

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

**DISSERTAÇÃO**

**Desenvolvimento e Processamento por Alta Pressão Hidrostática  
de Queijo Minas Frescal Incorporado com Cenoura**

**FABÍOLA DOS SANTOS GOUVEA**

2017



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

**DESENVOLVIMENTO E PROCESSAMENTO POR ALTA PRESSÃO  
HIDROSTÁTICA DE QUEIJO MINAS FRESCAL INCORPORADO  
COM CENOURA**

**FABIOLA DOS SANTOS GOUVEA**

*Sob a Orientação do Professor*

**Ph.D. Amauri Rosenthal**

e

*Coorientação da Professora*

**D.Sc. Elisa Helena da Rocha Ferreira**

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 em Tecnologia de Alimentos

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2017

664  
G719d  
T

Gouvea, Fabiola dos Santos, 1989-  
Desenvolvimento e processamento por  
alta pressão hidrostática de queijo minas  
frescal incorporado com cenoura / Fabiola  
dos Santos Gouvea - 2017.  
90 f.: il.

Orientador: Amauri Rosenthal.  
Dissertação (mestrado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de  
Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos.

Bibliografia: f. 49-57.

1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2.  
Laticínios - Processamento - Teses. 3.  
Queijo-de-minas - Teses. 4. Cenoura -  
Teses. 5. Carotenóides - Teses. 6. Pressão  
hidrostática - Teses. I. Rosenthal,  
Amauri, 1960-. II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. III. Título.

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

**FABIOLA DOS SANTOS GOUVEA**

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/02/2017

---

Amauri Rosenthal (Ph.D.) Embrapa-CTAA  
(Orientador)

---

Julia Hauck Tiburski (D.Sc.)UFRRJ

---

Junio Cesar Jacinto de Paula (D.Sc.) Epamig

## RESUMO

GOUVEA, Fabiola dos Santos. **Desenvolvimento e processamento por alta pressão hidrostática de queijo Minas Frescal incorporado com cenoura**. 2017. 90p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Os consumidores têm se tornado mais críticos na escolha de um produto alimentício, sendo as características sensoriais, nutricionais e funcionais, assim como a segurança do alimento, fatores preponderantes na decisão de compra do consumidor. Tais demandas têm induzido a busca por métodos alternativos de conservação, menos danosos à qualidade do produto, como adição de antimicrobianos naturais e o processamento por alta pressão hidrostática. Nesse sentido, o presente estudo objetivou avaliar o efeito da incorporação da cenoura e do tratamento por alta pressão hidrostática na inibição da *Listeria innocua* e nas características químicas, física, microbiológicas e sensoriais do queijo Minas Frescal, visando desenvolver um produto diferenciado, mais seguro e saudável. O processamento dos queijos seguiu um delineamento fatorial  $2^2$  com os fatores: pressão (0 e 500 MPa) e concentração de cenoura (0 e 6%) com 3 repetições do ponto central. Foram realizadas análises físico-químicas (umidade, proteína, extrato etéreo, resíduo mineral fixo (RMF) e cor instrumental), quantificação dos carotenoides (carotenoides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno) e contagem de *Listeria innocua*. A análise sensorial seguiu um delineamento fatorial completo (considerando os pontos centrais como fatores), em que foi avaliado a aceitação global pela escala hedônica de 9 pontos e o Teste CATA (*check-all-that-apply*) com 102 consumidores. O processamento por alta pressão em 500 MPa por 10 minutos reduziu a contagem de *Listeria innocua* em aproximadamente 7 log ufc/mL, para níveis não detectáveis imediatamente após o processamento, e essa contagem se manteve constante ao longo do armazenamento a 8°C por 22 dias. Já a incorporação individual (sem pressurização) da cenoura (6%), ou a utilização combinada desta na concentração de 3% com a pressão de 250 MPa, não apresentou efeito na inibição desse micro-organismo. Os teores de umidade, proteína, extrato etéreo e RMF também não foram afetados significativamente pela incorporação da cenoura ou pelo processamento de alta pressão hidrostática. Como esperado, a incorporação da cenoura aumentou os teores de carotenoides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, bem como influenciou nos parâmetros de cor instrumental. Em contrapartida, o processamento por alta pressão não apresentou efeito significativo sobre esses compostos. O processamento por alta pressão hidrostática pouco influenciou na aceitação global das amostras, enquanto que a incorporação de 6% de cenoura tendeu a uma menor aceitação. Quando analisados os consumidores individualmente, foi verificado que a amostra processada a 250 MPa com 3% de cenoura não diferiu da amostra controle, sendo essas as mais preferidas. O teste CATA mostrou que os consumidores conseguiram diferenciar e caracterizar sensorialmente os queijos incorporados com cenoura dos não adicionados.

