

UFRRJ

INSTITUTO DE TECNOLOGIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DISSERTAÇÃO

**QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO PROCESSADO POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
E FÍSICO-QUÍMICOS**

THAYRINE RODRIGUES MARTINS

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**QUEIJO TIPO MINAS FRESAL PROBIÓTICO PROCESSADO POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS
E FÍSICO-QUÍMICOS**

THAYRINE RODRIGUES MARTINS

Sob orientação do Professor
Amauri Rosenthal

e Co-orientação do Professor
Eduardo Henrique Miranda Walter

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de concentração Tecnologia de Alimentos.

Seropédica/RJ

Janeiro de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M379q MARTINS, THAYRINE RODRIGUES, 1991-
QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL PROBIÓTICO PROCESSADO POR
ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA: ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS E FÍSICO-
QUÍMICOS / THAYRINE RODRIGUES MARTINS. - 2018.
67 f.

Orientador: AMAURI ROSENTHAL.
Coorientador: Eduardo Henrique Miranda Walter.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2018.

1. QUEIJO MINAS FRESCAL. 2. PROBIÓTICO. 3. ALTA
PRESSÃO HIDROSTÁTICA. I. ROSENTHAL, AMAURI, 1960-,
orient. II. Walter, Eduardo Henrique Miranda, 1975-,
coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

THAYRINE RODRIGUES MARTINS

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na área de concentração Tecnologia de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/01/2018

Amauri Rosenthal. Dr. EMBRAPA
(Orientador)

Rosa Helena Luchese. Dr^a. UFRRJ

Otávio Cabral Neto. Dr. IFTO

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença em todos os momentos renovando minhas forças para continuar lutando pelos meus objetivos, com seu amor incondicional.

Aos meus pais, Luiz e Samara pelos ensinamentos de vida, pelo apoio nos momentos difíceis e por acreditar em mim acima de todas as intercorrências.

Aos meus irmãos, Thaís e Tiago que me deram além do apoio, minhas sobrinhas que em cada sorriso me forneceram energia para prosseguir a cada passo.

Ao Márcio, por todo apoio, carinho e compreensão nos momentos de ansiedade e estresse. Obrigada, por me levantar quando eu não mais conseguia prosseguir, por fazer tua as minhas dores e acreditar em mim em todos os momentos

Às minhas meninas, Pequy, Audrey, Hermione e Melissa por iluminar todos os meus dias. Agradeço a Pequy por completar minha vida.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade de realização do curso de pós-graduação, assim como desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Embrapa Agroindústria de Alimentos pela oportunidade de realização do projeto em suas instalações.

Aos meus orientadores Amauri e Eduardo pela oportunidade e confiança depositada ao longo do projeto. Obrigada Eduardo, pela paciência e por acreditar no meu potencial, cada palavra foi de extrema importância nesta fase final.

Aos colegas de pesquisa da pós-graduação, Julia, Ana Carolina, Otávio, Fernando, Fabiano, Fabíola e Rosiane pelo apoio, auxílio à pesquisa e direcionamento acadêmico. Agradeço a Rosiane por cada palavra de carinho e incentivo.

Aos colaboradores do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Agroindústria de Alimentos Simone, Adriano e Vanessa pela ajuda.

Aos colaboradores da Planta piloto, Willian, Luis Fernando e Filé pela ajuda.

À Claudinha, agradeço por todo carinho e apoio em vida. Seu sorriso estará em nossas memórias para sempre.

A todos que acreditaram em mim, aceitaram minha ausência e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

Tenho certeza de que sozinha, jamais teria chegado até aqui.

A todos o meu sincero agradecimento.

RESUMO GERAL

MARTINS, Thayrine Rodrigues. **Queijo tipo minas frescal probiótico processado por alta pressão hidrostática: aspectos microbiológicos e físico-químicos** 2018. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos) Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

As bactérias probióticas são aplicadas em queijos de modo a conferir benefícios à saúde do consumidor e diferenciação de mercado do produto. A alta pressão hidrostática (APH) tem potencial de aplicação em queijos frescos, com vistas à destruição de microrganismos deteriorantes ou potencialmente patogênicos, prolongando a vida útil dos produtos. Com a intenção de desenvolver um produto com maior saudabilidade e estabilidade, o presente trabalho teve como objetivos selecionar bactérias probióticas e condições de processo de alta pressão possíveis de serem aplicadas ao queijo tipo Minas Frescal. Em pesquisa e desenvolvimento, a produção dos queijos em miniatura é uma alternativa eficaz na realização de análises laboratoriais, comparada ao processo tradicional de confecção dos queijos tipo Minas Frescal, a adaptação desse método permitiu melhor controle de preparo dos queijos, tornando mais eficaz a aplicação do experimento. As culturas probióticas utilizadas foram as de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO, Itália), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Dinamarca) e *Lactobacillus ramnhusus* BRM038563 (banco de culturas da Embrapa Caprinos, Brasil). Foram realizadas análises a fim de avaliar o efeito de diferentes combinações de pressão e tempo do processo de alta pressão sobre as características dos queijos e sobre a viabilidade das culturas probióticas, ao longo do armazenamento refrigerado. O *Bifidobacterium* sp *lactis* foi selecionado por apresentar níveis satisfatórios de contagem de microrganismos viáveis durante o armazenamento do queijo tipo Minas frescal, além de apresentar maior viabilidade quando submetido ao processo de APH que os demais probióticos, sem alterar negativamente as características físicas e físico-químicas do queijo. Não foram detectados *Salmonella* sp/25g, *Staphylococcus* sp. e Coliformes 45°C nas amostras. Após 28 dias de armazenamento, a amostra controle apresentou 4,43 log UFC/g de psicrotrofos, enquanto as processadas a 200MPa/5 min atingiu o crescimento de 3,81 log UFC/g e a 350Mpa/5 min, teve o crescimento de apenas 1,49 log UFC/g. Com relação à sobrevivência do microrganismo probiótico, obteve-se inicialmente a contagem de *Bifidobacterium* ssp. *lactis* de 8,13 log UFC/g para amostra Controle (não pressurizada), enquanto as amostras processadas a 200MPa/5 min e 350Mpa/5 min resultaram em 7,38 e 6,26 log UFC/g, respectivamente. Até o 28º dia, houve redução de inferior a 2 Log em todos os tratamentos, atingindo-se 6,98 log UFC/g para amostra Controle, 5,93 log UFC/g para 200MPa/5 min. e 4,52 log UFC/g para 350MPa/5 min. Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as análises de umidade, pH e acidez total. A APH foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes, mantendo uma concentração relevante de probióticos ao longo do seu armazenamento.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal, Probiótico, Alta Pressão Hidrostática.

GENERAL ABSTRACT

MARTINS, Thayrine Rodrigues. **Cheese, fresh probiotic mines processed by hydrostatic high pressure: microbiological and physico-chemical aspects** 2018. 67p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Science) Institute of Technology, Food Technology Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Probiotic bacteria are applied to cheeses in order to confer benefits to the health of the consumer and market differentiation to the product. The High Hydrostatic Pressure (HHP) has the potential to be applied in fresh cheeses, aiming inactivating potentially pathogenic or spoilage microorganisms and prolonging the shelf life. With the intention of developing a product with greater health and stability, the present work had as objectives to select probiotic bacteria and HHP process conditions possible to be applied to Minas Frescal cheese. In research and development, the production of miniature cheeses is an efficient alternative to carry out laboratory analysis, compared to the traditional process of making Minas Frescal cheese, the adaptation of this method allowed a better control of cheese preparation, making the application more effective for the experiment. The probiotic cultures used were *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO, Italy), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Denmark) and *Lactobacillus ramnhusus* BRM038563 (Embrapa Goats and Sheeps, Brazil). Analyzes were carried out to evaluate the effect of different combinations of pressure and time of the HHP process on the characteristics of the cheeses and on the viability of probiotic cultures throughout the refrigerated storage. *Bifidobacterium* subsp *lactis* was selected because it presented satisfactory levels of microorganism counts during the storage of the Minas Frescal cheese, besides being more viable when submitted to the HHP process than the other probiotics, without negatively affecting the physical and physicochemical characteristics of the cheese. No *Salmonella* sp / 25g, *Staphylococcus aureus* and Coliforms 45 °C were detected in the samples. After 28 days of storage, the control sample presented 4.43 log CFU/g of psychrotrophics, while those processed at 200 MPa/5 min reached a growth of 3.81 log CFU/g and at 350 MPa/5min had growth of only 1.49 log CFU/g. Regarding the survival of the probiotic microorganism, the *Bifidobacterium* subsp *lactis* count was initially 8.13 CFU/g for Control sample (non-pressurized), while samples processed at 200MPa/5min and 350MPa/5min resulted in 7.38 and 6.26 log CFU/g, respectively. Up to 28th-storage-day, there was a reduction of less than 2 Log in all treatments, reaching 6.98 log CFU/g for Control sample, 5.93 log CFU/g for 200 MPa/5 min. and 4.52 log CFU/g for 350 MPa/5min. No significant differences were observed ($p > 0.05$) for moisture, pH and total acidity. HHP was able to inhibit the growth of spoilage microorganisms, maintaining a relevant concentration of probiotics throughout the Minas Frescal cheese storage.

Keywords: Minas Frescal Cheese, Probiotics, High Hydrostatic Pressure.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

- Figura 1** - Fluxograma de produção do queijo tipo Minas Frescal adicionado de probióticos em miniatura.20
- Figura 2** - Demonstração de mini-queijo tipo Minas Frescal.21
- Figura 3** - Perfil de pH e Acidez (g/100g) dos mini-queijos com e sem probióticos armazenados sob refrigeração a 4 ± 2 °C durante 28 dias.25

CAPÍTULO III

- Figura 1** - Sobrevivência ao tratamento por alta pressão de *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis inoculado nos mini-queijos tipo Minas Frescal (tempo de tratamento = 5 min.)38
- Figura 2** - Contagem de microrganismos psicrotróficos em mini-queijos tipo Minas Frescal inoculado com *Bifidobacterium* subsp. lactis e submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento a 4 ± 2 °C.....40
- Figura 3** - População de *Bifidobacterium* subsp. lactis em mini-queijos tipo Minas Frescal submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento a 4 ± 2 °C.....41
- Figura 4** - Sinérese dos queijos Minas Frescal inoculados com *Bifidobacterium* subsp. lactis submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento refrigerado (4 ± 2 °C).....46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Tendências identificadas pela Brasil Food Trends 2020, com as respectivas características da APH. (BFT2020, adaptada.)..... 12

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Sinérese (%) dos mini-queijos com e sem probióticos armazenados sob refrigeração a 4 °C durante 5 semanas 24

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Viabilidade média dos microrganismos probióticos, submetidos a 100MPa e 300MPa por 5 e 10 minutos e amostra controle. 37

Tabela 2 - Contagens após armazenamento de 24 horas de Fungos filamentosos e leveduras, Salmonella spp., Staphylococcus aureus e Coliformes 45 °C para as amostras de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculado com Bifidobacterium subsp. lactis. 39

Tabela 3 - Enumeração de microrganismos probióticos (Bifidobacterium subsp. lactis) nas amostras de mini-queijo tipo Minas Frescal. Controle: amostra não pressurizada; 200MPa/5 min: amostra pressurizada a 200MPa/5 min e 350MPa/ 5 min: amostra pressurizada a 350MPa/5 min. 41

Tabela 4 - Caracterização físico-química de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado. 42

Tabela 5 - pH de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado ao longo de 28 dias a 4 ± 2 °C. 43

Tabela 6 - Variação na acidez dos mini-queijos “Controle”, “200MPa/5 min” e “350MPa/5 min” ao longo de 28 dias de armazenamento a $4 \pm$ °C..... 44

Tabela 7 - Teor de umidade de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB e submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo de 28 dias de armazenamento a 4 ± 2 °C..... 45

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
Objetivos Gerais.....	3
Objetivos Específicos.....	3
CAPITULO I	4
1 INTRODUÇÃO	7
1.2 Produção e Consumo de Queijos no Brasil.....	7
1.3 Queijo Minas Frescal	8
1.4 Adição de Probióticos em Queijo Minas Frescal	8
1.4.1 Espécies probióticas e benefícios.....	8
1.4.2 Utilização de probióticos em queijos	9
1.4.3 Queijo Minas Frescal probiótico	10
1.5 Tecnologia de Alta Pressão Hidrostática (APH).....	11
1.5.1 Histórico.....	11
1.5.2 APH em queijo Minas Frescal probiótico	12
1.6 Vida Útil Microbiológica	13
1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	14
CAPITULO II	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 Método De Produção De Mini-queijos	19
2.2 Análises Físico-químicas.....	22
2.2.1 Umidade	22
2.2.3 pH.....	22
2.2.4 Acidez total	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4 CONCLUSÃO	27
CAPÍTULO III	28
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAL E MÉTODOS	32
2.1 Produção Dos Queijos Com Probióticos	32
2.2 Tratamentos De Alta Pressão Hidrostática.....	32
2.3 Análises Microbiológicas.....	32
2.3.1 Enumeração de Bifidobacterium animalis	33
2.3.2 Enumeração de Lactobacillus spp.	33
2.3.3 Vida Útil do queijo tipo Minas Frescal e viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento	33

2.4 Análises Físico-químicas.....	34
2.4.1 pH.....	34
2.4.2 Acidez total	34
2.4.3 Umidade	34
2.4.4 Cinzas.....	35
2.4.5 Nitrogênio total	35
2.4.6 Extrato etéreo	36
2.5 Sinérese	36
2.6 Análises Estatísticas	36
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
3.1 Tratamento Dos Queijos Probióticos Por Alta Pressão Hidrostática	37
3.2 Aspectos microbiológicos	38
3.2.1 Vida útil do queijo tipo Minas Frescal probiótico - Viabilidade de microrganismos psicrotróficos	39
3.2.2 Enumeração de probióticos	40
3.3 Características Físico-químicas.....	42
3.3.1 pH.....	42
3.3.2 Acidez total	43
3.3.3 Umidade	44
3.4 Sinérese	45
4 CONCLUSÕES	47
CONCLUSÕES GERAIS	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo é um alimento versátil, que é consumido de várias formas, em diferentes refeições por todas as faixas etárias e pessoas com diferentes condições socioeconômicas. No caso específico do queijo Minas Frescal trata-se de 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, sendo classificado como um queijo semi-gordo (25,0 - 44,9 % de gordura), de alta umidade, a ser consumido fresco, não maturado, rico em cálcio, fósforo e vitamina A. Apresenta elevada umidade (> 55,0 %), consistência suave, cor esbranquiçada, aroma suave e característico, destinando-se para consumo imediato, de curta durabilidade, no mercado sob refrigeração por se tratar de um tipo de queijo não maturado (FURTADO, 1999).

Atualmente, é crescente a demanda por alimentos nutritivos e saudáveis. Nesse sentido, os probióticos são aplicados na produção de diversos lácteos com a finalidade de promover benefícios à saúde da população. Esses benefícios vão desde a prevenção e redução de doenças do trato intestinal, como a síndrome do intestino irritável, constipação, diarreia, até estimulação do sistema imunológico, prevenção e tratamento de alergias, proteção do sistema urinário e cardiovascular e redução da pressão arterial (NAGPAL *et al.*, 2012), além de inibir a proliferação excessiva de bactérias intestinais patogênicas no alimento (SHARMA e DEVI, 2014). São considerados probióticos quando a quantidade mínima do microrganismo viável está situada na faixa de 10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC·g⁻¹), na recomendação diária do alimento pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Ou seja, o consumo de 100g do produto, contendo 10^6 UFC/g de probióticos viáveis, irá garantir a dose mínima diária considerada terapêutica (MARUYAMA, 2006). Assim sendo, cada vez mais se procura introduzir estes microrganismos em alimentos de consumo diário ou de grande aceitação.

Queijos em condições inadequadas para consumo humano podem desencadear graves consequências para a população, se tornando um problema de saúde pública (SILVA *et al.*, 2017). Há uma série de problemas na qualidade dos queijos, que geralmente são atribuídas à manipulação excessiva, à falta de boas práticas e ao alto teor de umidade, como no caso do queijo Minas frescal, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos indesejáveis, podendo provocar a contaminação do produto (SILVA *et al.*, 2017). Dentre as bactérias que podem se desenvolver em queijos destacam-se principalmente, os coliformes totais e os termotolerantes, sendo o número e a presença destes microrganismos, indicadores da qualidade do produto (SILVA *et al.*, 2017). Relatos sobre a contaminação de queijo Minas frescal por microrganismos patogênicos, como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus* sp. são frequentes, em diversas regiões do Brasil (BULHÕES e ROSSI JÚNIOR, 2002; ROCHA, BURITI, SAAD, 2006; PINTO *et al.*, 2011). *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* são outros microrganismos indicativos de condições higiênico-sanitárias de processos inadequados na fabricação do queijo. A contaminação microbiana de queijos demanda atenção ao considerar que bactérias patogênicas como *Salmonella* spp e *Staphylococcus* sp. são comumente encontradas em derivados lácteos (SILVA *et al.*, 2017). A *Listeria monocytogenes* destaca-se pela capacidade de sobrevivência e proliferação em alimentos mantidos sob refrigeração (ROCCOURT, 1999). A ocorrência destes microrganismos no alimento pode provocar infecções e intoxicações alimentares, desde suas formas mais brandas até afecções graves (PINTO *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2017).

O tratamento de Alta Pressão Hidrostática (APH) tem sido estudado e/ou aplicado comercialmente na conservação de diversos alimentos, incluindo cárneos, pescados, sucos e

produtos lácteos. No Brasil, estão disponíveis no mercado presuntos e sucos processados por APH. O processo consiste em aplicar a pressão no alimento já embalado, com pressões e tempos de variação ampla. Uma bomba hidráulica ou um pistão produz a pressão, que é transmitida isostaticamente dentro do vaso de pressão para o alimento, quase instantaneamente e de maneira uniforme. O processo dura o período apropriado para ativar a destruição ou a formação de ligações não covalentes presentes em componentes alimentares, incluindo pontes de hidrogênio e ligações hidrofóbicas, possibilitando a desnaturação e gelatinização de proteínas e amido, e inativação de enzimas, bactérias patogênicas e micro-organismos nos alimentos (WANG et al., 2016). A sua utilização pode melhorar diversas características nos alimentos e, ainda, causar danos à fisiologia microbiana e sua viabilidade, tanto danificando as células patogênicas e deteriorantes, como as inativando. Tais efeitos variam de acordo com o microrganismo, a pressão e tempo de processo ao qual o alimento é submetido e o tipo de alimento.

