismos antimicrobianos da quitosana, incluindo a indução de quitosanase, formação de componentes fenólicos e capacidade de bloqueio de nutrientes inibindo a multiplicação de microrganismos. Segundo Silva 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 et al. (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 et al. (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 *Estafilococos* coagulase 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 2. Pesquisas preliminares utilizando a CIM em matriz alimentar não apontaram atividade antibacteriana no queijo, por este motivo não foi utilizada essa concentração nas etapas seguintes.

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.

Amostras	Dias						
	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 5mg/mL de quitosana; C: queijo imerso em 20mg/mL de quitosana.

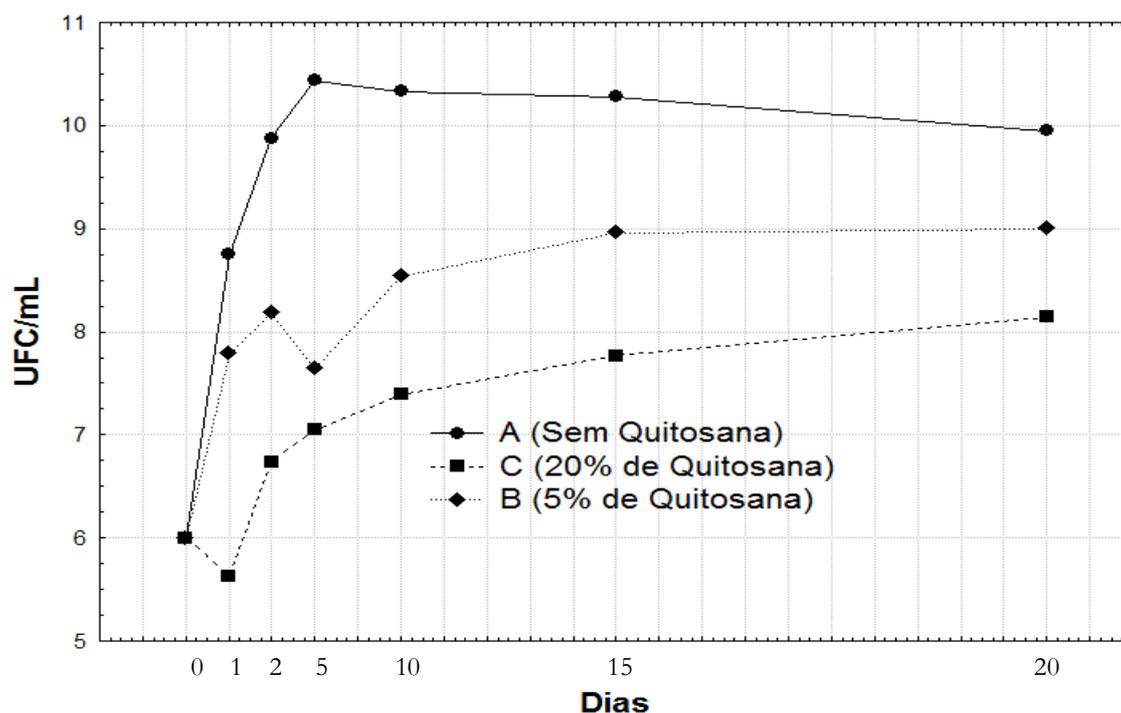


Figura 2. Viabilidade de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal revestidos com gel de quitosana nas concentrações 5 mg/mL e 20 mg/mL e controle (sem quitosana).

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 9,35 log UFC.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.

Segundo Ferreira et al. (1998), após a fase de crescimento exponencial, devido ao esgotamento de nutrientes no meio e/ou o acúmulo de metabólitos dos microrganismos, os quais podem ser inibitórios, nota-se o cessar da divisão dos microrganismos, entrando então numa fase estacionária. Após esta fase, o excesso de metabólitos tóxicos e/ou à autólise das células por enzimas líticas, acarreta na morte das células, que é definida pela perda irreversível da capacidade destas se dividirem, o que resulta no decréscimo da população viável, fase denominada de declínio ou morte.