**Palavras-chave:** Queijo Minas Frescal, cenoura, carotenoides, alta pressão hidrostática

## ABSTRACT

GOUVEA, Fabiola Santos. **Development of Minas Frescal cheese added with carrot and processed by high hydrostatic pressure**. 2017. 90p Dissertation (Master of Science and Food Technology). Institute of Technology, Department of Food Technology, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Consumers are increasingly becoming more critical in the selection of a food product, by mainly considering sensory, nutritional and safety issues in the decision to purchase. As a result, less drastic preservation methods have been more deeply investigated and broadly adopted in industrial scale, including the addition of natural antimicrobials and the high hydrostatic pressure processing. In this sense, the objective of this study was to evaluate the effect of the incorporation of carrot either individually or in combination with high pressure treatment on the inhibition of *Listeria innocua* inoculated in Minas Frescal cheese, besides evaluating the effect on the proximate composition, carotenoids content and sensorial characteristics and acceptance. A 2<sup>2</sup> factorial design was first employed to perform the chemical and physical characterization, being the independent variables the pressure (0 and 500 MPa) and the carrot concentration (0% and 6%), with three repetitions of the central point. The following analyses were carried out in the cheeses resulting from the treatments: proximate composition (moisture, protein, ethereal extract, fixed mineral residue - FMR); instrumental color; carotenoid quantification (total carotenoids, lutein,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene) and enumeration of *Listeria innocua*. For the sensory analysis, a full factorial design was adopted, by considering the central points of the first design as factors themselves. The global acceptance was evaluated by a 9-point hedonic scale and the CATA Test (*check-all-that-apply*) with 102 consumers. High pressure processing at the level of 500 MPa for 10 minutes reduced the *Listeria innocua* count from 7 log cfu /ml up to undetectable levels, without further significant increase along the chilled storage at 8 °C for 22 days. On the contrary, the single carrot incorporation (6%) or its combination in the level of (3%) with pressure treatment at (250 MPa) had no effect on the inhibition of this microorganism. Moisture content, protein, ethereal extract and FMR were not significantly affected by either the carrot incorporation or the high pressure processing. As expected, carrot addition enhanced the levels of total carotenoids, lutein,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -carotene, as well as affected the instrumental color parameters. There again, high pressure processing had no significant effect on these compounds. Furthermore, high hydrostatic pressure processing did not influence the overall acceptance of the samples, while the incorporation of 6% of carrot tended to lower the acceptance. In the analysis of individual consumers, the cheese with 3% of carrot processed at 250 MPa did not differ from the control sample, which was the most preferred sample. According to the CATA test, the consumers were able to sensory characterize and differentiate between the cheeses with or without the addition of carrot.

**Key words:** Minas Frescal cheese, carrot, carotenoids, high hydrostatic pressure

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Formulação do queijo tipo Minas Frescal incorporado com cenoura .....	13
Tabela 2- Planejamento experimental 2 <sup>2</sup> utilizado nos experimentos para avaliação do efeito da alta pressão e/ou concentração de cenoura nas características físicas, químicas e microbiológicas do queijo .....	17
Tabela 3- Relação da absorvância e volume das alíquotas.....	18
Tabela 4- Avaliação sensorial da intensidade do sal e do teor de cenoura dos queijos tipo Minas Frescal.....	23
Tabela 5- Efeito do teor de cenoura e/ou processamento por alta pressão nos parâmetros de cor instrumental (L*, a*, b*, C*, h) do queijo tipo Minas frescal.....	29
Tabela 6- Composição centesimal dos queijos Minas Frescal incorporados com cenoura e/ou processados por alta pressão hidrostática. ....	31
Tabela 7- População de <i>Listeria innocua</i> (log ufc/mL) nos queijos incorporados de cenoura e/ou processados por alta pressão hidrostática ao longo do armazenamento refrigerado a (8°C) por 22 dias. ....	36
Tabela 8- Perfil socioeconômico dos consumidores participantes do teste sensorial (n=102)de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão .....	40
Tabela 9- Médias e desvio padrão entre parênteses da avaliação global dos Queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão.....	41
Tabela 10- Médias da avaliação global segmentadadas amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão .....	44
Tabela 11- Frequência de menção de cada termo do questionário CATA usado para descrever as amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão .....	45