O queijo Minas Frescal possui elevada aceitação no mercado brasileiro. Porém, trata-se de um queijo fresco e que possui vida útil relativamente curta, entre duas e três semanas. Intervenções tecnológicas que possam estender o período para sua comercialização e consumo apresentam potencial de aplicação e devem ser estudadas. A utilização de microrganismos probióticos pode contribuir com a saudabilidade do produto e apresenta potencial de aumentar a sua vida útil, perante a competição microbiana. Como um efeito combinado, submeter o queijo probiótico à APH pode elevar ainda mais a sua validade comercial, além de destruir e prevenir o crescimento de microrganismos patogênicos.

OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivos Gerais

Estudar o processo de alta pressão aplicado ao queijo tipo Minas Frescal adicionado de microrganismos probióticos, de modo a estabelecer uma condição que mantenha a viabilidade dos probióticos e prolongue a vida útil do produto.

Objetivos Específicos

- Desenvolvimento de método de fabricação de queijo em miniatura adicionado de probiótico;
- Avaliar a resistência das cepas probióticas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Christian Hansen), e *Lactobacillus rhamnosus* BRM038563 (Embrapa Caprinos) submetidas a Alta Pressão Hidrostática (APH) a diferentes níveis de pressão e tempo;
- Selecionar uma cepa probiótica para o processamento do queijo tipo Minas Frescal;
- Estabelecer a baroresistência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO) em queijo tipo Minas Frescal submetido aos tratamentos de 50, 100, 150, 200, 250, 350, 400, 450 e 500 MPa por 5 e 10 min;
- Determinar o efeito isolado e combinado do tratamento de adição de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1(SACCO) e da pressurização a 200 e 350 MPa por 5 min sobre a estabilidade microbiológica e físico-química do queijo estocado a 4 ± 2 °C por 28 dias.

CAPITULO I

APLICAÇÃO DE ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA EM QUEIJO TIPO MINAS FRESCAL ADICIONADO DE PROBIÓTICO

RESUMO

O consumo de queijo no Brasil aumentou consideravelmente nos últimos anos, anteriormente à presente crise econômica, o que pode ser explicado pelo aumento do poder de compra do consumidor brasileiro, associado ao aumento da percepção do queijo como uma refeição saudável e com alto valor nutritivo. Com o objetivo de manter e/ou elevar os índices de produção, as indústrias buscam investir em inovação e desenvolvimento de novos produtos com utilização de novas tecnologias. A adição de culturas probióticas em queijos tem como perspectiva a melhoria das características nutricionais do produto, assim como o uso da tecnologia de Alta Pressão Hidrostática (APH) pode contribuir para a extensão da vida útil de produtos mais similares a alimentos frescos. Esta revisão aborda as principais características do queijo Minas Frescal, o benefício da incorporação de espécies probióticas, bem como a utilização desses microrganismos em queijos. Além disso, retrata o cenário do uso da APH como tendência emergente para os próximos anos, destacando a sua utilização em queijos.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal, Probióticos, Alta Pressão Hidrostática.

ABSTRACT

The consumption of cheese in Brazil has considerably increased in recent years, mainly previously to the present economic crisis, which can be explained by the increase in the purchasing power of the Brazilian consumer, associated to the enhance in the perception of cheese as a healthy food with high nutritional value. In order to maintain and / or raise the production rates, the industries are currently seeking to invest in innovation and development of new products processed by new technologies. The addition of probiotic cheese cultures contributes to enhance the functional characteristics of cheese, and the use of High Hydrostatic Pressure (HHP) can contribute to extend the shelf life of fresh-like products. This review addresses the main characteristics of Minas Frescal cheese, the benefits of using probiotic species, as well as their incorporation into cheeses. In addition, it depicts the HHP scenario as an emerging trend for the coming years, highlighting its potential application to cheeses.

Keywords: Minas Frescal Cheese, Probiotics, High Hydrostatic Pressure.

1 INTRODUÇÃO

A história nos mostra que os primeiros a ordenharem uma vaca para o consumo do leite, o fizeram aproximadamente em 6 mil a.C., e habitavam as regiões atuais da Inglaterra e de outros países da Europa Ocidental e que, em torno de 3.500 a.C., o povo egípcio utilizava o leite com finalidades religiosas, assim como outras tribos e civilizações. O animal era adorado e dedicado aos deuses cultuados em templos. Já no Brasil, a pecuária leiteira nasceu por volta de 1532 e, nestes quase cinco séculos de existência, a atividade caminhou sem grandes evoluções tecnológicas até 1950. A partir do surto da industrialização do país, sua atividade foi modernizada, mesmo que de forma morosa, ao se comparar com diversas outras atividades, até o final dos anos 60, quando o revolucionário leite tipo B ganhou expressão nacional (RUBEZ, 2003). Porém, de acordo com Rubez (2003), o salto mais qualitativo da pecuária leiteira aconteceu somente por volta de 1980, exibindo dinamismo e possibilitando afirmar que os progressos que ocorreram em apenas duas décadas foram maiores que o dos últimos 500 anos.

De acordo com os dados da Oecd/Fao (2016), entre 2013 e 2015, a União Europeia produziu 158 milhões de toneladas de leite, seguida pela Índia, com 141 milhões de toneladas e, ocupando a terceira posição, os EUA, com 93 milhões de toneladas. Com 29 milhões de toneladas, o Brasil destacava-se entre os sete maiores produtores de leite no mundo, ficando ainda atrás de Rússia, Paquistão e China.

Para 2025, projeções indicavam a Índia como o maior produtor mundial, produzindo em torno de 206 milhões de toneladas de leite e ultrapassando a União Europeia que, com 178 milhões de toneladas, ocuparia a segunda posição no *ranking*. Com os EUA em terceiro, seguido por China, Paquistão e Rússia, o Brasil tenderia a permanecer em sétimo lugar, com perspectiva de produção em torno 39 milhões de toneladas (Oecd/Fao, 2016).

Apesar da posição ainda discreta de certos países em desenvolvimento no *ranking* mundial, esperava-se um aumento de 2,9% por ano no consumo total de produtos lácteos frescos em tais países, para os próximos 10 anos (Oecd/Fao, 2016).

O uso de derivados lácteos em novos mercados está sendo associado como produto base para alimentos funcionais, com a adição de microrganismos probióticos (SILANIKOVE et al., 2010). Essa revisão descreve a produção e consumo de queijos no Brasil, bem como a produção de queijos Minas Frescal probióticos visando aumentar o valor agregado, tornando-o mais competitivo no mercado. Além disso, também aborda a utilização da tecnologia de alta pressão hidrostática em produtos lácteos e as perspectivas de sua utilização em queijos adicionados de probióticos, com o objetivo de combinar os efeitos benéficos à saúde e elevar a vida útil do alimento.

1.2 Produção e Consumo de Queijos no Brasil

O consumo per capita de queijo no Brasil vinha aumentando consideravelmente nos últimos anos. Estima-se que, em 2008 e 2011, os brasileiros consumiram, em média, 3,5 kg de e 4,5 kg, respectivamente, contra apenas 2 kg em 2003 (Abiq, 2011). Em 2014, o consumo alcançou 5 kg (FRANCIA, 2014), gerando receitas de 17,4 bilhões de reais. A expectativa de consumo para 2017 era estimada em 8 kg per capita, de modo a atingir 20 bilhões de reais em vendas (MILK POINT, 2015). Esse bom desempenho pode ser explicado pelo aumento do poder de compra do consumidor brasileiro nesse período, associado ao aumento da percepção do queijo como uma refeição saudável e com alto valor nutritivo (EUROMONITOR, 2015). Conforme dados da Nielsen (2010), das categorias que apresentaram maior crescimento relativo

das vendas, no período 2000-2008, estavam produtos associados ao apelo sensorial e ao prazer como, por exemplo, os queijos. Sloan (2010), especialista em tendências, afirmou que entre os alimentos não essenciais mais consumidos estavam as especialidades associadas a pequenas indulgências, como os queijos, que costumavam atrair mais consumidores pela novidade ofertada.

Uma estratégia para continuar mantendo os bons resultados dos últimos anos pré-crise é o investimento em inovação (SCARCELLI, 2015) e o desenvolvimento de novos produtos, com utilização de novas tecnologias. O desenvolvimento de produtos alimentícios mais saudáveis tem decorrido das exigências dos consumidores, o que configura uma tendência mundial. Essa busca é influenciada pelo envelhecimento das populações, o aumento da renda e as descobertas científicas relacionando dieta e saúde (BARBOSA, 2010). A indústria procurar inovar esses alimentos, desenvolvendo produtos mais saudáveis, com significativo apelo aos benefícios para a saúde do consumidor. (MARTINEZ, 2013). De acordo com Barbosa (2010), os queijos apareciam em quinto lugar como produtos que mais despertavam o desejo do consumidor quando lançados no mercado, podendo se constituir em um veículo propício a inovações voltadas para produtos mais saudáveis.

1.3 Queijo Minas Frescal

Um dos queijos mais populares do Brasil é o Minas Frescal, que é consumido por todas as camadas da população durante todo o ano, possuindo como decorrência grande demanda no mercado brasileiro e revertendo em produção muito expressiva na indústria de laticínios. Trata-se de uma variedade essencialmente brasileira, não maturada, semi-gorda (25,0 - 44,9 % de gordura), rica em cálcio, fósforo e vitamina A. Apresenta pH levemente ácido (5,1 - 5,6) e elevada umidade (> 55,0 %), consistência suave, cor esbranquiçada, aroma suave e característico, destinando-se para consumo imediato, de curta durabilidade, no mercado sob refrigeração (Furtado, 1999).

De acordo com o Regulamento Técnico Geral de Identidade e Qualidade de Queijos, entende-se por Queijo Minas Frescal o 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, sendo classificado como um queijo semi-gordo, de alta umidade, a ser consumido fresco (BRASIL, 2004). Em média, apresenta a seguinte composição: 20,2 % de gordura, 55,1 % de umidade, 17,4 % de proteína e 3 % de cinzas (TBCA, 2011). Em 2010, o queijo Minas Frescal era o quarto tipo de queijo mais consumido no país, ficando atrás apenas do queijo muçarela, prato e do requeijão cremoso (LIMA, 2010).

1.4 Adição de Probióticos em Queijo Minas Frescal

1.4.1 Espécies probióticas e benefícios

Estudos realizados nas últimas décadas têm demonstrado claramente os benefícios que o consumo de alimentos contendo microrganismos probióticos pode trazer à saúde. Esses benefícios vão desde a prevenção e redução de doenças do trato intestinal, como a síndrome do intestino irritável, constipação, diarreia, até estimulação do sistema imunológico, prevenção e tratamento de alergias, proteção do sistema urinário e cardiovascular e redução da pressão

arterial (NAGPAL *et al.*, 2012). Probióticos podem também inibir a proliferação excessiva de bactérias intestinais patogênicas (SHARMA e DEVI, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como microrganismos vivos, capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. De acordo com Bigliardi e Galati (2013), cada vez mais os consumidores vinham buscando investir em alimentos funcionais que lhes ofereciam melhor qualidade de vida e que promoviam a saúde, desempenhando papel de destaque no consumo, com crescente demanda. Além do apelo de saudabilidade, a incorporação de bactérias ácido lácticas em alimentos, como os microrganismos probióticos, também podem contribuir para a extensão de sua vida útil, produzindo uma grande variedade de compostos orgânicos como ácidos, etanol, peróxido de hidrogênio, antibióticos, bacteriocinas, entre outros, que apresentam forte atividade antagonística aos muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos dos alimentos (REIS *et al.*, 2012; SAAD *et al.*, 2013).

As principais espécies probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo utilizadas, principalmente *L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum*, *B. infantis* e *B. longum* (NAGPAL *et al.*, 2012). *Lactobacillus* são anaeróbios facultativos, enquanto que *Bifidobacterium* são anaeróbios, embora algumas espécies desse último se desenvolvam e sobrevivam em ambientes com elevado conteúdo de oxigênio.

1.4.2 Utilização de probióticos em queijos

No segmento de lácteos, os iogurtes e as bebidas lácteas contendo bactérias probióticas destacam-se como os principais alimentos funcionais, disponíveis ao consumidor em supermercados, padarias e lojas de conveniência do país. Para que um produto a base de leite seja considerado probiótico, a quantidade mínima viável de probióticos deve estar situada na faixa de 10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC·g⁻¹), na recomendação diária do alimento pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Ou seja, o consumo de 100g do produto, contendo 10^6 UFC/g de probióticos viáveis, irá garantir a dose mínima diária considerada terapêutica (FIB, 2011). É importante destacar que, além desses microrganismos promoverem efeitos saudáveis e seguros, a seleção de culturas probióticas para incorporação em lácteos deverá obedecer a critérios tecnológicos, sem afetar negativamente o sabor, a textura, devendo permanecer ‘estáveis e viáveis’ (vivos) durante toda a vida útil do produto no mercado consumidor (FIB, 2011).

Produtos lácteos representam a maior parte dos alimentos com probióticos comercializados atualmente e, entre eles, o iogurte e leite fermentado são os mais consumidos. Porém, diversos estudos têm mostrado que a incorporação de probióticos em queijos apresenta vantagens em relação a iogurtes e leites fermentados, sendo uma maneira eficaz de aumentar a sobrevivência desses microrganismos, devido ao ambiente menos hostil (BOYLSTON *et al.*, 2004; BURITI, DA ROCHA, ASSIS, *et al.*, 2005; BURITI *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2008). Queijos são mais densos, possuem níveis de pH mais altos (4,8-5,6), maior capacidade tamponante, maior teor de lipídios e menor teor de oxigênio, e todos esses fatores atuam na proteção dos microrganismos probióticos, tanto durante a estocagem do produto, quanto durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) (ROSS *et al.*, 2002; BOYLSTON *et al.*, 2004). Na realidade, o queijo cria um efeito tampão contra o ambiente ácido elevado no TGI produzindo, assim, um ambiente mais favorável à sobrevivência das bactérias probióticas, ao

longo do trânsito gástrico (KARIMI et al., 2012). Além disso, a incorporação de microrganismos probióticos pode inibir o crescimento de microrganismos patogênicos no queijo (CHIODA et al., 2006; PIGATTO et al., 2007).

A adição de probióticos pode afetar a textura dos queijos devido ao aumento da proteólise das caseínas e pela influência na taxa de acidificação do leite, uma vez que quanto mais intensa a produção de ácido láctico e quanto menos cálcio ligado à caseína, mais frágil poderá ser a textura dos queijos (KARIMI et al., 2012). De forma geral, a viabilidade dos probióticos em queijos tem sido satisfatória, mesmo em períodos de estocagem. Em alguns estudos, as contagens viáveis de bactérias probióticas ao fim do armazenamento situaram-se entre 10^6 a 10^8 UFC/g (KARIMI et al., et al., 2012).

Em estudos, BB-12 e LA-5 foram utilizados em queijo de ovelha tipo Scarmoza (ALBENZIO et al., 2013). De acordo com Alves (2012), em creme de queijo, culturas de *Bifidumbacterium lactis* apresentaram sobrevivência ao longo de 45 dias sob refrigeração. Oliveira et al. (2014), Meira et al. (2015) e Rolim et al. (2015) estudaram a importância da viabilidade dos probióticos *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus rhamnosus* durante o armazenamento e a resistência desses microrganismos à passagem ao trato gastrointestinal (TGI), obtendo resultados satisfatórios para sua incorporação, com alta viabilidade das culturas em seu período de armazenamento e elevada tolerância aos ácidos, sais biliares e enzimas gástricas, sugerindo que diferentes tipos de queijos podem ser matrizes promissoras de probióticos para o consumo humano.

1.4.3 Queijo Minas Frescal probiótico

O queijo Minas Frescal, por ser um alimento rico em nutrientes e com um alto teor de umidade, corresponde a um meio ideal para a proliferação de microrganismos, tanto benéficos como patogênicos. Uma das tentativas para enriquecer a massa e trazer benefícios à saúde humana é a adição de bactérias probióticas, já utilizadas em larga escala na produção industrial deste produto, que apresenta mercado crescente. Atualmente, podemos encontrar diversas marcas comerciais de queijo Minas Frescal produzidas com adição desses microrganismos. Entre elas, temos o queijo da marca Sanbios, comercializado com 350g e que utiliza *Bifidumbacterium lactis* subsp. *lactis*; A Tirolez utiliza o mesmo microrganismo e seu queijo é comercializado com aproximadamente 270g; A marca Polenghi fornece o produto com 250g, adicionado de *Lactobacillus acidophilus*. Já a Biologicus, utiliza Kefir, uma mistura de diferentes microrganismos, para a produção desse queijo probiótico.

A ubiquidade deste queijo é definida por seu alto rendimento, processo de fabricação simples, de baixo custo e boa aceitação por parte dos consumidores, atraindo o interesse da indústria de queijos (SANT'ANA et al., 2013). Um estudo utilizando queijo Minas Frescal probiótico evidenciou que as bactérias probióticas podem controlar a pressão arterial de animais e efeitos clínicos anti-hipertensivos, pela ingestão do produto (SHARAFEDTINOV et al., 2013). Em conformidade a este fato, em outro estudo efetuado em animais, o queijo Minas Frescal com *B. longum* e *L. acidophilus* mostrou efeito regulador contra a hipertensão, em seu consumo diário. Foi capaz também de apresentar uma significativa diminuição do colesterol LDL e níveis de triglicerídeos (LOLLO, 2015). Em testes realizados por Felicio et al. (2016), o microrganismo *L. acidophilus* (LA-5) foi utilizado para produção de queijo Minas Frescal probiótico com reduzido teor de sódio, evidenciando sobrevivência e funcionalidade do mesmo.