Na amostra B ocorreu crescimento no 1º tempo. Quanto à amostra C, esta foi a única em que houve redução da carga microbiana no 1º dia do armazenamento, seguindo um crescimento constante 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 5 mg/mL de quitosana) e C (queijo com 20 mg/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 20 mg/mL ter obtido maiores reduções e diferir significativamente da amostra controle, a quitosana a 5 mg/ml promoveu o controle desejável das cepas até o 20º dia, utilizando menores quantidades dos antibacteriano, processo estes desejável pela indústria alimentícia.

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.

Ali et al. (2011) que ao aplicar diferentes concentrações de quitosana (5; 10 e 15mg/mL) em mamões, verificou que a concentração de 15 mg/mL apresentou-se mais promissora do que as concentrações mais baixas. Camili (2007) ao empregar a solução de quitosana nas concentrações 15 e 20 mg/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 a vida útil.

3.2 Avaliação Físico-Química

Os resultados da composição centesimal estão apresentados na Tabela 1. Quanto ao teor de umidade, houve diferença significativa entre as amostras. Sendo a amostra A (controle) com diferença significativa em relação a B (5 mg/mL de quitosana) e C (20 mg/mL de quitosana). Quanto maior o teor de umidade no queijo, mais rápido ocorrerá a 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 muito 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; 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 20 mg/mL de quitosana significativamente menor que a amostra B com 5 mg/mL de quitosana no gel (Tabela 1).

Tabela 1: 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 1). Vale ressaltar que mesmo a quitosana se ligando quimicamente às moléculas de gordura do sistema, a imersão em gel de quitosana a 5 mg/mL e 20 mg/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 20 mg/mL, pode ser consequência da ligação desta com a gordura devido a 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 A_w acima de 0,90 (Tabela 1). Contudo, é importante ressaltar que a maior preocupação com relação à alta A_w , é à probabilidade de interferir como fonte de risco para desenvolvimento de microrganismos.

Em relação à acidez titulável verificou-se um maior valor na amostra B (5 mg/mL de quitosana) estatisticamente superior às outras amostras (Tabela 1). 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, psicrotróficos e principalmente as bactérias lácticas, as quais são os principais agentes na transformação da lactose em ácido láctico.

Quanto ao teor de cinzas (Tabela 1), 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 1), 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.

3.3 Análise 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 em relação ao atributo sabor, 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 as 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).