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química dos pigmentos $\beta$ -caroteno e $\alpha$ -caroteno.....	8
Figura 2 - Números de unidades de equipamentos comerciais de alta pressão no mundo e sua distribuição continental. Fonte: HUANG <i>et al.</i> , (2017) adaptado de (HIPERBARYC, Burgos, Spain).....	9
Figura 3- Processamento do Queijo Minas Frescal com cenoura destinado à análise sensorial (A) Coagulação, (B) mexedura, (C) enformagem, (D) corte.....	14
Figura 4- Fluxograma do processamento de queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou pressurizado.....	15
Figura 5- Equipamento de APH Stated Fluid Power modelo S-FL-850-9-W, Inglaterra. (A) aberto (B) fechado. Fonte: LEAL (2010) .....	16
Figura 6- Fluxograma do preparo do inóculo de <i>Listeria innocua</i> para inoculação no queijo. 19	
Figura 7- Diagrama de Pareto sobre o efeito da alta pressão hidrostática e/ou incorporação de cenoura nos teores de carotenoides totais (A), luteína (B), $\alpha$ -caroteno (C) e $\beta$ -caroteno (D)..	26
Figura 8- Superfícies de contorno para (A) carotenoides totais, (B) luteína, (C) $\alpha$ -caroteno e (D) $\beta$ -caroteno em queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou pressurizados. ....	28
Figura 9- Diagrama de Paretos relativo ao efeito da concentração de cenoura e níveis de pressurização sobre os parâmetros de cor de queijo tipo Minas frescal, sendo (A) L*, (B) a*, (C) b*, (D) C* e (E) h.....	30 <b>Erro! Indicador não definido.</b>
Figura 10-Diagrama de Paretos relativo ao efeito da incorporação da cenoura e do processamento da alta pressão hidrostática na composição centesimal dos queijos tipo Minas frescal.....	33
Figura 11- Superfície de resposta do efeito da incorporação da cenoura e do processamento por alta pressão hidrostática na inibição de <i>Listeria innocua</i> em queijo tipo Minas Frescal .....	34
Figura 12- Diagrama de Pareto sobre o efeito da incorporação da cenoura e do processamento por alta pressão hidrostática na inibição de <i>Listeria innocua</i> em queijo tipo Minas Frescal. ..	35
Figura 13- Evolução da contagem de <i>Listeria innocua</i> (log de ufc/mL) (médias de duas replicatas) no queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão armazenado a 8°C por 22 dias .....	37
Figura 14- Mapa de preferência interno mostrando (a) posição dos consumidores e (b) a posição das amostras de queijo Minas Frescal incorporadas com cenoura e/ou tratadas por alta pressão .....	42
Figura 15- Dendrograma dos participantes da avaliação sensorial nas amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão.....	43
Figura 16- Mapa de correspondência de análise .....	46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral .....	2
1.2 Objetivos específicos.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Produção e Consumo de Lácteos no Mundo e no Brasil.....	3
2.2 Queijo Minas Frescal.....	4
2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	4
2.3 Antimicrobianos Naturais.....	5
2.3.1 Cenoura.....	6
2.4 Alta Pressão Hidrostática.....	9
2.4.1 Efeito da alta pressão hidrostática na inativação de microrganismos .....	10
2.4.2 Combinação da alta pressão com antimicrobianos naturais .....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Material.....	13
3.2 Métodos .....	13
3.2.1 Formulação do queijo .....	13
3.2.2 Processamento do queijo minas frescal incorporado com cenoura .....	13
3.2.3 Fluxograma do queijo Minas Frescal .....	14
3.2.4 Definição do teor de sal da formulação do queijo em relação aos níveis de cenoura com base em avaliação sensorial preliminar .....	16
3.2.5 Pressurização dos queijos .....	16
3.3 Planejamento Experimental.....	16
3.3.1 Avaliação do efeito do processamento por alta pressão nas características físicas, químicas e microbiológicas do queijo com cenoura.....	16
3.4 Quantificação dos Carotenoides totais, Luteína, $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno .....	17
3.5 Análise Instrumental da Cor.....	18
3.6 Análises Físico-químicas.....	18
3.7 Análises Microbiológicas .....	19
3.7.1 Preparo do inóculo de <i>Listeria innocua</i> e inoculação no queijo Minas Frescal .....	19
3.7.2 Contagem da população de <i>Listeria innocua</i> .....	20
3.8 Análise Sensorial .....	20

3.8.1 Levantamento de atributos .....	20
3.8.2 Aceitação global e questionário CATA.....	20
3.8.2 Análise estatística .....	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
4.1 Teor de Sal da Formulação do Queijo em Relação aos Níveis de Cenoura .....	22
4.2 Efeito da Alta Pressão no Teor de Carotenoides Totais, Luteína, $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno. .....	22
4.3 Efeito da Alta Pressão na Cor Instrumental dos Queijos Incorporados com Cenoura e Pressurizados .....	28
4.4 Efeito da Concentração de Cenoura e/ou Pressão no Teor de Umidade, Proteína, Extrato Etéreo e Resíduo Mineral Fixo.....	31
4.5 Efeito da Concentração de Cenoura e/ou Aplicação de Alta Pressão na Inibição da <i>Listeria innocua</i> .....	34
4.6 Análise Sensorial .....	40
4.6.1 Perfil socioeconômico dos consumidores .....	40
4.6.2 Teste de aceitação .....	41
4.6.3 Mapa de Preferência Interno.....	41
4.6.4 CATA (check-all-that-apply) .....	44
5 CONCLUSÃO.....	48
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	49
7 APÊNDICE .....	58

# 1 INTRODUÇÃO

O consumo de queijos no Brasil aumentou nos anos anteriores à presente crise econômica, e esse bom desempenho pode ser atribuído ao aumento do poder de compra do consumidor e a percepção do queijo como um alimento rico em proteínas de alto valor biológico (EUROMONITOR, 2015), bem como a suas características sensoriais. Entre os queijos mais consumidos no país, se encontra o queijo Minas Frescal. Esse queijo, também conhecido como queijo branco, é um queijo macio, de sabor suave a ligeiramente ácido. Contudo, por esse tipo de queijo ser um produto fresco com alto teor de umidade e muito manipulado, ele é susceptível à contaminação com micro-organismos patogênicos.

Os consumidores brasileiros tinham pouca informação e preocupação sobre as características e propriedades dos alimentos em geral, mas com o decorrer dos anos houve uma mudança no comportamento do consumidor, os quais se tornaram mais conscientes da importância da alimentação e passaram a ser mais críticos na escolha de um produto, sendo as características nutricionais e funcionais assim como a segurança do alimento, preponderante na decisão de compra do consumidor (BARBOSA, 2010).

A segurança dos alimentos é um dos grandes problemas da indústria alimentícia, que busca cada vez mais melhorias que agreguem qualidade ao produto final. Entre os desafios está a contaminação dos alimentos por micro-organismos que estão associados à produção de queijos frescos, como a bactéria *Listeria monocytogenes*. Essa bactéria tem sido motivo de preocupação na saúde pública devido a sua patogenicidade, que pode levar a consequências graves como meningites, enterocardites e outras enfermidades em humanos, pela ingestão de leite cru e queijos frescos, denominadas listerioses. Embora a ocorrência dessa doença seja baixa é considerada grave, com altas taxas de mortalidade em comparação com outros patógenos, e atinge principalmente indivíduos vulneráveis como mulheres grávidas, idosos e imunodeprimidos (FAO/WHO, 2004).