O uso de culturas de bactérias probióticas na produção de queijo Minas Frescal possibilita a melhora do funcionamento do intestino e reduz os riscos de contaminação por microrganismos patogênicos (SAARELA et al., 2002; SANDERS, 2003; SCHMID et al., 2006). O queijo Minas Frescal é adequado para a incorporação da bactéria probiótica *L. acidophilus* pois não altera suas características físico-químicas, podendo ser adicionado, sem prejudicar a qualidade do produto. A cultura empregada permaneceu em níveis altos durante todo o período de armazenagem, apresentando populações suficientes para caracterizá-lo como potencialmente probiótico (ALVES et al., 2011). Outro estudo mostrou que o queijo Minas Frescal ofereceu excelentes condições para a adição de *Bifidobacterium* em sua composição (FRITZEN-FREIRE, MUELLER, LAURINDO, AMBONI, e PRUDENCIO, 2010). Além disso, comprovou-se que ingestão contínua de queijo probiótico levou a melhorias na supressão imunológica induzida pelo exercício (LOLLO et al., 2012), além de potenciais benefícios para a constipação (FAVRETTO, PONTIN, e MOREIRA, 2013).

1.5 Tecnologia de Alta Pressão Hidrostática (APH)

1.5.1 Histórico

A indústria de alimentos tem procurado suprir os anseios do consumidor por produtos mais saudáveis, frescos, palatáveis, livres de aditivos e microbiologicamente seguros e estáveis, investindo em tecnologias emergentes e mais “limpas”, que não utilizam calor ou que o aplique de forma moderada. Dessa forma, o crescimento de mercados tais como o de alimentos minimamente processados, sem aditivos e com maior tempo de vida útil, tende a criar a demanda para as empresas desenvolverem e empregarem novas tecnologias de processamento. Seguindo este direcionamento, diversas pesquisas estão sendo realizadas em todo mundo numa busca de processos que garantam a segurança do alimento e mantenham características sensoriais e valor nutricional, além de reduzirem os custos de processamento do alimento. A maioria deles tem natureza não térmica: pulsos elétricos, luz pulsante, radiação ionizante ou alta pressão hidrostática (BFT2020, 2010). A APH é uma das principais tecnologias emergentes capazes de substituir os processos térmicos convencionais, de forma ambientalmente sustentável. De acordo com Oey et al (2008), no processo de alta pressão hidrostática (APH), ao contrário do processamento térmico tradicional, o tamanho e a geometria do produto a ser tratado não são pontos críticos, porque a pressão é transmitida isostaticamente através de todo o produto. Trata-se de um método de conservação não térmico que consiste em submeter alimentos líquidos ou sólidos a pressões entre 100 e 800 MPa durante um determinado tempo, que pode variar de um milésimo de segundo a mais de vinte minutos, associado ou não com a elevação da temperatura (FDA, 2014).

O tratamento por alta pressão tem baixo consumo energético, não provocando a quebra de ligações químicas covalentes nas substâncias existentes e a formação de novos compostos. Em razão disso, não ocorrem perdas nutricionais ou de componentes aromáticos (OEY I. et al., 2008). Os compostos de baixo peso molecular, responsáveis pelas características sensoriais e nutricionais dos alimentos, não são afetados pela pressurização, porém os componentes de alto peso molecular, como as proteínas, responsáveis pela estrutura e funcionalidade, são mais suscetíveis a alterações pela aplicação da APH (Sun, 2006; Toepfl et al., 2006). A sua principal vantagem é propiciar inativação de microrganismos e enzimas, aumentando a vida útil com possibilidade de redução do uso de aditivos alimentares (KNORR, 2002).

De acordo com a Brasil Food Trends 2020 (2010), o uso da APH está entre as tecnologias que se adequam às tendências emergentes para os próximos anos, conforme mostra a Tabela 1, que lista as características da APH, dentro de cada item de tendência.

Tabela 1. Atributos associados a tendências futuras, e correspondência com as características da APH (BFT2020, adaptada.)

Tendência	Sensorialidade e prazer	Saudabilidade e bem-estar	Conveniência e praticidade	Confiabilidade e qualidade	Sustentabilidade e Ética
Características da APH	Promove a retenção dos componentes aromáticos.	Manutenção do valor nutricional do alimento.	Processo potencial para o desenvolvimento de produtos alimentícios com novas texturas e sabores.	Aumento do tempo de vida útil do alimento. Processo seguro.	Baixo consumo energético. Compatibilidade de processo com embalagens flexíveis e semirrígidas.

Os produtos alimentícios processados por alta pressão passaram a ser disponibilizados em diferentes países a partir de meados dos anos 90. No Brasil, os primeiros produtos industriais (sucos de fruta) produzidos por APH passaram a ser comercializados no ano de 2013. Tratavam-se de sucos integrais de frutas, nos sabores laranja, limão, maçã e uva, além dos *mix* de morango e limão, maçã e morango e laranja e maçã, produzidos pela empresa Natural One® (NATURAL ONE, 2013). Posteriormente, a empresa Sadia do setor carne passou a produzir uma linha de produtos tratados por APH, combinada com atmosfera modificada, a qual denominou “Soltíssimo” (SADIA, 2015). Mais recentemente a empresa Green People, também do setor de sucos, passou a empregar o processo de alta pressão, resultando em produtos com 45 dias de prazo de consumo. A empresa possui 12 sabores de sucos mistos, compostos de frutas, legumes, sementes e condimentos que, após o envase em garrafas plásticas (PET), é submetido ao processo de APH (GREEN PEOPLE, 2017).

1.5.2 APH em queijo Minas Frescal probiótico

A APH tem sido considerada um método capaz de modificar a estrutura proteica, promover a inativação ou ativação enzimática e evitar a utilização ou formação de compostos químicos indesejáveis, o que para a indústria de laticínios são características fundamentais, pois podem favorecer o tratamento do leite ou a obtenção de derivados com características sensoriais e nutricionais diferenciadas (Trujillo, 2002). O uso da alta pressão em lácteos é considerado uma ferramenta poderosa para desenvolver novos produtos de leite, mais seguros, de melhor valor nutricional e qualidade sensorial, atendendo, assim, as novas exigências dos consumidores (CRUZ et al., 2010). Neste mercado, tem-se destacado a incorporação dos probióticos, principalmente em produtos lácteos como iogurtes (RANADHEERA et al., 2012) e queijos (BEZERRA et al., 2016). Suas aplicações em queijos vêm sendo estudadas principalmente para reduzir a variação de umidade em lotes do produto, uniformizar a salga (SALDO et al., 2000), acelerar o período de maturação (JUAN et al., 2008) e na inativação microbiana (EVRENDILEK et al., 2008).

Com relação à microbiota patogênica, a utilização da alta pressão hidrostática tem demonstrado potencial na inativação de *Listeria monocytogenes* em queijo (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2012). Porém, a eficácia do processamento por alta pressão na inativação da *L.*

monocytogenes depende de parâmetros como os níveis de pressão, tempo e temperatura. Gallot-Lavallée (1998) estudou a eficiência da alta pressão na inativação de *L. monocytogenes* em queijo de cabra produzido com leite cru, e verificou que tratamentos a 450 MPa por 10 min. ou 500 MPa por 5 min. reduziram em torno de 5,6 ciclos logarítmicos da população desse patógeno, sem afetar as características sensoriais do alimento. Lopez-Pendemont et al. (2007) verificaram que o tratamento com alta pressão, a 500 MPa por 5 min., reduziu a população de *Staphylococcus aureus* em queijos estocados a 8°C, ao longo de 30 dias. Arriada et al. (2011) demonstraram que queijos frescos, submetidos ao tratamento por alta pressão a 300 e 400 MPa por 5 min. e estocados a 4°C, apresentaram redução na contagem de enterobacteriaceas e *Escherichia coli*, e tiveram sua vida útil prolongada em duas semanas, em relação ao queijo controle.

Alguns estudos já foram realizados sobre a incorporação de probióticos em queijo Minas Frescal (Buriti, Da Rocha, Assis, et al., 2005; Buriti, Da Rocha e Saad, 2005; Buriti et al., 2007; De Souza et al., 2008). Porém, uma busca na literatura revela que não existem estudos sobre o processamento de queijos com probióticos por APH. Esta tecnologia tem se mostrado uma alternativa no controle de patógenos tóxicos e infecciosos encontrados em queijos tornando, assim, esses produtos microbiologicamente mais seguros, proporcionando o prolongamento de sua vida útil (MARTINEZ-RODRIGUEZ et al., 2012).

Há a necessidade de realizar mais estudos quanto à resistência desses microrganismos a pressões elevadas, porém Tsevedou e Taoukis (2011) ao investigarem o efeito da APH (100 – 400 MPa) e do tempo de processamento no microrganismo probiótico *Bifidobacterium* sp. em meio de cultura MRS, observaram que a 100 e 200 MPa não houve inativação dos mesmos, porém a 300 MPa houve redução de até 6 ciclos logarítmicos após 20 minutos, e a 400 MPa houve completa inativação, apenas com um pulso de pressão. Outro trabalho demonstrou que *Lactobacillus ramnhosus*, suspenso em meio MRS, resistiu a um tratamento de 400 MPa/10 min, porém foi inativado a 500 MPa/10 min (ANANTA, HEINZ et al. 2004).

1.6 Vida Útil Microbiológica

O queijo Minas Frescal possui elevado potencial como suporte de ingredientes funcionais, como bactérias probióticas (FERNANDES et al., 2012; MALHEIROS et al., 2012). Porém, durante sua produção, de acordo com Karaman (2012) e Cusato et al. (2013), várias etapas facilitam a contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos, principalmente em condições de higiene precárias. Com relação aos aspectos microbiológicos, Pinto et al. (2011) consideraram, como principais bio-indicadores de contaminação em queijos, as bactérias do grupo coliformes, bactérias patogênicas como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e certos bolores e leveduras. A presença desses microrganismos no alimento compromete a segurança do produto final, relacionando-se a má qualidade da matéria-prima e adoção de técnicas higiênicas inadequadas (TIMM et al., 2004).

A qualidade do produto final é um entrave delicado, principalmente em se tratando de um alimento fresco e úmido, pois além dos possíveis danos à saúde e de surtos toxicológicos, bactérias patogênicas e deteriorantes, ao se desenvolverem no alimento, atuam na degradação de diversos compostos, como proteínas e gordura, influenciando nas características sensoriais (FAVA et al., 2012; SILVA T.E., 2015).

1.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar dos diversos estudos que enfocam a incorporação de probióticos em queijo Minas Frescal, e também que relacionam queijos frescos e APH, não há na literatura pesquisas que descrevam a utilização de APH em queijo Minas Frescal probiótico. Em virtude dos benefícios descritos dos microrganismos probióticos e das características deste tipo de queijo, principalmente por ser considerado uma boa matriz de incorporação dessas bactérias, a utilização da tecnologia de alta pressão pode ser promissora para a indústria alimentícia, promovendo extensão de vida útil pela redução da carga microbiana de deteriorantes e patogênicos.

CAPITULO II ¹

MÉTODO DE PRODUÇÃO DE MINI-QUEIJOS TIPO MINAS FRESAL COM *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

⁽¹⁾ Pesquisa componente do projeto de pós-doutorado da Dra. Julia Hauck Tiburski, que atuou como co-orientadora no estudo.

RESUMO

Os queijos em miniatura apresentam-se como uma alternativa para simplificação operacional e redução do tempo de preparação, assim como de material, em pesquisa e desenvolvimento, podendo igualmente constituir um produto em si. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de produção de mini-queijos tipo Minas Frescal para aplicação em pesquisa e/ou desenvolvimento com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. Para cada 1 litro de leite pasteurizado foram obtidos oito mini-queijos de 25g. A etapa diferencial do método foi a dessora, realizada em centrífuga, resultando em queijos com dimensões definidas por tubos Falcon. As características físico-químicas (umidade, rendimento, pH e acidez) e o comportamento durante a estocagem a 4 ± 2 °C por 28 dias dos mini-queijos sem probiótico foram similares aos mini-queijos adicionados de probiótico. A concentração de *B. animalis* foi reduzida em 1,15 log UFC/g aos 28 dias de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos de aplicação do probiótico em queijos tipo Minas Frescal, comprovando a adequação do método de produção de mini-queijos para estudos de simulação ou para potencial aplicação tecnológica.

Palavras-chave: Mini-queijo; probiótico; Minas Frescal

ABSTRACT

The miniature cheeses could be an alternative for operational simplification and reduction of preparation material and time in research and development, besides being a potential product itself. The objective of this work was to develop a method of producing Minas Frescal mini-cheeses for application in studies with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. For each 1 liter of pasteurized milk, eight mini-cheeses of 25g were obtained. The differential step of the elaboration method was whey draining, performed in a centrifuge, which resulted in cheeses with dimensions defined by Falcon tubes features. The physical chemical characteristics (moisture, yield, pH and acidity) and the behavior during storage at 4 ± 2 °C for 28 days were similar both for the non-probiotic (control) and probiotic mini cheeses. The concentration of *B. animalis* decreased 1.15 log FCU/g up to the end of the storage. These results are in agreement with other studies published on probiotics application to Minas Frescal cheese, proving the adequacy of the mini-cheese production method for simulation studies or for potential technology application.

Keywords: Mini-cheese; Probiotic; Minas Frescal

1 INTRODUÇÃO

Os queijos de alta umidade são um dos principais tipos de produtos lácteos consumidos pelos brasileiros, com destaque para o queijo Minas Frescal. Estes queijos são objetos dos mais variados estudos, envolvendo diferentes tipos de leite, tecnologias de produção e aspectos de qualidade e saudabilidade. Em pesquisa e desenvolvimento, a produção dos queijos em miniatura pode ser uma alternativa eficaz na realização de análises laboratoriais, comparada ao processo tradicional de confecção dos queijos tipo Minas Frescal, permitindo melhor controle de preparo, reduzindo tempo e material, além de poder constituir um produto com potencial comercial em si.

A produção de queijos de coalho lavado em miniatura foi descrita por (HYNES *et al.*, 2000), que conduziram a produção de mini-queijo por processo laboratorial com a utilização de autoclave, banho-maria e centrífuga. Acondicionaram 400 mL de leite de pasteurizado a 32 °C em garrafas esterilizadas em autoclave por 10 min a 110 °C. O leite foi inoculado com culturas *starters* (2% v/v) e mais 3 mL de coalho. As garrafas foram cobertas imediatamente e invertidas três vezes para promoverem a homogeneização, logo após todas foram mantidas em banho-maria por 32 °C. O tempo de coagulação foi apurado através da verificação da adesão da caseína às paredes das garrafas. Para a remoção da fase aquosa do queijo, as garrafas foram centrifugadas a 350 g por 10 min. Após esta etapa, a massa foi transferida para recipientes cilíndricos estéreis e re-centrifugadas a 1400 g por 1 h a 30 °C em centrífuga equipada com rotor “móvel”. Tal processo resultou em 4 mini-queijos de 40g cilíndricos com (6 cm de diâmetro, 2 cm de espessura) de superfície lisa e regular. Esse método foi adaptado no presente estudo para se adequar a produção de mini-queijos tipo Minas Frescal adicionados de probióticos, facilitando a realização de análises microbiológicas, físicas e físico-químicas. Esta adaptação resultou em um processo inicial de coagulação do leite, seguido por corte da coalhada, acondicionamento da massa em tubos Falcon de 50 ml e dessora complementar em centrífuga. As dimensões do queijo foram definidas pelo tubo, apresentando 28 mm de diâmetro e em torno de 60 mm de altura, com peso final em torno de 25 g.

Os probióticos são aplicados na produção de diversos lácteos com a finalidade de promover benefícios à saúde da população. Esses benefícios vão desde a prevenção e redução de doenças do trato intestinal, como a síndrome do intestino irritável, constipação, diarreia, até estimulação do sistema imunológico, prevenção e tratamento de alergias, proteção do sistema urinário e cardiovascular e redução da pressão arterial (NAGPAL *et al.*, 2012), além de inibir a proliferação excessiva de bactérias intestinais patogênicas (SHARMA e DEVI, 2014).

Para que um produto a base de leite seja considerado probiótico, a quantidade mínima viável de probióticos deve estar situada na faixa de 10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônias por grama (UFC·g⁻¹), na recomendação diária do alimento pronto para o consumo (BRASIL, 2008). Ou seja, o consumo de 100g do produto, contendo 10^6 UFC/g de probióticos viáveis, irá garantir a dose mínima diária considerada terapêutica (MARUYAMA, 2006).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de produção de mini-queijos tipo Minas Frescal com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. O método empregado neste trabalho foi adaptado do descrito por Hynes et al., (2000).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Método De Produção De Mini-queijos

O fluxograma de produção dos queijos em miniatura é apresentado na Figura 1. A produção foi realizada em laboratório, em condições controladas, de modo a reduzir a variabilidade das amostras e minimizar a contaminação microbiológica.

Leite integral pasteurizado tipo B (Boa Nova, Cooperativa Mista de Valença, Valença - RJ) em sacos plásticos de 1 L, com no máximo três dias de armazenamento em temperatura 5 ± 2 °C foi empregado nos experimentos. O leite foi acondicionado em Becker de 2 L e aquecido em forno de micro-ondas (Brastemp - BMA30AF) até a temperatura de 37-38 °C. A cultura probiótica liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO, Itália) foi inoculada no leite, em quantidade suficiente para que o queijo apresentasse concentração mínima de 6 log UFC/g de probiótico.