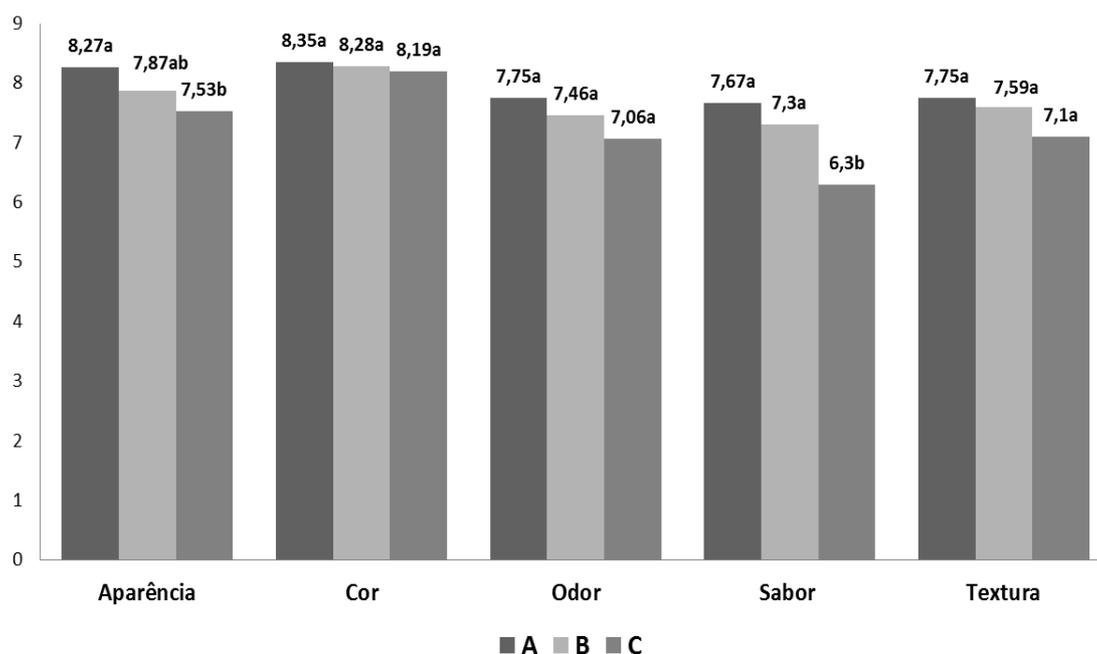


Figura 4. Médias das notas obtidas na no Teste de Aceitação de queijo Minas frescal revestido com gel de quitosana (amostra B: 5mg/ml de quitosana; amostra C: 20mg/mL de quitosana) e controle (amostra A: sem revestimento de quitosana).

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, não havendo diferença significativa em comparação à amostra B (5mg/mL de quitosana). Porém a amostra A variou estatisticamente da amostra C (20 mg/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, refletindo diretamente na aparência geral do produto. As médias obtidas para este atributo compreenderam entre a nota 7, que reflete em “gostei regularmente” (amostras com 5 mg/mL e 20 mg/mL de quitosana) e a nota 8, “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 e 8.

Referente à avaliação da cor, Botrel (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 *et al.*, 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. Camargo (2004), em seu estudo associa o retardo do amadurecimento influenciando na coloração da casca e na firmeza de mamão papaia.

Em contrapartida, foram relatados por outros autores resultados negativos, como no estudo de cookies (VIEIRA, 2001) e de pêssegos dourado (SANTOS, 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 mussarela, 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 as salsichas contendo quitosana e as do controle. Li e Yu (2001), também constatou que o tratamento com quitosana (5 ou 10 mg/mL) foi efetivo na manutenção da textura, ao relatar a firmeza dos pêssegos tratados com quitosana.

Em relação ao atributo sabor não houve diferença significativa entre a amostra sem quitosana e a amostra com quitosana a 5 mg/mL, porém, houve diferença entre ambas as amostras comparada a amostra com 20 mg/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, equivalente a “gostei ligeiramente”, isto é, todas as médias obtiveram valores compreendidos nos termo “gostei”, o que indica uma boa aceitação do produto.

Resultados satisfatórios pelo uso da quitosana foram também encontrados por Vieira (2001), ao realizar análise sensorial aplicando a escala hedônica, em cookies adicionados ou não de quitosana, onde o mesmo obteve boa aceitação no quesito sabor. Júnior et al. (2010), 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. Sayas et al. (2011) não encontraram diferenças significativas para os atributos cor e sabor em hambúrgueres de carne de porco com ou sem 1% de quitosana em sua formulação, sem temperos ou aditivos. Em outro estudo realizado por Suman et al. (2011) com hambúrgueres de carne bovina foi constatado que 1% quitosana não afetou a cor visual interna de cozida arrefecida durante 3 dias, embora o odor e sabor não tenham sido avaliados.

4. CONCLUSÕES

Evidenciou-se neste estudo 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 estocagem sob refrigeração. Nas avaliações físico-químicas, 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, assim reforçando o potencial de utilização deste polímero como agente de conservação de alimentos.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.

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.

ALI, A.; MUHAMMD, M. T. M.; SIJAM, K.; SIDDIQUI. 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.

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, 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.

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

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

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, mar. 2011.

BLIGH, E.G; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.** 1959 Aug;37(8):911-7. No abstract available. PMID: 13671378 [PubMed - indexed for MEDLINE]

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. 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.