Os tratamentos empregados na conservação do queijo Minas Frescal são a pasteurização do leite, a refrigeração, sal e umidade, contudo, o queijo é susceptível a recontaminação pela *Listeria monocytogenes* após o tratamento térmico e, uma vez presente no queijo, essa bactéria consegue se desenvolver em temperaturas de refrigeração. Desse modo, torna-se um desafio para a indústria a busca por métodos alternativos mais eficientes para garantir maior segurança do alimento (COELHO *et al.*, 2014). Assim, muitos estudos têm sido realizados a fim de encontrar alternativas para a inibição da *Listeria monocytogenes*, como a utilização de novas tecnologias e compostos antimicrobianos naturais, presentes em certos alimentos, como na cenoura.

Nesse sentido, a *Daucus carota*, conhecida popularmente como cenoura, apresenta um efeito inibidor sobre *Listeria monocytogenes*. Essa hortalíça, largamente consumida na dieta do brasileiro, é uma fonte rica em compostos bioativos, sendo os carotenoides o principal grupo de compostos encontrados. Esses compostos bioativos promovem benefícios à saúde por suas atividades antioxidantes e pro-vitamina A. Outros compostos presentes na cenoura estão sendo estudados, pois ainda são desconhecidos os compostos que promovem a inibição de *L. monocytogenes*. Embora ainda não esteja bem esclarecida, o composto e mecanismo responsável pela atividade anti-listeria da cenoura, esta possui potencial para ser supostamente utilizada no controle da contaminação da *Listeria monocytogenes* (BEUCHAT e BRACKETT, 1990; NORIEGA *et al.*, 2010).

Outro método alternativo para o controle da *L. monocytogenes* é a alta pressão hidrostática. Esse é um método de conservação não térmico, que consiste em submeter alimentos 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). Possui a vantagem de inativar microrganismos patogênicos e deteriorantes, com pouca alteração nas características sensoriais e nutricionais do alimento.

A utilização combinada da cenoura com a alta pressão hidrostática pode ser uma alternativa para o controle da contaminação do queijo Minas Frescal pela *L. monocytogenes*, tornando o produto mais seguro e, adicionalmente, obtendo-se um produto enriquecido com compostos bioativos com atividade provitamina A e antioxidante. Dessa forma, objetivou-se com o presente trabalho desenvolver um queijo Minas Frescal incorporado com cenoura processado por alta pressão hidrostática e estudar o efeito do processo sobre as características físico-químicas, funcionais e sensoriais do produto e sobre a inibição da *Listeria innocua*.

## **1.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e processado por alta pressão hidrostática.

## **1.2 Objetivos específicos**

- Desenvolver e estabelecer processamento de queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e pressurizado por alta pressão hidrostática;
- Avaliar o efeito da incorporação da cenoura e ou da alta pressão hidrostática nas concentrações de carotenoides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno;
- Avaliar o efeito da incorporação da cenoura e ou da alta pressão hidrostática nas características físico-químicas do queijo;
- Avaliar o efeito da incorporação da cenoura e ou da alta pressão hidrostática na inibição da *Listeria innocua* inoculada no queijo;
- Avaliar a aceitação global do queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e ou pressurizado por alta pressão hidrostática e caracterizar sensorialmente estes queijos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Produção e Consumo de Lácteos no Mundo e no Brasil

A atividade leiteira se destaca como uma das principais atividades agropecuárias, com a produção mundial de leite de vaca de aproximadamente quinhentos bilhões de litros em 2015 (USDA, 2016) e, aproximadamente, 150 milhões de famílias em todo o mundo estão envolvidas com essa atividade. Apesar do domínio dessa cadeia por países desenvolvidos como Estados Unidos, Nova Zelândia e países da União Européia, nas últimas décadas, países emergentes como a Índia, Brasil e China vêm aumentando sua participação na produção leiteira global (FAO, 2016). Atualmente os Estados Unidos é o maior produtor de leite no mundo, seguido pela Índia, China, Rússia e Brasil (USDA, 2016).

O consumo per capita de leite e produtos lácteos é maior nos países desenvolvidos, mas a diferença com muitos países em desenvolvimento vem diminuindo. A demanda por leite e produtos lácteos nos países em desenvolvimento está crescendo com o aumento da renda, crescimento populacional, urbanização e mudanças nas dietas. A crescente demanda por estes produtos oferece uma boa oportunidade para os produtores (e outros intervenientes na cadeia de laticínios) (FAO, 2016).

No Brasil, a produção leiteira vem crescendo nos últimos anos, passando de 32 bilhões de litros de leite em 2011 para 35,1 bilhões litros em 2014 (CONAB, 2016) e, em 2015, o país foi o quinto maior produtor de leite no mundo, com produção de 34 bilhões. Esse resultado decorreu de uma maior oferta devido ao aumento do rebanho nacional bem como ao aumento da demanda devido ao aumento da renda dos brasileiros naquele período. O consumo de leite e derivados no país aumentou de 168,1L/hab. em 2011 para 175,2L/hab. em 2014, porém ainda estava muito inferior comparado com países vizinhos como a Argentina (214, 4L/hab. ano) e Uruguai (246 L/hab. ano) (CONAB, 2016).

Dos 34 bilhões de litros produzidos em 2015 no país, 24 bilhões de litros foram destinados à indústria de laticínios, que somavam 1679 estabelecimentos em todo território nacional. Do leite processado e inspecionado, 56 % foram embalados como leite fluido, iogurte e sobremesas, enquanto 46% (11 bilhões de litros) foram transformados em queijos (ZOCCAL, 2016).