A hidratação da cultura foi realizada durante 30 min através da mistura lenta durante 5 min com colher, até a completa dissolução dos grumos, seguida por agitações lentas em intervalos sucessivos de 5 min, cada agitação com duração de 1 min. Após a hidratação da cultura, foi conduzida a adição de 0,4 ml de cloreto de cálcio a 40% (Rica Nata Indústria e Comércio Ltda, Piracema, MG) em mistura lenta por 1 min, seguida da incorporação de 0,8 ml de coalho HA-LA, 1:3000/75 IMCU (Christian Hansen, Valinhos, SP) com mistura lenta por 1 min, de acordo com recomendações dos fabricantes. O repouso para coagulação foi conduzido em estufa (Marconi, Incubadora B.O.D. M.A. 415) a 37°C por 45 min.

A massa coalhada foi cortada com faca nos sentidos longitudinal, transversal e horizontal, de modo a obter cubos com cerca de 1,0 cm de arestas. O descanso da massa foi realizado por 3 min, com posterior adição de sal a 1,2 % e mexedura por mais 20 min. A massa de queijo foi transferida para os tubos Falcon com auxílio de peneira e colher. A centrifugação foi conduzida em centrífuga (CIENITEC- CT5000) a 3763G por 15 min, possibilitando a retirada de cerca de 20 mL de soro por mini-queijo ao final da operação. Os mini-queijos com cerca de 25g foram embalados a vácuo, individualmente, em sacos de polietileno. Estas operações foram conduzidas em cabine de segurança do tipo fluxo laminar (VECO – VLF1-12), prevenindo eventuais contaminações dos mini-queijos. Logo em seguida, foram armazenados sob refrigeração a 4 ± 2 °C por 28 dias e submetidos a caracterização microbiológica, físico-química e física.

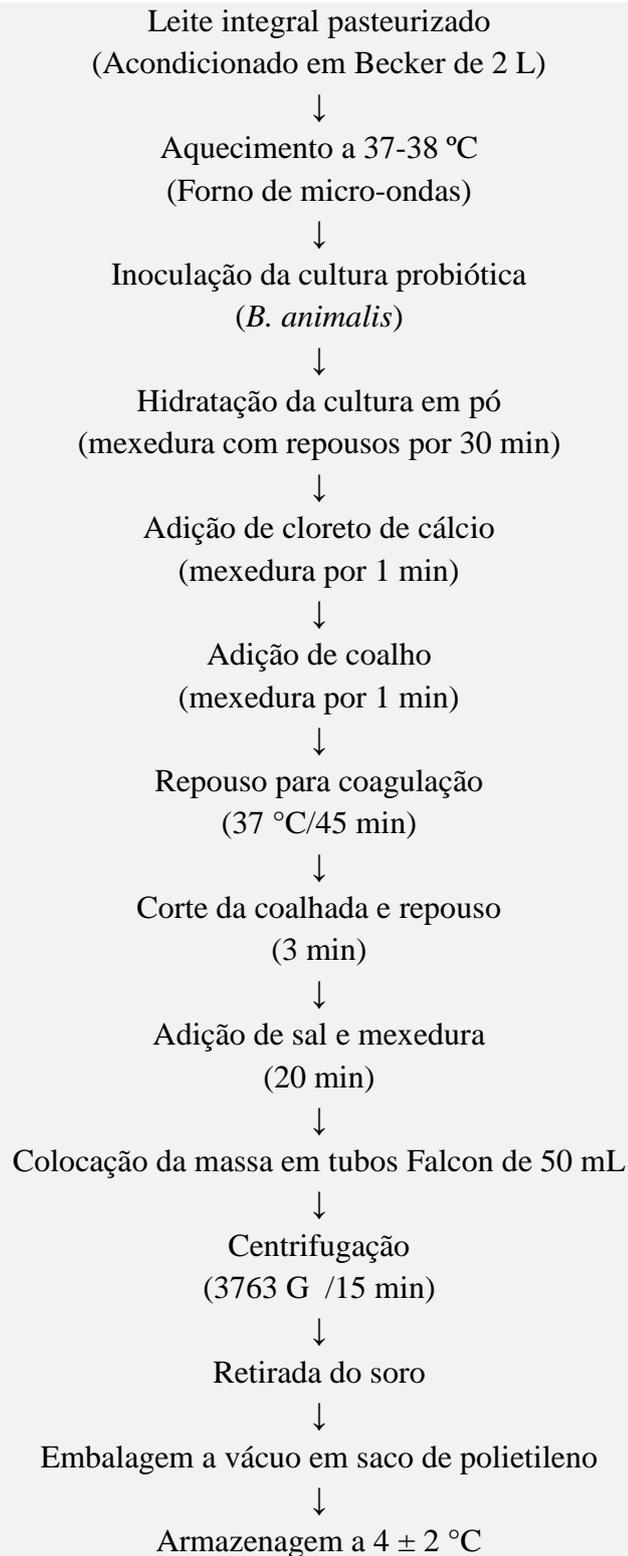


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo tipo Minas Frescal adicionado de probióticos em miniatura.

No processo de fabricação tradicional do queijo tipo Minas Frescal, após a enformagem é necessário realizar até 4 viragens com intervalo de 1 hora, sendo a primeira viragem após 60 minutos da adição da massa à fôrma. Além disso, o queijo tradicional deve ser mantido em fôrma sob refrigeração por no mínimo 24h antes de ser embalado (Boletim técnico-Unicentro, 2008). Enquanto isso, os mini-queijos podem ser embalados logo após o processo de centrifugação. Esta etapa reduz o tempo de fabricação do queijo, pois suprime a etapa de dessora complementar, realizando as viragens periodicamente.

Já na produção de mini-queijos, obtêm-se 8 queijos com cerca de 25 g para cada 1 litro de leite pasteurizado, constituindo em torno de 20 % de rendimento do queijo. O percentual de rendimento do queijo representa mais uma vantagem neste tipo de produção, em comparação ao método tradicional, que possui rendimento variando de 10% a 18% dependendo do processo de fabricação descrito em diversos trabalhos. Perry (2004) obteve o rendimento de 10 a 15%, assim como a EMATER (2001) descreve um rendimento em torno de 15-16%.

As dimensões do queijo foram definidas pelo tubo, apresentando 28 mm de diâmetro e em torno de 60 mm de altura (Figura 2), com peso final em torno de 25g.

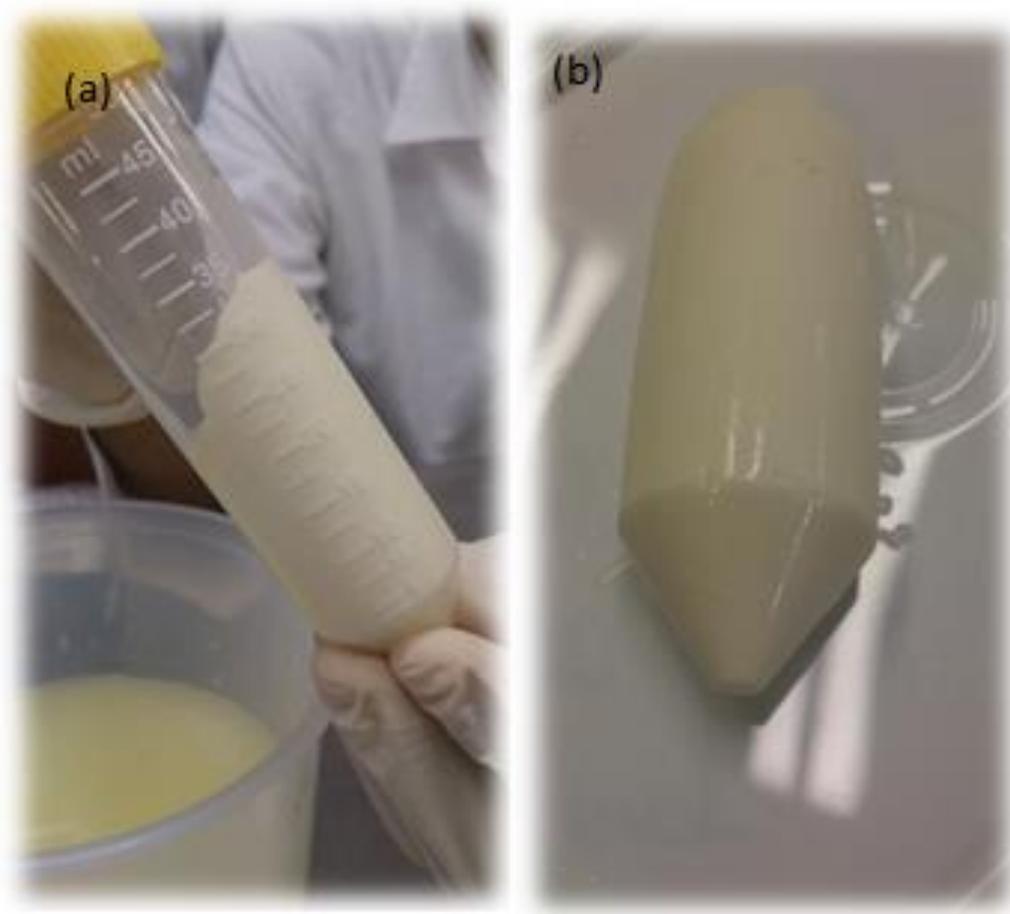


Figura 2. Demonstração de mini-queijo tipo Minas Frescal.

(a) em tubo Falcon de 50ml;

(b) formato do queijo em miniatura.

(Fonte: arquivo pessoal)

2.2 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas dos mini-queijos tipo Minas Frescal foram realizadas de acordo com a Normativa nº 68, em duplicata e com duas repetições (BRASIL, 2006), abrangendo umidade, cinzas, Nitrogênio total, extrato etéreo, titulável (expressa em teor de ácido láctico).

2.2.1 Umidade

Para a realização da análise de umidade, foram pesadas cerca de 2 g da amostra de mini-queijo tipo Minas Frescal em pesa-filtro, com adição de areia e bastão, secos a 70°C e devidamente tarados. A amostra foi aquecida durante 5 horas em estufa (vácuo a 70°C), sob pressão 70 mm de mercúrio (Hg). As amostras, resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente, foram posteriormente pesadas. Esta operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até obtenção de peso constante (AOAC, 1996). Foi adotada a seguinte fórmula para cálculo da umidade neste método:

$$(\% \text{ de umidade} = (100 \times N) / P \text{ onde:}$$

N = massa de água evaporada (g)

P = massa da amostra (g)

2.2.2 Sinérese

O cálculo de sinérese foi realizado quantificando (em gramas) o soro de leite liberado por cada amostra de queijo em sua própria embalagem (AICHINGER et al., 2003). Os resultados obtidos em porcentagem foram calculados, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sinérese} = (PS/PA).100, \text{ onde:}$$

PS = Peso do soro; e

PA = Peso inicial da amostra.

2.2.3 pH

Conforme metodologia nº 981.12 estabelecida pela AOAC (2010), para a verificação de pH foram homogeneizados 10 g de amostra em 100 mL de água destilada aquecida a 45°C, com as leituras realizadas diretamente em potenciômetro digital previamente calibrado.

2.2.4 Acidez total

Para análise de acidez total, foram transferidos 10g de amostra do mini-queijo tipo Minas Frescal para um béquer, com cerca de 50mL de água aquecida isenta de gás carbônico, sendo a mistura agitada até a melhor dissolução possível. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100mL e completado o volume com água. Após esta etapa, uma alíquota de 50mL foi transferida para um erlenmeyer, esfriada, e acrescentadas 0,15mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v), sendo titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1mol/mL até obtenção da coloração rósea por 30 segundos. Para o cálculo da acidez, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Ácido láctico} = (f \cdot V \cdot 0,09 \cdot n \cdot 100) / m, \text{ onde:}$$

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N (utilizado para titulação, em mL);
 m = massa da amostra (em gramas);
 f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;
 $0,09$ = fator de conversão do ácido láctico; e
 N = normalidade de solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Após os cálculos, os resultados foram expressos em gramas de ácido láctico por 100g.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A miniatura do queijo com probiótico apresentou teor de umidade inicial $67,38 \pm (0,07)$ g/100g, enquanto o queijo sem probiótico $66,98 \pm (0,01)$ g/100g. A incorporação de probióticos não afetou significativamente ($p > 0,05$) o teor de umidade inicial dos mini-queijos. Carvalho et al (2007) encontraram uma faixa de umidade entre 57,3% e 67,2% para queijos Minas Frescal produzidos por diferentes processos: com adição de cultura láctica, acidificação direta utilizando ácido láctico e por ultrafiltração. No processo com adição de cultura láctica, a umidade foi $57,3 \pm 3,8\%$. Fritzen-Freire et al (2010) também obtiveram umidade na faixa de 60,4-67,3% em queijos produzidos com a adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) e/ou ácido láctico. Os trabalhos apresentados corroboram com o requisito característico de queijos com muita alta umidade, em conformidade aos resultados obtidos neste experimento, não sendo inferior a 55%, conforme legislação (BRASIL, 2000).

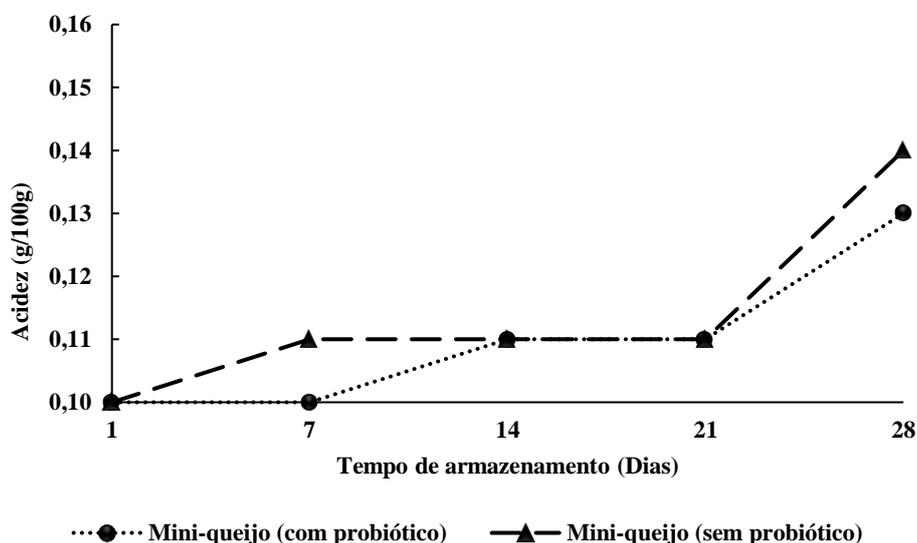
A Tabela 1 apresenta a sinérese dos mini-queijos durante o armazenamento sob refrigeração a ± 4 °C por 28 dias. Na primeira semana de armazenamento, o mini-queijo com probiótico apresentou sinérese de $10,55 \pm (0,10)$ %, enquanto o mini-queijo sem probiótico apresentou $11,06 \pm (0,19)$ %. Nas semanas 2, 3 e 4 os queijos com probióticos apresentaram resultados de $16,36 \pm (0,09)$ %, $24,16 \pm (0,06)$ %, e $27,12 \pm (0,28)$ %. Enquanto os queijos sem probióticos apresentaram resultados de $17,54 \pm (0,36)$ %, $24,75 \pm (0,23)$ % e $27,53 \pm (0,30)$ %, respectivamente. Ao fim do armazenamento, o mini-queijo com probiótico apresentou $28,53 \pm (0,11)$ %, enquanto o mini-queijo sem probiótico resultou em $29,07 \pm (0,08)$ % de sinérese. Estes resultados indicam que a aplicação do probiótico influenciou a sinérese dos mini-queijos reduzindo a mesma, existindo, portanto, diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$), a despeito das pequenas diferenças havidas em valores absolutos.

Tabela 1. Sinérese (%) dos mini-queijos armazenados sob refrigeração a 4 ± 2 °C durante 28 dias.

Tempo (dias)	Mini-queijo com probiótico	Mini-queijo sem probiótico
1	10,55 ± (0,10) ^{Eb}	11,06 ± (0,19) ^{Ea}
7	16,36 ± (0,09) ^{Db}	17,54 ± (0,36) ^{Da}
14	24,16 ± (0,06) ^{Cb}	24,75 ± (0,23) ^{Ca}
21	27,12 ± (0,28) ^{Bb}	27,53 ± (0,30) ^{Ba}
28	28,53 ± (0,11) ^{Ab}	29,07 ± (0,08) ^{Aa}

(*) Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). (**) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

A Figura 3 apresenta o perfil de pH e acidez dos mini-queijos durante o armazenamento refrigerado a 4 ± 2 °C por 28 dias. Os mini-queijos com probiótico e sem probiótico apresentaram o mesmo pH inicial 7,0. Ao longo do armazenamento, não houve diferença significativa entre as amostras de mini-queijo com e sem probiótico. Estes resultados indicam que a incorporação de *B. animalis* não afetou significativamente ($p > 0,05$) o pH. Entretanto, o pH final dos mini-queijos com e sem probiótico de 6,7 e 6,8 respectivamente, diferiram significativamente do pH inicial ($p \leq 0,05$).



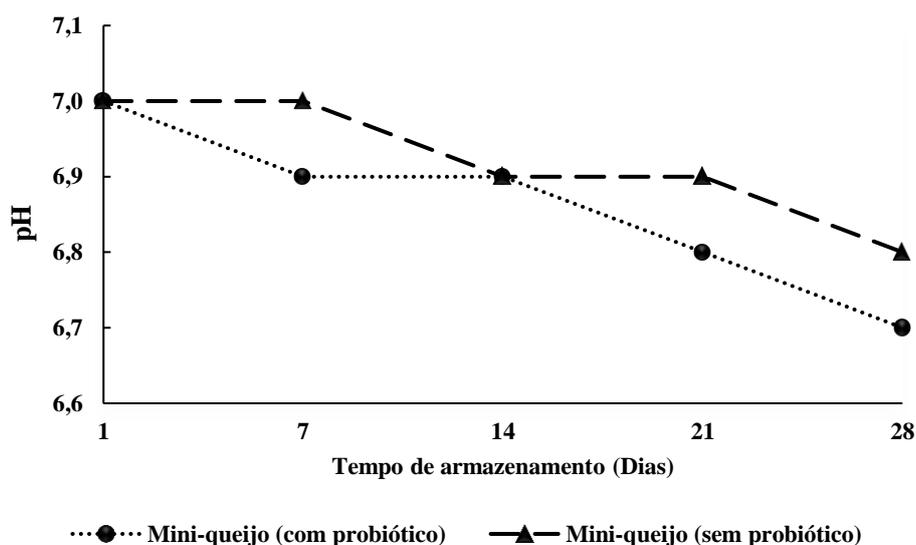


Figura 3. Perfil de pH e Acidez (g/100g) dos mini-queijos com e sem probióticos armazenados sob refrigeração a 4 ± 2 °C durante 28 dias.