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

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

CAMARGO, R. J. Estudo do tratamento combinado de radiação ionizante e cobertura de quitosana em mamão Papaia (*Carica papaya* L.). **Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear)**, IPEN - INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICA E NUCLEARES . São Paulo, 130p., 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 cinerea*. **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**, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007.

CÉ, N. Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil, 95 p., 2009.

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. **Tese (Doutorado em nutrição)**. Florianópolis, Brasil, 2005.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v.21, n. 6, p. 703–714, 2004.

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. Potencial do efeito antibacteriano *in vitro* de quitosana extraída de *Mucor circinelloides* UCP 050: uma abordagem para uso em teste de conservação de

alimentos. **Dissertação (Mestrado em Nutrição)**. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, 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.

FERREIRA, W. F. **Microbiologia**. volume 1, Lidel – Edições Técnicas, p.91, 1998.

GERLA C. B. CHINELATE 2011. Gelado comestível a 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.

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 Íbero-americano 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. **J. Food Scienci**. 70, 2005.

HERNANDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL-VALLE, V.; VELEZ, D.; GAVARA, R. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v.110, p.428–435, 2008.

JUNIOR, E. B.; MONARIM, M. M. S.; CAMARGO, M.; MAHL, C. E. A.; SIMÕES, M. R.; SILVA, C. F. Efeitos de diferentes biopolímeros, no revestimento de mamão (*carica papaya L.*) minimamente processado. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 1, n. 1, p. 131-142, 2010.

JOHNSON WM, TYLER SD, EWAN EP, ASHTON FE, POLLARD DR, ROZEE KR. Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxin shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 426-430, 2007.

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

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

LEISTNER, L. Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p.181-186, 2000.

LI, H.; YU, T. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, n. 2, p. 269-274, 2001.

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

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, out./dez. 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. **Química Nova**, vol. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MIRANDA, M. E. S. Caracterização físico-química, bioquímica, microscópica, e sensorial, da n-carboxmetilquitosana em solução e filme. **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.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S.I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen, **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MUNCK, A. V. Queijo de Coalho – Princípios básicos da fabricação (Palestra). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 13-15, 2004.

NCCLS. **M26-A Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents**; approved guideline, vol. 19. no.18, 1999.

NOSTRO, A.; BLANCO A. R.; CANNATELLI M. A.; ENEA V.; FLAMINI G.; MORELLI I.; ROCCARO S.; ALONZO V. Effects of *Helichysum italicum* extract on growth and enzymatic activity of *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 17, p. 517-520, 2001.

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. 88p. 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.

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.

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.

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

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.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 36, n. 55, p. 467-473, 2003.

SAYAS, E., QUESADA, J., SÁNCHEZ, E., VIUDA, M., FERNÁNDEZ, F., PÉREZ, J. A., et al. Effect of the molecular weight and concentration of chitosan in pork model burgers. **Meat Science**, 88, 740–749. 2011.

SILVA, J. M. et al. Análise da aceitação de queijos coalhos condimentados com diferentes concentrações de óleo essencial de erva-doce. **In: I Jornada Nacional da Agroindústria**, Bananeiras, SEMINAGRO, cta09, 2006.

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

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.

SUMAN, S. P., MANCINI, R. A., JOSEPH, P., RAMANATHAN, R., KONDA, M. K. R., DADY, G. Chitosan inhibits premature browning in ground beef. **Meat Science**, v. 88, p. 512–516, 2011.

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 – UFC. Fortaleza, 2001.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que a quitosana apresenta viabilidade de utilização na conservação dos alimentos, sendo bastante útil para as indústrias alimentícias, tendo como embasamento seu potencial antimicrobiano contra cepas patogênicas, e sua vantagem em não ocasionar alterações físico-químicas e sensoriais significativas. Portanto, estudos adicionais são necessários para que se avalie sua ação sob diferentes cepas, bem como o acompanhamento da vida de prateleira desse produto, no intuito de garantir ao consumidor um produto saudável e seguro quanto a qualidade higiênico-sanitária.

ANEXOS

7. ANEXOS

Anexo 1: Parecer do comitê de Ética em Pesquisa