Dentre os produtos lácteos, os queijos têm se destacado e o país experimentou um aumento considerável na produção e consumo de queijos. De acordo com a Milkpoint (2015), a produção brasileira de queijo cresceu de 525 toneladas em 2005 para 1105 toneladas em 2015. Acompanhando a produção, o consumo de queijo per capita no país também aumentou de 3,5 Kg, em 2009, para 5,3 Kg, em 2015. Esse bom desempenho pode ser explicado pelo havido aumento do poder de compra do consumidor brasileiro até aquele ano, associado ao aumento da percepção do queijo como uma refeição saudável e com alto valor nutritivo (EUROMONITOR, 2015).

Em 2015, esse crescimento começou a desacelerar devido à crise econômica que atingiu o país, no entanto, as expectativas são que para os próximos anos, o consumo se estabilize e volte a crescer (FAO, 2016). Para superar a crise e continuar crescendo, uma estratégia que deverá ser utilizada pela indústria queijeira é a inovação por meio de desenvolvimento de produtos que utilizem novos ingredientes e/ou novas tecnologias que promovam benefícios para a saúde e segurança do consumidor (MILKPOINT, 2015).

## 2.2 Queijo Minas Frescal

O Queijo Minas Frescal é um queijo genuinamente brasileiro, também conhecido como queijo branco, frescal ou minas. É definido como sendo um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). De acordo com o regulamento técnico de identidade e qualidade, o queijo Minas Frescal é classificado como semigordo e de muita alta umidade, apresentando-se na forma cilíndrica e peso variando de 0,3 Kg a 5 kg (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004). Em média, apresenta a seguinte composição: 20,2% de gordura, 55,1% de umidade, 17,4% de proteína e 3% de cinzas (TACO, 2011).

Apresenta bom rendimento de produção, cerca de 5 – 6,5 L de leite em média para a obtenção de 1 Kg de queijo que, aliado à sua tecnologia de fabricação relativamente simples, associado ou não a necessidade de maiores investimentos em equipamentos, o torna um dos queijos mais difundidos no país, tanto em produção quanto em consumo, aparecendo como o quarto tipo de queijo mais consumido no país, ficando atrás apenas do mussarela, requeijão e queijo prato (MILKPOINT, 2015).

O queijo Minas Frescal é um queijo muito susceptível à contaminação por micro-organismos patogênicos devido as suas características como: alto teor de umidade, pH em torno de 5-6,0, alto teor de nutrientes, alta manipulação. Além disso, a produção do queijo Minas Frescal na indústria é realizada com adição de ácido lático ao invés de bactérias lácticas, as quais atuam como micro-organismos competidores e auxiliam no controle de micro-organismos patogênicos (BRITO *et al.*, 2008).

### 2.2.1 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram positivo, não esporulado e anaeróbio facultativo. Esse patógeno é considerado de grande importância para a saúde pública em função do seu fator de virulência, a listeriolisina O (MELO *et al.*, 2015). Dentro da espécie *L. monocytogenes* há 13 sorotipos, dos quais os 4b, 1/2 a e 1/2 b compreendem linhagens isoladas com esse fator de virulência. Como medida preventiva, é necessário considerar todas as cepas dessa espécie como potencialmente patogênicas (ALMEIDA *et al.*, 2013)..

A ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* pode ocasionar a listeriose, doença alimentar que se apresenta em duas formas, invasiva e não invasiva. A listeriose não invasiva é a forma menos agressiva da doença, e apresenta sintomas de diarreia, febre e dor muscular. Já a listeriose invasiva não apresenta sintomas comuns de infecção alimentar, como os gastrointestinais, e podem progredir para septicemia, meningite e cefalite. Esta é uma doença oportunista que atinge principalmente indivíduos pertencentes ao grupo de risco como idosos, portadores de doenças crônicas e gestantes. Embora seja rara a ocorrência dessa doença, ela é letal em 30% dos casos (FDA, 2003).

Surtos dessa doença já foram constatados em vários países, sendo um dos primeiros casos notificados em 1981, no Canadá, atribuído ao consumo de uma salada industrializada. E entre 1998 a 2008, nos EUA, onde ocorreram 24 surtos de listerioses notificados resultando em 215 hospitalizações e 38 mortes, no qual 83% foram transmitidos por alimentos, sendo as carnes processadas e os queijos frescos os mais envolvidos (CARTWRIGHT, 2013). Um dos surtos mais recente foi em 2015, também nos EUA, envolvendo o consumo de queijos macio, no qual ocorreram 28 hospitalizações e 3 mortes (CDC, 2015) e foi realizado um recall dos produtos em 10 estados.

A ocorrência dessa doença está associada principalmente a alimentos industrializados do tipo pronto para consumo, pois estes não sofrem outros processamentos, como uma cocção

prévia que possam inativar as cepas de *L. monocytogenes*. Tal circunstância, associado ao armazenamento sob refrigeração e características intrínsecas do alimento, permite o crescimento deste micro-organismo (MELO *et al.*, 2015). Essas condições estão presentes em saladas industrializadas, peixes defumados, carnes processadas e queijos frescos. E devido ao aumento da disponibilidade e variedade destes tipos de alimentos no mercado, assim como o aumento dos grupos de risco, torna-se necessário um maior controle e monitoramento da *Listeria monocytogenes* (WHO/FAO, 2004).

No Brasil, não há registro de surtos de listeriose associados ao consumo de alimentos. No entanto, é frequente o isolamento da *L. monocytogenes* em queijos de alta e média umidade, principalmente o queijo Minas Frescal, e no ambiente de processamento desse queijo, que o torna um risco potencial (BARANCELLI *et al.*, 2014). Diante disso, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, por meio da IN 9 de 8 de abril de 2009, tornou obrigatório a análise microbiológica de pesquisa da *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal e procedimentos de controle (BRASIL, 2009).