Verruck et al (2015) também obtiveram que a adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) não afetou o pH inicial e o obtido ao longo do armazenamento de queijo Minas Frescal estocado a ± 5 °C durante 30 dias. Dantas et al (2016) encontraram valores similares de pH em suas amostras de queijo controle, variando entre 6,69 e 6,65 ao longo de 20 dias, armazenadas a 5 °C

A estabilidade físico-química dos mini-queijos é uma condição fundamental para a manutenção da viabilidade dos probióticos. Boylston et al. (2004) recomendam uma faixa de pH entre 6,5 e 7,0 como ideais para manter a viabilidade de probióticos em queijos, sendo que pH abaixo de 5,0 podem destruir as culturas probióticas.

A miniatura do queijo com probiótico e sem probiótico apresentaram acidez inicial de 0,10 g/100g. Na segunda e terceira semana os queijos com e sem probiótico apresentaram acidez de 0,10 g/100g e 0,11 g/100g respectivamente. Na quarta e quinta semana de armazenamento, houve um aumento na acidez para 0,13 g/100g do queijo com probiótico, e 0,14 g/100g no queijo sem probiótico, resultado que difere significativamente das outras semanas. A incorporação de probióticos não afetou significativamente ($p > 0,05$) a acidez dos mini-queijos.

O estudo sobre as características de acidez do queijo tipo Minas Frescal adicionado de *Bifidobacterium*, realizado por Fritzen-Freire et al (2010), mostrou que amostras Controle variaram entre 0,09 g/100g e 0,28 g/100g ao longo de 28 dias, enquanto as amostras adicionadas de probiótico variaram entre 0,09 g/100g e 0,31g/100g no mesmo período de tempo.

Os mini-queijos com probiótico e os sem probiótico apresentaram concentrações de *Staphylococcus* sp. e Coliformes 45 °C inferiores a $1,0 \times 10^1$ UFC/g e ausência de *Salmonella* spp. durante a estocagem a 4 ± 2 °C por 28 dias, estando de acordo com os padrões legais (BRASIL, 2000). Estes resultados são indicativos da adequação das condições higiênicas empregadas na produção dos mini-queijos.

A concentração inicial de probióticos foi de $8,13 \pm 0,54$ log UFC/g. Aos 7 dias, a contagem foi de $7,80 \pm 0,66$ log UFC/g, seguida de $7,40 \pm 0,12$ log UFC/g aos 14 dias, $7,32 \pm 0,10$ log UFC/g aos 21 dias e $6,98 \pm 0,49$ log UFC/g com 28 dias, representando uma redução de 1,15 log UFC/g. Os resultados atendem à contagem mínima requerida para ser considerado probiótico (BRASIL, 2008; MARUYAMA, 2006).

Dantas et al (2016) utilizaram *Lactococcus lactis* na produção de queijo Minas Frescal, obtendo contagem inicial de $8,8 \pm 0,32$ log UFC/g. Aos 20 dias de armazenamento a 5 °C, o microrganismo apresentou redução de 0,9 log UFC/g. Ziarno et al (2010) realizaram estudos com a adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) em queijo coalho armazenado a 6 °C, obtendo contagem inicial de $7,0 \pm 0,01$ log UFC/g e, $6,2 \pm 0,11$ log UFC/g aos 28 dias, representando uma redução de 0,8 log UFC/g após o período de armazenamento. Em contrapartida, Verruck et al (2015), na adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) em queijo Minas Frescal de Búfala obtiveram contagem inicial de 8,15 log UFC/g e aos 30 dias 8,36 log UFC/g, representando um aumento não significativo em sua contagem.

4 CONCLUSÃO

As características físico-químicas para umidade, pH e acidez dos mini-queijos sem probiótico foram similares aos mini-queijos adicionados de probiótico. Por sua vez, as características de sinérese apresentaram diferença significativa entre as amostras ao longo dos 28 dias de armazenamento, com redução da mesma nos queijos com probiótico, a despeito de pequenas diferenças em valores absolutos. Estes resultados sugerem a adequação do método desenvolvido, atendendo requisitos da legislação para produção de mini-queijo com *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, promovendo também melhor padronização das amostras de queijo tipo Minas Frescal, reduzindo desperdício de matéria prima, otimizando o tempo de produção e reduzindo as possibilidades de contaminação externa. A concentração de *B. animalis* decresceu 1,15 log UFC/g em 28 dias de armazenamento. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos de aplicação do probiótico em queijos tipo Minas Frescal, comprovando a adequação do método de produção de mini-queijos para estudos de simulação, bem como para potencial inovação em processo e/ou em produto.

CAPÍTULO III

VIABILIDADE DE PROBIÓTICOS EM QUEIJO TIPO MINAS FRESAL TRATADO POR ALTA PRESSÃO HIDROSTÁTICA

RESUMO

O queijo Minas Frescal é versátil e possui excelente aceitação no Brasil. Porém, por se tratar de um alimento com elevado teor de umidade e nenhum tratamento para conservação do produto final, torna-se altamente perecível. Este estudo teve como objetivo produzir um queijo Minas Frescal probiótico tratado por Alta Pressão Hidrostática (APH), utilizando diferentes culturas probióticas e variáveis de processo de APH, e avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do produto refrigerado a 4 °C durante o armazenamento de 28 dias. Para isso, com base em experimentos preliminares, foram utilizados três tratamentos: Controle (sem tratamento por APH), 200MPa (tratado a 200MPa por 5 minutos) e 350MPa (tratado a 350MPa por 5 minutos), todos adicionados cultura probiótica em pó de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO, Itália). Não foram detectados *Salmonella* sp/25g, *Staphylococcus aureus* e Coliformes 45°C nas amostras. Após 28 dias de armazenamento, a amostra controle apresentava 4,43 log UFC/g de psicotróficos, enquanto a 200MPa atingiu o crescimento de 3,81 log UFC/g e a 350MPa teve o crescimento de 1,49 log UFC/g. Com relação à sobrevivência do microrganismo probiótico, obteve-se inicialmente a contagem de 8,13 log UFC/g para amostra Controle, enquanto as amostras 200MPa e 300MPa apresentavam 7,38 e 6,26 log UFC/g, respectivamente. Até o 28º dia, houve redução de menos de 2 ciclos logarítmicos na contagem de microrganismos probióticos em todos os tratamentos, atingindo 6,98 log UFC/g para a amostra Controle, 5,93 log UFC/g para 200MPa e 4,52 log UFC/g para 350MPa. Não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) para umidade, pH e acidez total entre os tratamentos. Os estudos demonstraram que a utilização de APH inibiu significativamente o crescimento de microrganismos psicotróficos, conforme mais evidenciado no tratamento a 350MPa, porém preservou a população de BB em níveis requeridos para produto probiótico, a despeito da redução da população em níveis inferiores ao requerido, ao longo do armazenamento. Mais estudos são necessários, a fim de evidenciar a aceitação sensorial do produto.

Palavras-chave: Queijo Minas Frescal, Sanidade, Probiótico, Alta Pressão Hidrostática.

ABSTRACT

Minas Frescal is a versatile cheese for consumption in different ways and meals, with a great acceptance in Brazil. However, because it is a food with high moisture content and no preservative treatment of the final product, it becomes highly perishable. The objectives of this study were to produce a probiotic Minas Frescal cheese treated with high hydrostatic pressure and to evaluate the behavior of different probiotic cultures and high pressure processing conditions (treatment pressure and time) on physicochemical and microbiological characteristics of the product, after processing and along the storage at 4 ° C for 28 days. After preliminary experiments, three treatments were selected: Control (without APH treatment), 200MPa (treated at 200MPa for 5 minutes) and 350MPa (treated at 350MPa for 5 minutes), all with cheese added with *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* (BB, SACCO). No *Salmonella* sp / 25g, *Staphylococcus aureus* and Coliforms 45 ° C were detected in the samples. After 28 days of storage, the control counted 4.43 log CFU/g of psychotropic, while 250MPa reached 3.81 log CFU/g and 350MPa 1.49 log CFU/g. With respect to the probiotic microorganism, a count of 8.13 log CFU / g was obtained for the Control, while the samples 200MPa and 300MPa presented 7.38 and 6.26 log CFU/g, respectively. Up to the 28th day, there was a reduction of less than 2 logarithmic cycles in all treatments, thus reaching 6.98 log CFU/g for the Control, 5.93 log CFU/g for 200MPa and 4.52 log CFU/g for 350MPa. No significant differences ($p > 0.05$) were observed for moisture, pH and total acidity among the treatments. The studies demonstrated that the use of APH significantly inhibited the growth of psychotropic microorganisms, being more effective in the treatment at 350 MPa. Regarding the probiotics, the product treated with High Pressure with BB presented greater population than the one required by daily recommendation just after processing, though showing a decrease along the storage. More studies are needed in order to evaluate the sensory acceptance of the product.

Keywords: Minas Frescal Cheese, Health, Probiotic, High Hydrostatic Pressure.

1 INTRODUÇÃO

O queijo é um alimento versátil, que é consumido de diversas formas e por todas as faixas etárias. O Minas Frescal, presente um dos três tipos de queijo mais consumidos no Brasil, é um produto de massa crua, obtido pela coagulação do leite de vaca, que é comumente embalado e comercializado logo após a produção, com período de vida útil curta, mesmo mantido sob refrigeração (SEBRAE, 2008), sendo uma variedade não maturada e destinada, portanto, para consumo imediato (Furtado, 1999). É consumido por todas as camadas da população durante todo o ano, em lanches, cafés da manhã e como sobremesa, sendo um alimento tradicional produzido e consumido no Brasil, caracterizado pela sua suave textura e alto teor de umidade (FREITAS et al., 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) caracteriza como probióticos os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. As principais espécies probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Nagpal et al., 2012). Atualmente, é crescente a demanda por alimentos mais saudáveis e com funcionalidades específicas. Em meio ao cenário de um mercado competitivo, as indústrias buscam tecnologias e inovações em produtos, caso de alimentos probióticos, enquanto os consumidores buscam preço e qualidade mais adequados no momento da compra. Além disso, a incorporação de bactérias ácido láticas em alimentos, como os microrganismos probióticos, também podem contribuir para a extensão de sua vida útil, pela produção de uma grande variedade de compostos orgânicos por parte desses microrganismos, tais como ácidos, etanol, peróxido de hidrogênio, antibióticos, bacteriocinas, entre outros, que apresentam forte atividade antagonística aos muitos outros microrganismos deteriorantes e patogênicos dos alimentos (REIS et al., 2012; SAAD et al., 2013).

A qualidade do produto final é um entrave delicado, principalmente em se tratando de um alimento fresco e úmido, pois além dos possíveis danos à saúde e dos surtos toxicológicos, bactérias patogênicas e deteriorantes podem se desenvolver no alimento, atuando na degradação de diversos compostos, como proteínas e gordura, influenciando nas características sensoriais (FAVA et al., 2012; SILVA T.E., 2015).

Para a confecção do queijo Minas Frescal, foi utilizada a metodologia adaptada para queijos em miniatura (HYNES et al., 2000). Após a confecção das amostras, foram realizadas as análises microbiológicas de acordo com a Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal (BRASIL, 2011). O experimento comparou a viabilidade microbiológica dos queijos probióticos e dos queijos convencionais, submetidos ou não à alta pressão hidrostática. As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a Normativa nº 68, em triplicata e com três repetições (BRASIL, 2006), para umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, pH e acidez total. Nesta etapa, foram avaliados o perfil físico-químico das amostras, bem como a sinérese e o perfil microbiológico, ao longo do armazenamento refrigerado a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 28 dias.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção Dos Queijos Com Probióticos

Os queijos tipo Minas Frescal adicionados de probióticos foram produzidos em miniatura, de acordo com método adaptado para produção de queijos frescos (HYDES et al., 2000). A produção foi realizada em laboratório, em condições controladas, de modo a reduzir a variabilidade das amostras e minimizar a contaminação microbiológica.

As culturas probióticas em pó de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC 1 (SACCO, Itália), *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen, Dinamarca) e *Lactobacillus rhamnosus* BRM038563 (banco de culturas da Embrapa Caprinos, Brasil) foram inoculadas isoladamente no leite, em quantidade suficiente para que o queijo apresentasse concentração mínima de 6 log UFC/g.

2.2 Tratamentos De Alta Pressão Hidrostática

Os mini-queijos com *B. animalis*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foram inicialmente submetidos a quatro tratamentos de pressurização (binômios pressão-tempo): 100 MPa por 5 e 10 min e 300 MPa 5 e 10 min. Os experimentos foram conduzidos em duplicata. A pressurização foi realizada no equipamento “Fluid Power” (“SFL-850-09-W, Stansted”, Reino Unido), com câmara de pressão de 180 mL de e pressão de operação máxima nominal de 900 MPa. Após os tratamentos, os mini-queijos e as amostras controle foram armazenados a 4 ± 2 °C. A enumeração de probióticos foi conduzida no dia seguinte.

Na segunda etapa dos experimentos o mini-queijo com *B. animalis* foi selecionado e empregado em estudo de caracterização da resistência do probiótico a 10 tratamentos de pressurização: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 MPa por 5 min. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Na última etapa experimental o mini-queijo com *B. animalis* foi submetido aos tratamentos de pressurização a 200 MPa por 5 min e 350 MPa por 5 min em triplicata. Os mini-queijos pressurizados e não pressurizados foram estocados a 4 ± 2 °C e submetidos à caracterização microbiologia e físico-química com 1, 7, 14, 21 e 28 dias.

2.3 Análises Microbiológicas

Alíquotas de 25 g de cada amostra de queijo (correspondente a um mini-queijo) foram assepticamente pesadas em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas com 225 mL de água peptonada 0,1%. Diluições decimais a partir da diluição 10^{-1} foram preparadas em tubos contendo 9,0 mL de água peptonada 0,1%. As análises realizadas compreenderam, além da enumeração de probióticos, a contagem de coliformes termotolerantes a 45°C, de acordo com AOAC (2002), utilizando-se placas Petrifilm™ CC (3M Company, St. Paul, MN, EUA), bolores e leveduras, psicotróficos, contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo e

determinação de *Salmonella* spp., realizado em laboratório de microbiologia, com metodologia adaptada de Tournas (2001) e Hitchins (2001) de acordo com a instrução normativa nº62 (BRASIL, 2003).

2.3.1 Enumeração de *Bifidobacterium animalis*

A análise de *B. animalis* nos mini-queijos foi realizada pela completa maceração manual de 25 g de amostra com 225 mL de água peptonada. Pelo menos três diluições seriadas 1:10 do mini-queijo em água peptonada foram inoculadas em profundidade em duas placas de agar De Man Rogosa Sharpe (MRS). A enumeração foi conduzida após incubação em anaerobiose a 37°C por 72h (ASHRAF, SHAH, 2011).

2.3.2 Enumeração de *Lactobacillus* spp.

As análises de *L. acidophilus* e de *L. rhamnosus* nos mini-queijos foram realizadas pela completa maceração manual de 25 g de amostra com 225 mL de água peptonada. Pelo menos três diluições seriadas 1:10 do mini-queijo em água peptonada foram inoculadas em profundidade em duas placas de agar De Man Rogosa Sharpe (MRS). A enumeração foi conduzida após incubação em aerobiose a 37°C por 72h (ASHRAF, SHAH, 2011).

O processamento e análises microbiológicas, incluindo todo processo de vida útil, foram realizados em triplicata e, para cada diluição, o plaqueamento foi realizado em duplicata, com três repetições de processo, a fim de elevar a confiabilidade dos resultados.

2.3.3 Vida Útil do queijo tipo Minas Frescal e viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento

Para avaliação da vida útil das amostras dos queijos resultantes do delineamento estabelecido, foram determinadas as contagens de fungos filamentosos e leveduras, coliformes termotolerantes a 45°C e concentração de psicrotóxicos, correspondente às amostras, conforme análises preconizadas na RDC, realizadas a cada 7 dias (dias 1; 7; 14; 21 e 28).

A sobrevivência de *Bifidobacterium ssp lactis* (SACCO Brasil) foi avaliada ao longo de 28 dias e, para tal, a cepa probiótica foi inoculada separadamente nos queijos correspondentes dos vários tratamentos, e verificada após processamento ou não (controle) por APH, até 28 dias de armazenamento a 4 °C, analogamente, com a mesma periodicidade das análises de vida útil.

2.4 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas dos mini-queijos tipo Minas Frescal foram realizadas de acordo com a Normativa nº 68, em triplicata e com duas repetições (BRASIL, 2006), abrangendo umidade, cinzas, nitrogênio total, extrato etéreo, acidez total titulável.

2.4.1 pH

Realizada conforme metodologia nº 981.12 estabelecida pela AOAC (2010), foram homogeneizados 10 g de amostra em 100 mL de água destilada aquecida a 45°C, sendo as leituras realizadas diretamente em potenciômetro digital previamente calibrado.

2.4.2 Acidez total

Para análise de acidez total, foram transferidos 10 g de amostra do mini-queijo tipo Minas Frescal para um béquer, com cerca de 50 mL de água aquecida isenta de gás carbônico, sendo a mistura agitada até a melhor dissolução possível. Esta solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com água destilada. Após esta etapa, uma alíquota de 50 mL foi transferida para um erlenmeyer, resfriada, acrescentadas de 0,15 mL de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% (m/v), sendo titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/mL até obtenção da coloração rósea por 30 seg. Para o cálculo da acidez, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Ácido láctico} = (f \cdot V \cdot 0,09 \cdot n \cdot 100) / m, \text{ onde:}$$

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N (utilizado para titulação, em mL);

m = massa da amostra (em gramas);

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

0,09 = fator de conversão do ácido láctico; e

N = normalidade de solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Após os cálculos, os resultados foram expressos em gramas de ácido láctico por 100g.

2.4.3 Umidade

Para a realização da análise de umidade, foram pesadas cerca de 2 g da amostra de mini-queijo tipo Minas Frescal em pesa-filtro, com adição de areia e bastão, secos a 70°C e devidamente tarados. A amostra foi aquecida durante 5 horas em estufa (vácuo a 70°C), sob pressão de 70 mm de mercúrio (Hg). As amostras, resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente, foram posteriormente pesadas. Esta operação de aquecimento e resfriamento foi repetida até obtenção de peso constante (AOAC, 1996). Foi adotada a seguinte fórmula para cálculo da umidade neste método:

$$(\% \text{ de umidade}) = (100 \times N) / P \text{ onde:}$$

N = massa de água evaporada (g) P = massa da amostra (g)

2.4.4 Cinzas

A determinação das cinzas foi feita em mufla, à temperatura de 550°C. As amostras, previamente secas em cadinhos, foram levadas à mufla e incineradas, sendo os cadinhos posteriormente resfriados em dessecador e pesados. Os resultados foram expressos em porcentagem de cinzas, de acordo com a seguinte fórmula (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ de cinzas} = [(m_2 - m_0) / (m_1 - m_0)] \cdot 100 \text{ onde:}$$

m_0 = massa do cadinho vazio;

m_1 = massa da amostra incinerada somada ao peso do cadinho;

m_2 = massa da amostra úmida somada ao peso do cadinho.

2.4.5 Nitrogênio total

Para a realização da análise de nitrogênio total foi utilizado o método do Micro Kjeldahl nº 920.87 da AOAC (2000). Para isso, as amostras foram digeridas em bloco digestor e destiladas. As amostras foram pesadas em balança analítica, com uma alíquota de 0,25 g de amostra transferidos para o tubo de Kjeldahl. Em seguida 2,5 g de mistura catalítica [Sulfato de potássio p.a. e Sulfato de cobre penta-hidratado p.a., na proporção de 10+1] e 7 mL de ácido sulfúrico p.a foram adicionados à amostra. Em bloco digestor, a mistura foi aquecida elevando-se, gradativamente, a temperatura até chegar a 400°C, até que o líquido estivesse límpido e transparente, com tonalidade azul-esverdeada, deixada em seguida esfriar e adicionado 10 mL de água destilada. Já na etapa de destilação, um erlenmeyer contendo 20 mL de solução de ácido bórico a 4% (m/v), com 8% de solução indicadora mista [0,132 g de vermelho de metila e 0,06 g de verde de bromocresol em 200 mL de solução de álcool etílico a 70 % (v/v)], foi adicionado ao frasco de coleta do destilado. Foi adicionada ao tubo de Kjeldahl cerca de 20 mL de uma solução de hidróxido de sódio a 50% (m/v), até que ela se tornasse negra e promovesse a reação e desprendimento do destilado. Para a titulação do destilado foi utilizado uma solução de ácido clorídrico 0,1 N até ocorrer a viragem do indicador. O resultado em percentual de nitrogênio total foi obtido pela seguinte fórmula (BRASIL, 2006):

$$\% \text{ Nitrogênio total} = (V \cdot N \cdot F \cdot 0,0014 \cdot 100) / m \text{ onde:}$$

V = solução de ácido clorídrico 0,1N (utilizado na titulação);

N = normalidade teórica da solução de ácido clorídrico 0,1N;

f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N;

m = massa da amostra em gramas.

Para obtenção do percentual de proteína bruta presente nos queijos, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Proteína bruta} = \% \text{ Nitrogênio total} \cdot F, \text{ onde:}$$

F (Fator de conversão para leite e derivados) = 6,38

2.4.6 Extrato etéreo

Para verificação de extrato etéreo presente nas amostras, foi utilizado o método de hidrólise ácida, de acordo com a Instrução Normativa N° 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). Foram pesados 3g de mini-queijo tipo Minas Frescal, alocada diretamente no copo do butirômetro. Foi adicionado 5 mL de água destilada a 65 °C com 10 mL de solução de ácido sulfúrico (d= 1,820) e 1 mL de álcool isoamílico. O butirômetro foi mantido em banho-maria (manutenção da temperatura a 65 °C) e agitado para que toda a amostra fosse dissolvida. Após esta etapa, a amostra foi centrifugada a 1200 rpm em centrifuga por 5 min. As etapas foram realizadas para todas as amostras. Em seguida foi realizada diretamente a leitura do teor de gordura.

2.5 Sinérese

O cálculo de sinérese foi realizado quantificando (em gramas) o soro de leite liberado por cada amostra de queijo em sua própria embalagem (AICHINGER et al., 2003). Os resultados obtidos em porcentagem foram calculados, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Sinérese} = (PS/PA).100, \text{ onde:}$$

PS = Peso do soro;

PA = Peso inicial da amostra.

2.6 Análises Estatísticas

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA), cálculos de média, teste de Tukey com significância ao nível de 5% ($p \leq 0,05$) e desvio padrão. Já a comparação das médias entre tratamentos foi efetuada pelo teste *t-Sudent* ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Tratamento Dos Queijos Probióticos Por Alta Pressão Hidrostática

Os experimentos preliminares demonstraram que os microrganismos *Lactobacillus rhamnosus* e *L. acidophilus* apresentaram baixa viabilidade, com contagem de 3,7 log UFC/g¹ e 3,5 log UFC/g¹ respectivamente, a 300MPa (5min), mostrando-se susceptíveis ao tratamento por APH, conforme Tabela 1. Os queijos adicionados de *Bifidobacterium subsp lactis*, por sua vez, obtiveram melhores resultados, 6,3 log UFC/g em média, quando submetidos a 300MPa por 5 minutos.

Tabela 1. Viabilidade média dos microrganismos probióticos, submetidos a 100MPa e 300MPa por 5 e 10 minutos e amostra controle.

Amostra	VIABILIDADE (log UFC/g)		
	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. lactis</i>
Controle	6,9	7,2	8,5
100MPa/5min	5,8	6,8	7,8
100MPa/10min	5,7	6,3	7,6
300MPa/5min	3,7	3,5	6,3
300MPa/10min	1,8	2,1	5,4

Em todos os níveis de pressão e diferentes microrganismos, os valores expressos representam a média dos resultados das amostras, realizadas em triplicata.

De acordo com a Figura 1 representada adiante, pode-se observar a redução na sobrevivência do microrganismo probiótico (BB) em diferentes pressões, com o tempo de 5 minutos de tratamento. Os níveis escolhidos foram os que obtiveram mesma população (em ciclos logarítmicos, UFC/g) de sobrevivência na máxima pressão aplicada. Portanto, além do controle (0 MPa), foram selecionadas as pressões de 200 MPa/5 min. (7 Log UFC/g) e 350 MPa/5 min (6 log UFC/g).

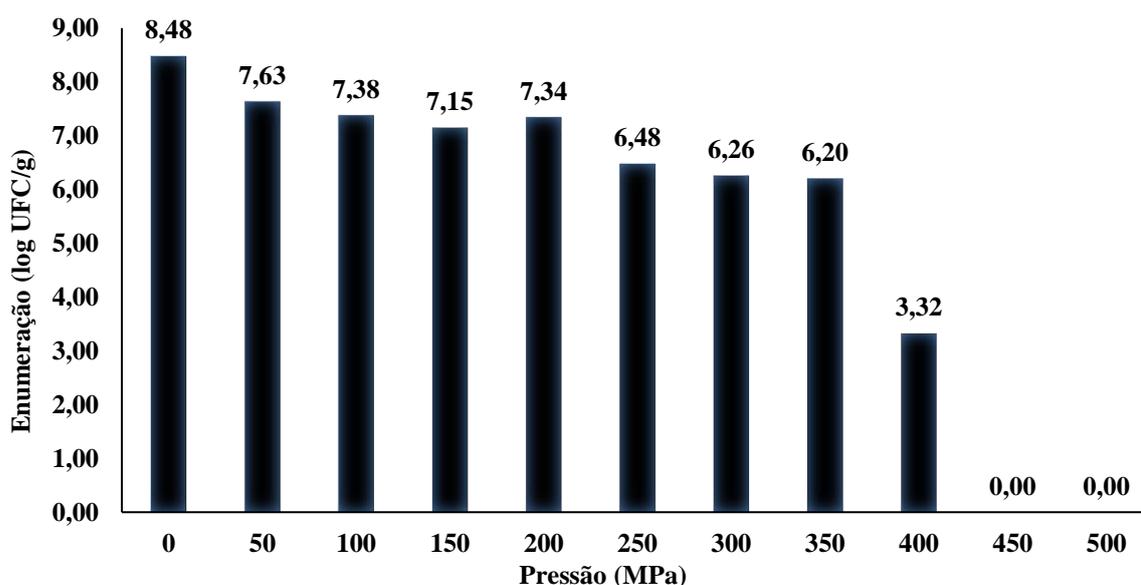


Figura 1. Sobrevivência ao tratamento por alta pressão de *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* inoculado nos mini-queijos tipo Minas Frescal (tempo de tratamento = 5 min.)

Para codificação dos queijos, utilizou-se BB Controle para queijos sem aplicação de alta pressão hidrostática; BB 200 MPa para os queijos submetidos a pressão de 200 MPa por 5 minutos; e BB 350 MPa, o qual foi submetido a pressão de 350 MPa por 5 minutos. Em todas as amostras foram inoculadas o probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* em novo experimento.

3.2 Aspectos microbiológicos

De acordo com o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, o limite aceitável para Coliformes 45 °C é de $5,0 \times 10^3$ e para *Staphylococcus aureus* é de $1,0 \times 10^3$. Para *Salmonella* spp, a exigência é que o produto não apresente contagem deste microrganismo, devendo ser considerados ausentes (BRASIL, 2001). Conforme disposto na Tabela 2, *Staphylococcus aureus* e Coliformes 45 °C mantiveram-se dentro do padrão exigido, apresentando contagens inferiores a $1,0 \times 10^1$ para todas as amostras não pressurizadas (controle) e pressurizadas (200MPa e 350 MPa). O mesmo pode-se observar nas análises para *Salmonella* sp., em que todos os resultados resultaram ausentes para todas as amostras analisadas.

Tabela 2. Contagens após armazenamento de 24 horas de Fungos filamentosos e leveduras, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e Coliformes 45 °C para as amostras de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculado com *Bifidobacterium* subsp. *lactis*.

Microrganismo	Contagem
Fungos filamentosos e leveduras	<1,0 x10 ¹ UFC/g
Salmonella spp	Ausente (em 25g)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<1,0 x10 ¹ UFC/g
Coliformes 45°C	<1,0 x10 ¹ UFC/g

(*) Resultados para as amostras (Controle, 200 MPa/5 min e 350 MPa/5 min).

Além das análises exigidas pela Legislação Brasileira, foram realizadas contagens de Fungos filamentosos e leveduras (Tabela 2), para as amostras Controle, 200 MPa e 350 MPa, que apresentaram contagens inferiores a 1,0 x10¹, independente da pressão aplicada e mesmo com a presença do microrganismo probiótico. Dessa forma, pode-se considerar o queijo produzido apto para consumo e sugerir que a APH e a adição de BB não interferiram na qualidade microbiológica inicial do queijo, não resultando em diferenças significativas entre as amostras para as análises realizadas.

3.2.1 Vida útil do queijo tipo Minas Frescal probiótico - Viabilidade de microrganismos psicrotróficos

A Figura 2 ilustra os resultados referentes ao crescimento de microrganismos psicrotróficos nas amostras Controle, 200 MPa e 350 MPa foram armazenadas durante 28 dias a 4 ± 2 °C e observou-se ao longo deste período o desenvolvimento de microrganismos psicrotróficos. A amostra 350 MPa apresentou inibição dos mesmos, a amostra 200 MPa apresentou aos 28 dias 3,81 ± (0,79) log UFC/g e a amostra Controle, ao final do armazenamento apresentou 4,43 ± 0,05 log UFC/g de psicrotróficos, sendo relevante, portanto, a influência da APH na inibição e contribuindo para extensão da vida útil dos queijos. Apenas na última semana houve certo desenvolvimento desses deteriorantes na amostra submetida a maior pressão, enquanto que a amostra submetida a 200 MPa apresentou crescimento contínuo até os 14 dias, mantendo-se em níveis de contagem estáveis e superiores a 2,74 log UFC/g pelo restante do período de armazenamento.

Evert-Arriagada et al. (2012), ao analisarem o efeito da APH em queijos frescos ao longo de sua vida útil, obtiveram a contagem de psicrotróficos de 6,12 log UFC/g na amostra pressurizada a 400MPa no 21º dia de armazenamento a 4 °C, enquanto as amostras Controle e tratadas a 300MPa, apresentaram populações de 6,65 log UFC/g e 4,35 log UFC/g no sétimo dia de estocagem igualmente refrigerados, respectivamente.

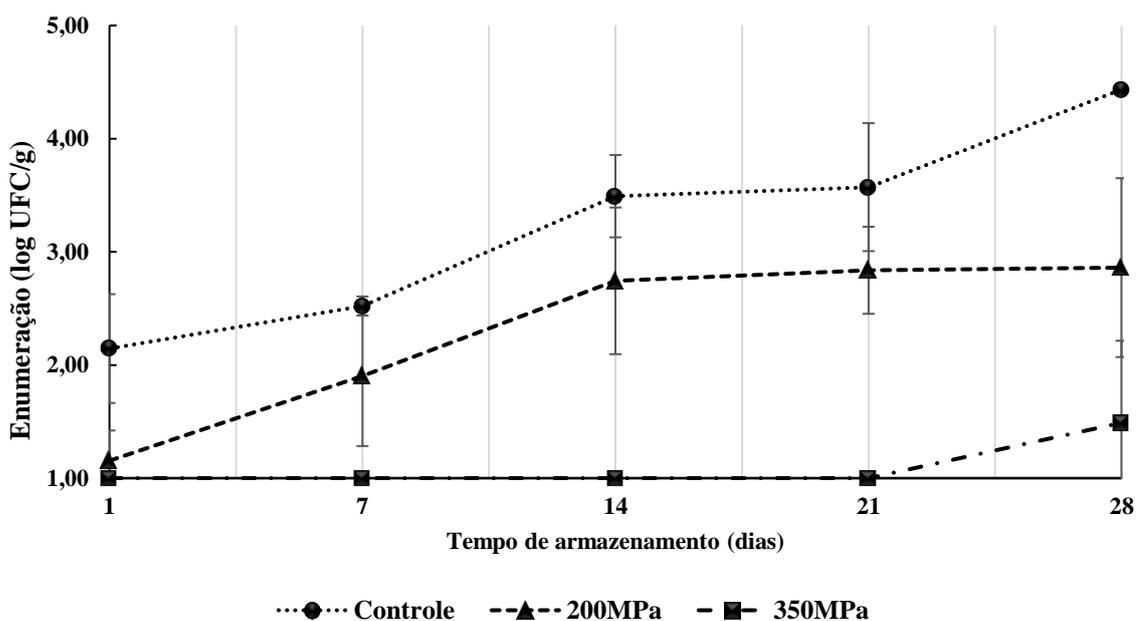


Figura 2. Contagem de microrganismos psicrotróficos em mini-queijos tipo Minas Frescal inoculado com *Bifidobacterium subsp. lactis* e submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

A legislação brasileira não especifica valores para tais enumerações. Foi possível observar que a APH contribuiu para a extensão da vida útil dos queijos Minas Frescal pelo reduzido crescimento dos microrganismos nos mini-queijos em que foi aplicada, com a observação de que com o aumento da pressão aplicada (350MPa/5 min.), houve efeito inibitório mais efetivo.

3.2.2 Enumeração de probióticos

Conforme a Tabela 3, a amostra controle apresentou diferença significativa no 21° e 28° dias de armazenamento, com decréscimo de 1,15 log UFC/g entre seu valor inicial e final da população de *Bifidobacterium subsp. lactis* presente no mini-queijo tipo Minas Frescal. A mesma tendência foi observada para as demais amostras, 200 MPa/5 min. e 350MPa/5 min., com decréscimo de 1,45 e 1,74 log UFC/g respectivamente. Ao longo do armazenamento, não houve influência da APH na contagem dos probióticos. Por sua vez, todas as amostras diferiram significativamente entre si, no 1° dia de análise, $8,13 \pm 0,54$ log UFC/g, $7,38 \pm 0,10$ log UFC/g e $6,26 \pm 0,06$ log UFC/g para Controle, 200MPa e 350MPa respectivamente. Esta diferença sugere que a APH teve influência na viabilidade inicial do probiótico nos mini-queijos.

Tabela 3. Enumeração de microrganismos probióticos (*Bifidobacterium* subsp. *lactis*) nas amostras de mini-queijo tipo Minas Frescal. Controle: amostra não pressurizada; 200MPa/5 min: amostra pressurizada a 200MPa/5 min e 350MPa/ 5 min: amostra pressurizada a 350MPa/5 min.