O controle da contaminação da *Listeria monocytogenes* no queijo Minas Frescal é um desafio para a indústria de laticínios. Essa bactéria tem origem ambiental e pode ser introduzida nos laticínios através da matéria-prima (leite), utensílios e equipamentos contaminados, pelo sistema de ventilação e pneus do veículo de transporte (ALMEIDA *et al.*, 2013).

O tratamento térmico de pasteurização do leite para a fabricação do queijo, quando adequado, é suficiente para eliminar esse micro-organismo (BECKERS, 1987). Entretanto, durante e após o processamento, o queijo é susceptível a contaminação por cepas de *Listeria monocytogenes*, possivelmente presentes nas plantas de processamento (MELO *et al.*, 2015).

Brito *et al.*, (2008) constataram a presença de *Listeria monocytogenes* em níveis de contaminação de 3,64 log ufc/g em queijos obtidos diretamente da planta de processamento, e identificaram que as fontes de contaminação estavam relacionadas com o local de refrigeração, durante a dessoragem, e outros locais que entravam em contato com o queijo, após essa etapa. Barancelli *et al.*, (2014) isolaram cepas de *Listeria monocytogenes* em queijos e em superfícies que entravam ou não em contato com o alimento, em 2 plantas de processamento de queijo Minas Frescal na região nordeste de São Paulo.

A *L. monocytogenes* possui a habilidade de formar biofilmes, aderindo a pisos, drenos e superfícies de equipamentos de contato com alimentos, tornando-se resistente a procedimentos de limpeza e persistindo nas plantas de processamento de queijo por meses e até anos (MELO *et al.*, 2015).

Após o processamento do queijo Minas Frescal, não há mais nenhuma etapa que possa eliminar a *L. monocytogenes* do produto. E a refrigeração a 4°C utilizada para conservar esse queijo, não inibe o crescimento deste micro-organismo (BARANCELLI *et al.*, 2014). Ademais, o transporte e armazenamento refrigerado nos locais de venda podem sofrer temperaturas de abuso, favorecendo o crescimento da população desse patógeno ao longo da validade comercial do produto. Sendo assim, esforços no sentido de inativar e/ou inibir o crescimento desse micro-organismo no queijo Minas Frescal são necessários para garantir a segurança do consumidor.

### **2.3 Antimicrobianos Naturais**

Apesar do considerável aumento de pesquisas sobre os aditivos alimentares e seus impactos na saúde nas últimas décadas, controvérsias sobre os riscos para saúde ainda são motivos de amplos debates. Adicionalmente, a preocupação crescente dos consumidores com os alimentos que consomem e exigência por mais esclarecimentos dos ingredientes utilizados na composição desses alimentos, faz com que os regulamentos tendam a se tornar mais rígidos para detectar adulterações e usos excessivos de aditivos (CAROCHO *et al.*, 2014).

Para atender essas novas exigências e concomitantemente garantir a oferta de um produto seguro do ponto de vista microbiológico, órgãos de pesquisa e indústria vêm buscando alternativas naturais para substituir os conservantes sintéticos e, entre tais alternativas, surgem os extratos de plantas e óleos essenciais (NEGI, 2012; CARVALHO *et al.*, 2015). A incorporação dessas alternativas de conservação também é uma oportunidade para a indústria aumentar a competitividade através da diferenciação do produto.

Ervas aromáticas e especiarias já são adicionadas à queijos distintos para fins aromáticos, e mais recentemente esses vêm sendo estudados pela sua potencial ação inibitória aos principais micro-organismos patogênicos e deteriorantes dos queijos, entre os quais a *Listeria monocytogenes* (TAYEL *et al.*, 2015; BLEOANCA *et al.*, 2016). *In vitro*, a ação antimicrobiana desses compostos tem demonstrando bons resultados, no entanto quando incorporados aos queijos, fatores intrínsecos a este alimentos podem reduzir a eficiência desses compostos. Esses compostos também podem impactar nas bactérias ácido-láticas bem como nas características sensoriais do produto. Um artigo de revisão específico sobre antimicrobianos aplicados a queijos, relacionado ao presente estudo, foi preliminarmente aceito para publicação na revista Ciência Rural (Qualis B2), estando em fase final de ajustes, conforme incluído no apêndice 1.

### 2.3.1 Cenoura

A *Daucus carota* L. conhecida popularmente como cenoura, é uma hortaliça pertencente à família das Apiaceas, distribuída pela Europa, Ásia e África e cultivada comercialmente em todo o mundo pelas suas raízes (VERMA *et al.*, 2014). As cenouras possuem óleos essenciais acumulados principalmente nas suas sementes, e em menores quantidades, em seus caules, folhas e raízes (WU *et al.*, 2006), possuindo diferentes grupos químicos entre os quais carotol, geranylacetate, sabinene,  $\alpha$ -pinene, myrcene e limonene (VERMA *et al.*, 2014), e são também importantes fontes de carotenoides, em especial, o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -caroteno.

A cenoura também é reconhecida pela atividade contra a bactéria patogênica *L. monocytogenes*. Em 1989, Heisick *et al.*, isolaram *L. monocytogenes* em produtos vegetais, incluindo batatas, rabanetes, couves, pepinos, alface e cogumelos, o que não foi observado em ensaios com cenoura. Desde então, outros estudos foram realizados para investigar esse efeito antilisterial da cenoura (BAUCHT & BRACKETT, 1990; LIAO, 2007; NORIEGA *et al.*, 2010). A origem desse efeito ainda é desconhecida e, dentre as teorias existentes, a mais aceita considera que os compostos fitoquímicos presentes naturalmente nas células vegetais da cenoura sejam os responsáveis por essa inibição (BAUCHT & BRACKETT, 1990).