Tempo (dias)	Tratamento		
	Controle	200MPa	350Mpa
1	8,13 ± (0,54) ^{Aa}	7,38 ± (0,10) ^{Ab}	6,26 ± (0,06) ^{Ac}
7	7,80 ± (0,66) ^{Aba}	7,37 ± (0,17) ^{ABb}	5,94 ± (0,61) ^{Abc}
14	7,40 ± (0,12) ^{Aba}	7,26 ± (0,15) ^{ABb}	5,30 ± (0,13) ^{Abc}
21	7,32 ± (0,10) ^{Ba}	6,77 ± (0,67) ^{Bb}	5,43 ± (0,10) ^{Bc}
28	6,98 ± (0,49) ^{Ca}	5,93 ± (0,65) ^{Cb}	4,52 ± (0,05) ^{Cc}

(*) Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). (**) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

A amostra Controle apresentou contagem inicial de 8,13 log UFC/g e no 28º dia apresentou 6,98 log UFC/g de microrganismos viáveis, sob armazenamento refrigerado a 4 ± 2 °C. A amostra pressurizada a 200MPa apresentou contagem inicial de 7,38 log UFC/g e ao final do armazenamento apresentou 5,93 log UFC/g, enquanto que a amostra pressurizada a 350MPa iniciou o armazenamento com 6,26 log UFC/g e no 28º dia mostrou-se com 4,52 log UFC/g de microrganismos viáveis. Sugere-se que há influência do tratamento por APH em queijos Minas Frescal, na viabilidade inicial dos microrganismos probióticos, porém ao longo do armazenamento, não houve maior influência evidente posterior da APH, conforme retratado pela Figura 3.

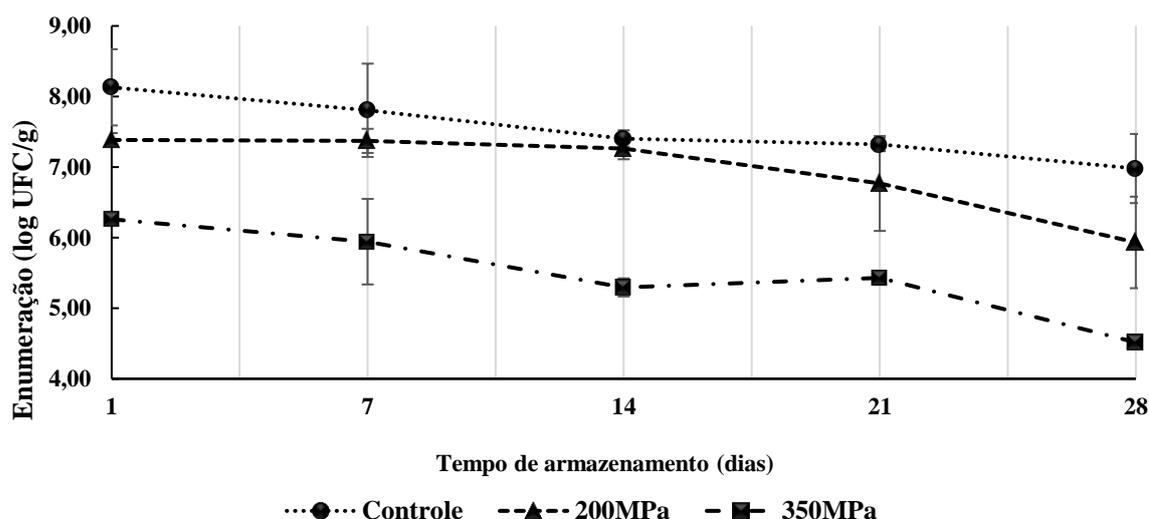


Figura 3. População de *Bifidobacterium* subsp. *lactis* em mini-queijos tipo Minas Frescal submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento a 4 ± 2 °C.

Em experimento realizado por Souza e Saad (2009), verificou-se a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) com e sem *Streptococcus thermophilus* (T2 e T3, respectivamente) em queijo Minas Frescal ao longo de 21 dias, onde os tratamentos apresentaram contagem inicial de $6,16 \pm 0,07 \log \text{UFC/g}^1$ em T2 e $6,01 \pm 0,27 \log \text{UFC/g}^1$ em T3, sendo considerados probióticos com recomendação mínima diária de 100g do alimento. O consumo mínimo garantiria os efeitos benéficos de um alimento probiótico (HOIER et al., 1999; SOUZA e SAAD, 2009). Em T3, o microrganismo *S. thermophilus* apresentou contagem inicial de $7,23 \pm 0,69 \log \text{UFC/g}$. Ambos os tratamentos mantiveram os níveis populacionais de probióticos, até o 21º dia.

3.3 Características Físico-químicas

A caracterização físico-química dos queijos “Controle”, “200MPa” e “350MPa” ao longo do período de armazenamento é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização físico-química de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado.

Análise	Tratamento		
	Controle	200MPa/5 min	350MPa/5 min
Nitrogênio (*) ¹	1,89 ± (0,06)	1,98 ± (0,08)	1,89 ± (0,07)
Extrato Etéreo (*) ¹	13,25 ± (1,42)	13,68 ± (0,23)	13,05 ± (0,45)
Cinzas (*) ²	2,47 ± (0,49)	2,28 ± (0,10)	2,40 ± (0,47)

(*)¹ Média das amostras ao longo do armazenamento ($4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 28 dias)

(*)²correspondente ao tempo inicial

3.3.1 pH

Os valores de pH variaram pouco ao longo do período estocagem e entre os tratamentos, não havendo diferença significativa entre os mesmos (Tabela 5). Os resultados demonstraram que a aplicação de APH não afetou o pH dos queijos, bem como não influenciou essa variável ao longo da vida útil. As amostras Controle variaram entre $7,0 \pm 0,01$ e $6,6 \pm 0,48$, enquanto as amostras 200MPa/5 min variaram entre $6,9 \pm 0,14$ e $6,6 \pm 0,41$ e a 350MPa/5 min se manteve em $6,9 \pm 0,13$.

Fritzen-Freire et al (2010) encontraram valores de pH entre $5,9 \pm 0,06$ e $6,9 \pm 0,02$ em queijos Minas Frescal adicionados de *Bifidobacterium* BB-12 armazenados por 28 dias a $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tabela 5. pH de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado ao longo de 28 dias a 4 ± 2 °C.

Tempo (dias)	Tratamento		
	Controle	200MPa	350MPa
1	$7,0 \pm (0,01)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,14)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,13)^{Aa}$
7	$6,9 \pm (0,11)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,04)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$
14	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$
21	$6,8 \pm (0,19)^{Aa}$	$6,7 \pm (0,27)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$
28	$6,6 \pm (0,48)^{Aa}$	$6,6 \pm (0,41)^{Aa}$	$6,9 \pm (0,01)^{Aa}$

(*) Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$) (**) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Verruck et al (2015) também obtiveram que a adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) não afetou o pH inicial e o obtido ao longo do armazenamento de queijo Minas Frescal estocado a 5 ± 1 °C durante 30 dias. Dantas et al (2016) encontraram valores similares de pH em suas amostras de queijo controle, variando entre $6,69 \pm 0,35$ e $6,67 \pm 0,023$ ao longo de 20 dias, armazenadas a 5 °C.

A estabilidade físico-química dos mini-queijos é uma condição fundamental para a manutenção da viabilidade dos probióticos. Boylston et al. (2004) recomendam uma faixa de pH entre 6,5 e 7,0 como ideais para manter a viabilidade de probióticos em queijos, sendo que pH abaixo de 5,0 podem destruir as culturas probióticas.

3.3.2 Acidez total

Os valores de acidez variaram pouco ao longo do período estocagem e entre os tratamentos, exceto no dia 28, em que as amostras controle e 200MPa apresentaram teores de acidez mais elevados, porém não havendo diferença significativa entre os tratamentos, mesmo nesse período (Tabela 6). Os resultados demonstraram que a aplicação de APH não afetou a acidez dos queijos, apesar de sugerir um comportamento estável em todas as repetições da amostra 350MPa ao longo da vida útil. As amostras Controle variaram entre $0,11 \pm 0,01$ g/100g e $0,22 \pm 0,17$ g/100g, enquanto as amostras 200 MPa tiveram faixa de variação entre $0,11$ $0,01$ g/100g e $0,19$ $0,10$ g/100g e a 350 MPa variou entre $0,12 \pm 0,01$ g/100g e $0,11 \pm 0,00$ g/100g.

Tabela 6. Variação na acidez dos mini-queijos “Controle”, “200MPa/5 min” e “350MPa/5 min” ao longo de 28 dias de armazenamento a $4 \pm ^\circ\text{C}$.

Tempo (dias)	Tratamento		
	Controle	200MPa	350MPa
1	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,12 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$
7	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$
14	$0,11 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,12 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$	$0,12 \pm (0,01)^{\text{Aa}}$
21	$0,14 \pm (0,05)^{\text{Aa}}$	$0,15 \pm (0,05)^{\text{Aa}}$	$0,11 \pm (0,00)^{\text{Aa}}$
28	$0,22 \pm (0,17)^{\text{Aa}}$	$0,19 \pm (0,10)^{\text{Aa}}$	$0,11 \pm (0,00)^{\text{Aa}}$

(*) Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). (**) Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

O estudo sobre as características de acidez do queijo tipo Minas Frescal adicionado de *Bifidobacterium*, realizado por Fritzen-Freire et al (2010), mostrou que amostras Controle variaram entre $0,09 \pm 0,01$ g/100g e $0,28 \pm 0,01$ g/100g ao longo de 28 dias, enquanto as amostras adicionadas de probiótico variaram entre $0,09 \pm 0,01$ g/100g e $0,31 \pm 0,01$ g/100g no mesmo período de tempo, mantendo coerência com os valores apresentados neste estudo.

3.3.3 Umidade

Os teores de umidade variaram pouco ao longo do período de estocagem e entre os tratamentos, não havendo diferença significativa entre os mesmos (Tabela 7). Os resultados demonstram que a aplicação de APH não afetou a umidade dos queijos, bem como não influenciou seu comportamento ao longo da vida útil. As amostras Controle variaram entre $67,33 \pm 2,43\%$ e $67,80 \pm 1,48 \%$, enquanto as amostras 200MPa tiveram sua faixa de variação entre $66,13 \pm 0,54\%$ e $68,06 \pm 0,28\%$ e as amostras 350MPa entre $66,71 \pm 2,67\%$ e $69,33 \pm 0,39 \%$, podendo ser classificados como queijo de muita alta umidade, conforme a usual classificação do queijo Minas Frescal, de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijos (BRASIL, 1996).

Tabela 7. Teor de umidade de mini-queijo tipo Minas Frescal inoculados com BB e submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo de 28 dias de armazenamento a $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Tempo (dias)	Tratamento		
	Controle	200MPa	350Mpa
1	$67,33 \pm (2,43)^{Aa}$	$66,13 \pm (0,54)^{Aa}$	$66,71 \pm (2,67)^{Aa}$
7	$67,67 \pm (0,47)^{Aa}$	$67,52 \pm (0,41)^{Aa}$	$67,48 \pm (0,70)^{Aa}$
14	$68,38 \pm (1,18)^{Aa}$	$70,01 \pm (0,02)^{Aa}$	$66,57 \pm (0,01)^{Aa}$
21	$68,63 \pm (1,18)^{Aa}$	$69,24 \pm (0,63)^{Aa}$	$68,09 \pm (0,01)^{Aa}$
28	$67,80 \pm (1,48)^{Aa}$	$68,06 \pm (0,28)^{Aa}$	$69,33 \pm (0,39)^{Aa}$

(*)Médias com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$). (**)Médias com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ($p > 0,05$).

Carvalho et al (2007) encontraram uma faixa de umidade entre $57,3 \pm 3,8\%$ e $67,2 \pm 2,8\%$ para queijos Minas Frescal produzidos por diferentes processos: com adição de cultura láctica, acidificação direta utilizando ácido láctico e por ultrafiltração. No processo com adição de cultura láctica, a umidade foi $57,3 \pm 3,8\%$. Fritzen-Freire et al (2010) também obtiveram umidade na faixa de $60,40 \pm 1,1$ - $67,32 \pm 0,48\%$ em queijos produzidos com a adição de *Bifidobacterium* Bb-12 (Chr Hansen) e/ou ácido láctico.

Os trabalhos apresentados corroboram com o requisito característico de queijos com muita alta umidade, em conformidade aos resultados obtidos neste experimento, não sendo inferior a 55%, conforme legislação (BRASIL, 2000).

3.4 Sinérese

Os resultados das análises de sinérese nas amostras Controle, 200MPa e 350MPa, armazenadas ao longo de 28 dias a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ estão dispostos na Figura 4. Todos os mini-queijos apresentaram um aumento percentual da sinérese ao longo dos 28 dias a 4°C , com perda mais acentuada do queijo tratado a 200MPa, atingindo $34,83 \pm 0,28\%$ ao final do armazenamento. Já os queijos 350MPa e Controle atingiram $31,11 \pm 0,39\%$ e $29,13 \pm 1,48\%$ ao final do período, respectivamente, não havendo diferença significativa entre os tratamentos. Sant'Ana et al. (2013) obtiveram, em queijo Minas Frescal, 17,5% de sinérese ao fim do armazenamento de 21 dias a 4°C , valores inferiores aos obtidos no presente estudo.

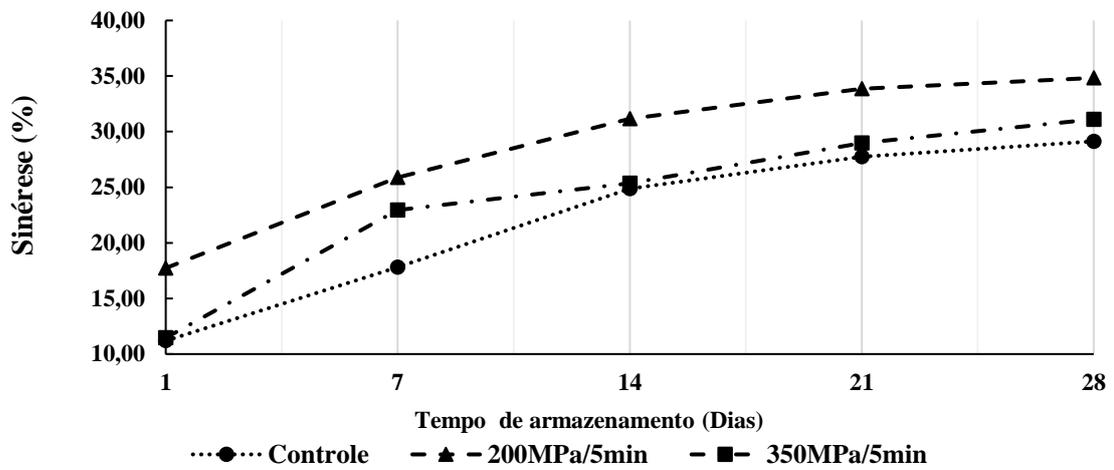


Figura 4. Sinérese dos queijos Minas Frescal inoculados com *Bifidobacterium subsp. lactis* submetidos ao tratamento por alta pressão, em relação ao controle não pressurizado, ao longo do armazenamento refrigerado (4 ± 2 °C).

A perda excessiva de soro das amostras Controle, 200MPa e 350MPa pode estar relacionada ao método de dessora dos queijos, utilizando centrífugas no caso dos queijos em miniatura elaborados no presente estudo, o que difere do método tradicional no preparo de queijo Minas Frescal, com descanso de 24h em fôrmas plásticas.

4 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que o mini-queijo tipo Minas Frescal é uma boa matriz para incorporação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, com ou sem a aplicação de APH, considerando que para os mini-queijos pressurizados devemos ingerir porção diária em maior quantidade, para que o efeito de probiótico seja garantido. A redução da viabilidade, ainda que o produto seja considerado probiótico, decorreu ao que tudo indica, do processo de pressurização. No entanto, a APH reduziu o crescimento de microrganismos psicrotóxicos, sem afetar negativamente os parâmetros físico-químicos do queijo, que não apresentaram alteração significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH, acidez e umidade.

A APH afetou significativamente ($p \leq 0,05$) a sobrevivência de probióticos, causando redução de até 1,87 log UFC/g entre os tratamentos Controle e o tratamento de maior pressão, 350MPa/5 min. Porém não houve maior impacto significativo posterior dos tratamentos efetuados na contagem de probióticos, ao longo do armazenamento dos mini-queijos. Os resultados microbiológicos estão dentro do padrão estabelecido pelas normas brasileiras, refletindo a segurança na fabricação dos queijos durante todo o experimento. Estudos complementares são necessários para maior compreensão dos mecanismos de inativação microbiana envolvidos, bem como para verificar a influência do processo de APH e do microrganismo probiótico na aceitação sensorial do produto.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados sugerem que o mini-queijo tipo Minas Frescal é uma boa matriz para incorporação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, com ou sem a aplicação de APH. A redução da viabilidade, ainda que o produto seja considerado probiótico, se deu supostamente pelo processo de pressurização. Além disso, a APH reduziu o crescimento de microrganismos psicrotróficos, porém não afetou os parâmetros físico-químicos do queijo, sem alteração significativa ($p > 0,05$) entre os valores de pH, acidez e umidade.

A APH afetou significativamente ($p < 0,05$) a sobrevivência de probióticos, causando redução de até 1,87 log UFC/g entre os tratamentos Controle e o de maior pressão, 350MPa/5 min. Porém não houve maior impacto significativo posterior dos tratamentos efetuados ao longo do armazenamento dos mini-queijos. Os resultados microbiológicos estão dentro do padrão estabelecido pelas normas brasileiras, refletindo a segurança na fabricação dos queijos durante todo o experimento. Portanto, a perspectiva de inoculação de probióticos aliada à aplicação de tecnologia de alta pressão no processo de fabricação de queijo tipo Minas Frescal é promissora, condicionada a aspectos econômicos (custos) e de aceitação sensorial.