Baucht & Brackett (1990) verificaram que a ação anti-listeria da cenoura é mais efetiva quando trituradas que inteira, sendo sugerido que, com as rupturas das células pelo processo de trituração, são liberados os compostos tóxicos para esses patógenos. A temperatura e o pH também podem influenciar na inativação da *L. monocytogenes* por cenoura: temperaturas altas têm efeito inibitório, porém não letal (NORIEGA *et al.*, 2010), e pH entre 5,0 – 6,4 tem efeito inibidor mais elevado (BAUCHT E DOYLE, 1995).

Diante dessa capacidade da cenoura de inibir a *L. monocytogenes*, sua aplicação em alimentos para reduzir a contaminação e crescimento desse patógeno, durante o armazenamento, foi avaliado em alguns estudos. Beuchat e Doyle (1995) avaliaram a sobrevivência e crescimento da *L. monocytogenes* em queijo Brie adicionado de suco de cenoura nas concentrações de 0, 5 e 10% e incubados a temperaturas de 5, 12 e 20°C ao longo de 14 dias. O número de células viáveis de *L. monocytogenes* presentes nesse alimento foi significativamente reduzido a temperatura de 5°, e essa redução foi proporcional ao aumento da concentração do suco de cenoura. Não foi verificado redução nos queijos submetidos a

temperatura de 12 ou 20°C, independente da concentração de cenoura utilizada. Patterson *et al.*, (2012) relataram a redução da contagem de *L. monocytogenes* em suco de cenoura armazenado a 4 e 8°C, de 6,56 ciclos logarítmicos para 5,06 e 6,00, respectivamente. E quando o suco de cenoura inoculado com *L. monocytogenes* foi pressurizado a 500 MPa por 1 min a 20°C, não houve detecção desse patógeno, após o tratamento e durante o armazenamento a 4 e 8°C, o qual foi atribuído ao efeito sinérgico do suco de cenoura com a alta pressão. Scollard *et al.*, (2013) avaliou a eficácia anti-listeria de cenoura triturada e ervas frescas (tomilho, orégano e alecrim) em uma salada minimamente processada. Foi verificado que o tomilho apresentava um efeito anti-listeria sinérgico com a cenoura, reduzindo em 6 ciclos logarítmicos a população de *L. monocytogenes*.

### 2.3.1.1 Carotenoides

A cenoura se destaca das outras hortaliças por ser uma fonte rica de fibras dietéticas, micronutrientes essenciais e carotenoides, em especial, os  $\beta$ -carotenos e os  $\alpha$ -carotenos (SHARMA *et al.*, 2012).

Os carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos pela natureza, compreendendo uma classe com mais de 600 diferentes tipos de compostos. Esses pigmentos são metabolizados por plantas, algas e microrganismos. Nos vegetais, são responsáveis pelas cores que variam entre amarelo e vermelho. Esses pigmentos também podem ser encontrados em tecidos de animais, porém estes não podem sintetizá-los, e suas obtenções e acúmulos são através da alimentação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

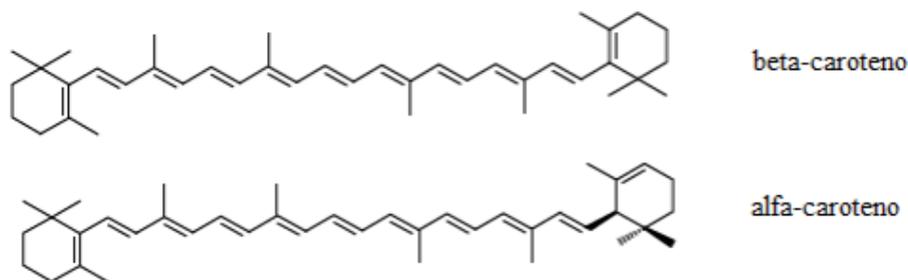
Estruturalmente, a maior parte dos carotenóides é constituída por uma cadeia com 40 átomos de carbono, alternada com ligações duplas e simples e contendo diferentes grupos cíclicos ou acíclicos no final. De acordo com a sua composição básica, podem ser classificados como carotenos ou xantofilas. São classificados como carotenos aqueles que possuem em sua composição apenas átomos de carbonos e hidrogênios, como o  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno. Já como xantofilas são classificadas aqueles que apresentam pelo menos um átomo de oxigênio em sua cadeia, a exemplo da luteína e da zeaxantina (STAHL & SIES, 2005).

Os carotenoides possuem propriedades antioxidantes, atuando na eliminação de espécies reativas de nitrogênios, oxigênio molecular singlete e peróxidos, formados como subprodutos do metabolismo aeróbico normal e aumentados sob condições estressantes e patológicas (STAHL & SIES, 2005). Essas espécies reativas causam danos a lipídeos e proteínas do ácido nucléico (DNA), comprometendo o funcionamento e viabilidade celular, os quais podem promover uma cascata de reações que podem ser um fator causador no desenvolvimento de doenças crônicas e degenerativas, como o câncer, diabetes, artrite e infecções (PRIOR, 2014).