. Estudos complementares são necessários para maior compreensão dos mecanismos de inativação microbiana envolvidos, avaliação da aceitação sensorial e receptividade dos consumidores ao produto final, bem como custos e viabilidade econômica do processo e do produto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIQ. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos**. 2011, Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17>. Acesso em: 01 dez. 2017.
- AICHINGER, P.-A., et al. Fermentation of a skim milk concentrate with *Streptococcus thermophilus* and chymosin: structure, viscoelasticity and syneresis of gels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.31, n.1, p.243-255. 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776503001449>>. Acesso em. doi: [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00144-9](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00144-9).
- ALBENZIO, Marzia et al. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p. 2781-2791, 2013.
- ALVES, C. C. et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.
- ALVES, L. L. et al. Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb- 12 and *Lactobacillus acidophilus* La- 5 and inulin. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 1, p. 63-69, 2013. ISSN 1471-0307.
- ANANTA, E.; HEINZ, V.; KNORR, D. Assessment of high pressure induced damage on *Lactobacillus rhamnosus* GG by flow cytometry. **Food Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 567-577, 2004/10/01/ 2004. ISSN 0740-0020. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003001151>>.
- ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt — A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 194-208, 2011/10/03/ 2011. ISSN 0168-1605. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511004004>>.
- AOAC. **Official Methods of analysis**. EUA: Association of Official Analytical Chemist, 17 ed. v. 2 Washington, 2000.
- BARBOSA, A. F. et al. Perfil sensorial de bebida láctea sabor maçã verde e pêssego utilizando análise descritiva quantitativa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 55-60, 2012. ISSN 2238-6416.
- BARBOSA, L.; MADI, L.; TOLEDO, M. A.; REGO, R. A. **Brasil Foods Trends 2020**. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo-FIESP. ITAL. São Paulo, v. 1, n. 1, p. 39-47, 2010.
- BOYLSTON, T. D., et al. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, n.5, p.375-387. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694603002012>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.08.008>.

BRAGANÇA, M. G. L.; SOUZA, C. M. Agroindústria. *Processamento do Queijo Minas Frescal, Meia-Cura, Mussarela*, MG, mar. 2001. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/site_emater/Serv_Prod/Livraria/Agroindustria>.

BRASIL. **Regulamento técnico de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Brasília: Diário Oficial da União, 1996.

_____. **Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal**. MAPA. Brasília: Diário Oficial da União 2004.

_____. **Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. MAPA. Brasília: Diário Oficial da União 2006.

_____. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. ANVISA. Brasília, 2008. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm >.

BULHÕES, C. C. C.; ROSSI JR, O. D. Occurrence of the genus *Aeromonas* in minas frescal cheese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p. 320-324, 2002. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-4444248256&partnerID=40&md5=1d65becf28d990bec03e17960cdfb033> >.

BURITI, F. C. et al. Effect of a probiotic mixed culture on texture profile and sensory performance of Minas fresh cheese in comparison with the traditional products. **Arch Latinoam Nutr**, v. 57, n. 2, p. 179-85, Jun 2007. ISSN 0004-0622 (Print) 0004-0622.

BURITI, F. C. A. et al. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 173-180, 2005. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-6944226572&doi=10.1016%2fj.lwt.2004.05.012&partnerID=40&md5=17d61717940b18d9cf9a461f5c71ebd7> >.

BURITI, F. C. A.; DA ROCHA, J. S.; SAAD, S. M. I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 12, p. 1279-1288, 2005. ISSN 0958-6946. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694605000208> >.

CARVALHO, J. D. G., et al. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v.18, n.3, p.262-267. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713505002331>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.10.005>.

CHIODA, T. P. et al. Inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal elaborado com cultura de *Lactobacillus acidophilus*. **Revista Portuguesa Ciências Veterinárias**, v. 101, n. 557-558, p. 121-124, 2006.

CRUZ, A. et al. Consumer perception of probiotic yogurt: Performance of check all that apply (CATA), projective mapping, sorting and intensity scale. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 601-610, 2013. ISSN 0963-9969.

DA CRUZ, A. G. et al. High pressure processing and pulsed electric fields: Potential use in probiotic dairy foods processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 483-493, 2010. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77957914107&doi=10.1016%2fj.tifs.2010.07.006&partnerID=40&md5=4d867a504646a92fe4a9195b45db2782> >.

DANTAS, A. B., et al. Manufacture of probiotic Minas Frescal cheese with *Lactobacillus casei* Zhang. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.1, p.18-30. 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215007742>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9880>.

DE SOUZA, C. H. et al. 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 & technology**, v. 43, n. 5, p. 871-877, 2008. ISSN 1365-2621.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. Cheese in Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/cheese-in-brazil/report>> Acesso em: 11.12.2015.

EVRENDILEK, G. A. et al. High-pressure processing of Turkish white cheese for microbial inactivation. **Journal of Food Protection**, v. 71, n. 1, p.102-108, 2008. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-38349078888&partnerID=40&md5=334a47d2177166f2483275bdbbe157ae> >.

FAO (*Food and Agriculture Organization*). Dairy production and products. **Milk production**. 2013a. Disponível em: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.UmRI_nDIHxQ> Acesso em 21 de dezembro. 2015.

FAVA, L. W. et al. Characteristics of colonial hand-made cheeses sold in an agricultural show. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 4, 2012. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84868154573&partnerID=40&md5=a32f093188b65ff8ab57df6ea5bfca6f> >.

FAVRETTO, D. C.; PONTIN, B.; MOREIRA, T. R. Effect of the consumption of a cheese enriched with probiotic organisms (*Bifidobacterium lactis* bi-07) in improving symptoms of constipation. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 50, n. 3, p. 196-201, 2013. ISSN 0004-2803.

FELICIO, T. L. et al. Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. **Food Chemistry**, v. 196, p. 628-637, 2016. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84943562839&doi=10.1016%2fj.foodchem.2015.09.102&partnerID=40&md5=363bf3c438b80512ca7ee12f7c204a11> >.

FERREIRA, C. Benefícios das culturas lácticas probióticas. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Atheneu Editora, cap, v. 6, p. 213-234, 2009.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. FIB. Cultura Probióticas em Produtos Lácteos. Disponível em: <http://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060697143001467219585.pdf>.

FRITZEN-FREIRE, C. B., et al. The effect of direct acidification on the microbiological, physicochemical and sensory properties of probiotic Minas Frescal cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v.63, n.4, p.561-568. 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00617.x>>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1471-0307.2010.00617.x.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. The influence of Bifidobacterium Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, n. 4, p. 621-627, 2010. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-70350567232&doi=10.1016%2fj.jfoodeng.2009.09.010&partnerID=40&md5=34c229311b4f669701b5a78b3c70d5ce> >.

FRANK, J.F. Microbial spoilage of foods: Milk and dairy products. In: **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Michael P. Doyle, Beuchat, L.R.; Montville, T.J. (Eds.). ASM Press Washington D.C., p. 101-116.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: 1999. 176.

GARDINER, G. et al. Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived Lactobacillus paracasei strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2192-2199, 1998. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0031746450&partnerID=40&md5=8ae50635ca760b5e19a1b2e3e2b468ff> >.

HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1998. 66p.

HITCHINS, A. et al. Escherichia coli and the coliform bacteria. **FDA Bacteriological Analytical Manual**, p. 4.01-4.29, 1998.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V. D.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo. **Hig. aliment**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002. ISSN 0101-9171.

HYNES, E.; OGIER, J.-C.; DELACROIX-BUCHET, A. Protocol for the manufacture of miniature washed-curd cheeses under controlled microbiological conditions. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 10, p. 733-737, 2000/01/01/ 2000. ISSN 0958-6946. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694600001023> >.

JAEGER, S. R. et al. Check-all-that-apply (CATA) questions for sensory product characterization by consumers: Investigations into the number of terms used in CATA questions. **Food Quality and Preference**, v. 42, p. 154-164, 2015. ISSN 0950-3293.

JUAN, B. et al. The effect of high-pressure treatment at 300MPa on ripening of ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2008. ISSN 0958-6946.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; AMIRI-RIGI, A. Selective enumeration of probiotic microorganisms in cheese. **Food Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 1-9, 2012. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-80054944979&doi=10.1016%2fj.fm.2011.08.008&partnerID=40&md5=56bca368303d12d0013f805db6afa889> >.

KNORR, D. High pressure processing for preservation, modification and transformation of foods. **High Pressure Research**, v. 22, n. 3-4, p. 595-599, 2002. Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

[0346741246&doi=10.1080%2f08957950212411&partnerID=40&md5=cc267adc31447d38404ae6972ccd1887](https://doi.org/10.1080%2f08957950212411&partnerID=40&md5=cc267adc31447d38404ae6972ccd1887) >.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia coli as Quality and Safety Indicators. In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p. 69-82.

LIMA FILHO, R. R. Aumenta o consume de queijo no Brasil. **Carta Leite**, v.6, p. 1-2 São Paulo, set. 2010.

LOLLO, P. C. B. et al. Probiotic cheese attenuates exercise-induced immune suppression in Wistar rats. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3549-3558, 2012. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84862509337&doi=10.3168%2fjds.2011-5124&partnerID=40&md5=1e12672a43b3f462acbad6574be7f74a>>.

LOLLO, P. C. B. et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v. 76, p. 611-617, 2015. Disponível em:<<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84952979465&doi=10.1016%2fj.foodres.2015.07.015&partnerID=40&md5=a81996cc17a61ec69d22f9b7393a35ff>>.

LOPEZ-PEDEMONTE, T.; ROIG-SAGUÉS, A.; DE LAMO, S.; HERNANDEZ-HERRERO, M.; GUAMIS, B. Reduction of counts of Listeria monocytogenes in cheese by means of high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 59–66, 2007.

MARUYAMA, L. Y., et al. Instrumental texture of probiotic petit-suisse cheese: Influence of different combinations of gums. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.386-393. 2006. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-33746821440&partnerID=40&md5=6cb313f4a476b49e888828c40fffd30e>>. Acesso em. doi.

MARTINEZ, S. Introduction of new food products with voluntary health and nutrition related claims 1989-2010. **Economic Information Bulletin**. n. 108, p. 1-48, 2013.

MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, Y.; ACOSTA-MUÑIZ, C.; OLIVAS, G. I.; BELTRAN, J. G.; ALIAGADA, D. R.; SEPULVEDA, D. R. High Hydrostatic Pressure Processing of Cheese. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 11, n. 4, p. 399–416, 2012.

MATTILA-SANDHOLM, T. AND M. SAARELA, **Functional dairy products**. Cambridge, Woodhead Publishing, 2003.

MEIRA, Q. G. S. et al. Effects of added Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, Part 3, p. 828-838, 2015.

MILKPOINT. As Grandes oportunidades do Mercado de queijo no Brasil. 2015. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil>>. Acesso em: 13 Jan. 2016.

MILKPOINT. Alimentos lácteos funcionais: facilitando os hábitos saudáveis de consumo 2008. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/cadeia-do-leite/leite-saude/alimentos-lacteos-funcionais>> Acesso em: 13 Jan. 2016.

MORTON, R.D. Aerobic Plate Count. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4. ed. Washington DC. American Public Health Association. Frances Pouch Downes & Keith Ito (Eds.), 2001. p.63-67.

NAGPAL, R., et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v.334, n.1, p.1-15. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x>>. Acesso em. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x.

NIELSEN. **Shopper Vision**. São Paulo: Nielsen, 2010

Núcleo de estudos e pesquisas em alimentação. Universidade estadual de campinas. **Tabela brasileira de composição de alimentos**. NEPA-UNICAMP, 2004.

OECD/FAO. **Dairy and Dairy Products**. OECD Publishing, 2016. Disponível em: </content/chapter/agr_outlook-2016-11-enhttp://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2016-11-en >.

OEY, I.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Effect of high pressure processing on colour, texture and flavor of fruit and vegetable– based food products: a review. **Trends in Food Science and Technology**, vol. 19, p. 320 – 328, 2008.

OLIVEIRA, G. D. M. E. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241-247, 2014.

PERRY, K. S. P. Cheese: Chemical, biochemical and microbiological aspects. **Quimica Nova**, v.27, n.2, p.293-300. 2004. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-30944442821&partnerID=40&md5=d24f15b04fe4479aa2a8b8270f03ae24>>. Acesso em. doi.

PINTO, F. G. S. et al. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

PIGATTO, C. P.; VALIM, C. A. M. R. A.; RAGAZZANI, F. Inibição do crescimento de Escherichia coli isolada de Queijo “Minas Frescal” por Lactobacillus acidophilus. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, 2007.

ROCHA, C. F. O consumidor como fonte de inovação: Ferramentas de avaliação sensorial para o desenvolvimento de novos produtos alimentares. 2014. 182f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências e Consumo Alimentar). Universidade Aberta. Porto, 2014.

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A.; SAAD S.M.I. Conditions of production and distribution of minas fresh cheese, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.2, p.263-272, 2006

ROCOURT, JOCELYNE; BUCHRIESER, Carmen. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. **Food science and technology**, v. 161, p. 1, 2007.

ROLIM, F. R. L. et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 807-813, 2015.

SAARELA, M. et al. Gut bacteria and health foods – the European perspective. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 99-117, 2002.

ROSS, R. et al. Cheese delivering biocultures: probiotic cheese. **Australian journal of dairy technology**, v. 57, n. 2, p. 71-78, 2002. ISSN 0004-9433.

SADIA. Chegou Soltíssimo, igualíssimo ao fatiado na hora. Disponível em: <<http://www.sadia.com.br/soltissimo/#>> Acesso em 27 janeiro 2016.

SALDO, J.; MCSWEENEY, P. L. H. P. L. H. L. H.; SENDRA, E.; KELLY, A. L. L.; GUAMIS, B. Proteolysis in caprine milk cheese treated by high pressure to accelerate cheese ripening. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 39, n. 2, p. 169, 2000.

SANDERS, M. E. Probiotics: Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003

SANT'ANA, A. et al. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat milk, cow milk, or a mixture of both. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 12, p. 7442-7453, 2013. ISSN 0022-0302.

SAVARD, Patricia et al. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. **International journal of food microbiology**, v. 149, n. 1, p. 50-57, 2011.

SCARCELLI, F. A evolução do mercado de queijos em 2014 e suas perspectivas. **Revista Leite e Derivados**, p. 20-22, 2015.

SCHMID, Katja et al. Development of probiotic food ingredients. **Probiotics in food safety and human health**, p. 35-66, 2006.

SEBRAE. Queijos nacionais. Estudos de mercado SEBRAE/ESPM. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas**. 2008. Disponível em <[http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/\\$File/NT0003909A.pdf](http://201.2.114.147/bds/bds.nsf/4416AA3881FA433B832574DC00471EF1/$File/NT0003909A.pdf)> Acesso em 05/11/2016.

SHARAFEDTINOV, K.K., PLOTNIKOVA, O.A., ALEXEEVA, R.I., SENTSOVA, T.B., SONGISEPP, E., STSEPETOVA, J., ET AL. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients-A randomized double-blind placebo-controlled pilot study. **Nutrition**, 12, 138, 2013.

SHARMA, K. D.; KARKI, S.; THAKUR, N. S.; ATTRI, S. Chemical composition, functional properties and processing of carrot: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 1, p. 22–32, 2012.

SHARMA, M., & DEVI, M., Probiotics: A comprehensive approach toward health foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 54, 537–552, 2014.

SILVA et al., Conservation and quality control of cheeses: A literature review. **PUBVET**, v.11, n.4, p.333-341, 2017.

SILVA, J. F. Q., FILIZOLA, L. R. S., MAIA, M. M. D. & SENA, M. J. Utilização de coliformes termotolerantes como indicadores higiênico-sanitários de queijo Prato comercializado em supermercados e feiras livres de Recife-PE. **Revista de Medicina Veterinária**, 1, 21-25, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 259p., 1997.

SOUZA, C. H.; SAAD, S. M. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physico-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 633-640, 2009. ISSN 0023-6438.

SUN, D.-W. **Emerging Technologies for Food Processing**. 1st. Elsevier, 2006. 771.

SWANSON, K.M.J.; BUSTA, F.F.; PETERSON, E.H.; JHONSON, M.G. Colony count methods. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington American Public Health Association,. Chap.4, p.75-95, 1992

TIBURSKI, J. H. et al. The effect of high pressure processing on carotenoids content of yellow mombin (*Spondias mombin* L.). In: **Central theme, technology for all: sharing the knowledge for development. Proceedings of the International Conference of Agricultural Engineering, XXXVII Brazilian Congress of Agricultural Engineering, International Livestock Environment Symposium-ILES VIII, Iguassu Falls City, Brazil, 31st August to 4th September, 2008**. International Commission of Agricultural Engineering (CIGR), Institut fur Landtechnik, 2008.

TIMM, C. D. et al. Pontos críticos de controle na pasteurização do leite em microusinas. **Rev Inst Latic Cândido Tostes**, v. 59, n. 336, p. 75-80, 2004.

TSEVDOU, M. S.; Taoukis, P. S. "Effect of non-thermal processing by High Hydrostatic Pressure on the survival of probiotic microorganisms: Study on *Bifidobacteria* spp." **Anaerobe**, v.17, p. 456-458, 2011.

TOEPFL, S. et al. Review: Potential of High Hydrostatic Pressure and Pulsed Electric Fields for Energy Efficient and Environmentally Friendly Food Processing **Food Reviews International**, v. 22, n. 4, p. 405-423, 2006.

TOURNAS, V.; STACK, M.E.; MISLIVEC, P.B.; KOCH, H.A.; BANDLER, R. Yeasts, molds and mycotoxins. In: **Bacteriological Analytical Manual Online**. 2001

TRUJILLO, A. J., MARTA CAPELLAS, JORDI SALDO, RAMON GERVILLA, BUENAVENTURA GUAMIS. Applications of high-hydrostatic pressure on milk and dairy products: a review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 3, p. 295-307, 2002.

VALENTIN, D. et al. Quick and dirty but still pretty good: a review of new descriptive methods in food science. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 8, p. 1563-1578, 2012.

VARELA, P.; ARES, GASTÓN. Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. **Food Research International**, v. 48, p. 893-908, 2012.

VERRUCK, S., et al. Influence of Bifidobacterium Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. **Journal of Food Engineering**, v.151, n.Supplement C, p.34-42. 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877414005068>>. Acesso em. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.021>.

WANG, C. Y. et al. Recent Advances in Food Processing Using High Hydrostatic Pressure Technology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 4, p. 527-540, 2016. ISSN 10408398 (ISSN). Disponível em: < <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84961574637&partnerID=40&md5=91c2bfbb30cb32397eedddc4132fb53> >.

ZIARNO, M., et al. Study on dynamics of microflora growth in probiotic rennet cheese models. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.60, n.2, p.127-131. 2010. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-77952997257&partnerID=40&md5=d2c2853d479b22374a8f8fdbddd3831b>>. Acesso em. doi