Estudos vêm relatando o potencial efeito protetor dos carotenoides luteína e zeaxantina contra a degeneração macular (DAM) relacionada. Esses carotenoides são responsáveis pela pigmentação da mácula lútea, localizada na retina, a qual possui membranas que contêm ácidos graxos poliinsaturados que são passíveis de fotooxidação, e possivelmente a luteína e a zeaxantina exercem um papel protetor contra essa oxidação (BERNSTEIN *et al.*, 2016).

Os carotenoides também são reconhecidos pela sua atividade provitamina A, atividade essa conferida pelos grupos de carotenoides que possuem em sua estrutura molecular pelo menos um anel- $\beta$  não substituído, e com uma cadeia poliênica de no mínimo 11 carbonos. O  $\beta$ -caroteno apresenta 100% de atividade provitamina A por possuir dois anéis- $\beta$  não substituídos, basicamente o  $\beta$ -caroteno pode dar origem a duas moléculas de vitamina A. Já o  $\alpha$ -caroteno apresenta 50% da atividade provitamina A. Por conseguinte, os carotenoides

podem auxiliar no suprimento de vitamina A, sendo o  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -caroteno, cujas estruturas são apresentadas na Figura 1, os mais conhecidos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).



**Figura 1-** Estrutura química dos pigmentos  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -caroteno

Para conversão dos carotenoides provitamínicos em retinol é utilizado o conceito Equivalente Atividade do Retinol, no qual 1 RAE corresponde a 1  $\mu\text{g}$  de retinol ou 12  $\mu\text{g}$  de betacaroteno ou 24  $\mu\text{g}$  de outros carotenoides provitamínicos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

No entanto, nem todo carotenóide ingerido é absorvido, pois esta depende de fatores como a matriz alimentícia original, processamento do alimento, concentração e tipo dos carotenoides e lipídeos consumidos (SAVIA-TRUJILLO *et al.*, 2013). A bioacessibilidade dos carotenoides consiste na quantidade de carotenóide ingerido que é liberado da matriz do alimento e incorporado no trato gastrointestinal que se torna disponível para ser absorvido (RODRIGUEZ-AMAYA, 2015). Os carotenoides, ao serem liberados da matriz do alimento, são solubilizados em micelas formadas de lipídeos coingeridos, micelas essas que transportam os carotenóides para as células do epitélio onde serão absorvidos. Os carotenoides também já podem estar solubilizados na própria gordura da matriz alimentícia (SAVIA-TRUJILLO *et al.*, 2013), o que ressalta a importância da coingestão de lipídeos para a absorção dos carotenoides.

Devido as suas propriedades provitamina e antioxidantes, os carotenoides têm despertado bastante interesse (SAINI *et al.*, 2015), principalmente no desenvolvimento de produtos alimentícios enriquecidos com compostos bioativos e com apelo de saudabilidade, tornando-se uma linha importante de investigação no campo das ciências dos alimentos (BONILLA *et al.*, 2015).

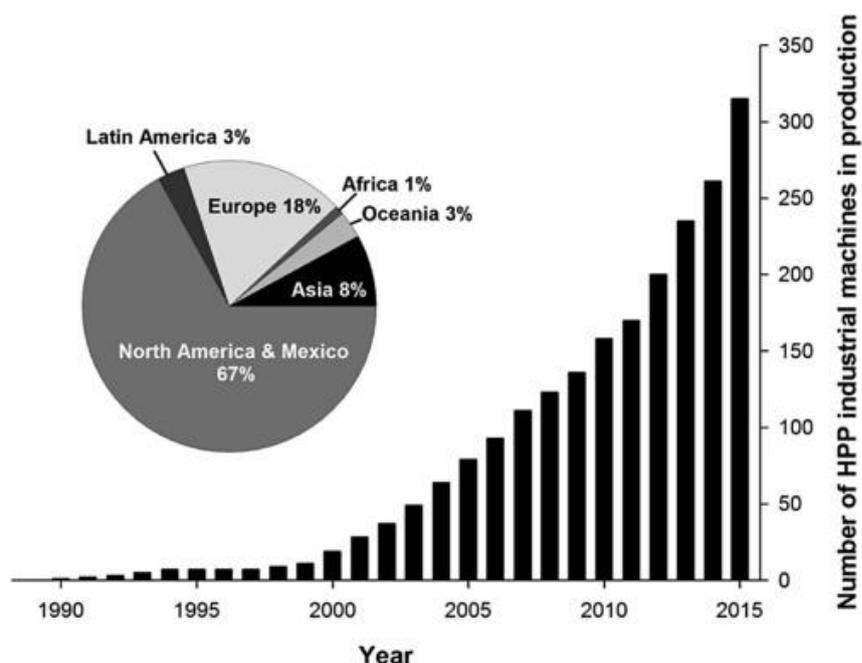
Nesse sentido, há necessidade e demanda para desenvolver novos produtos alimentícios, a exemplo de queijos enriquecidos com substâncias que apresentam propriedades bioativas, como os carotenoides. Os queijos são alimentos versáteis, além de nutritivos, ricos em proteína, cálcio e fósforo, podendo ser utilizados para consumo direto, ou como ingrediente. Essa versatilidade proporciona estratégias que os tornam com grande potencial para veicular substâncias benéficas à saúde (SOBRAL *et al.*, 2014).

## 2.4 Alta Pressão Hidrostática

Com o intuito de estender a validade comercial impactando minimamente nas características nutricionais, sensoriais e especificações intrínsecas do produto, as novas tecnologias de processamento de alimento começaram a surgir há mais de duas décadas atrás. No entanto, apesar de alguns avanços tecnológicos ao longo desse período, limitações como o alto custo de investimento, controle incompleto das variáveis relacionadas à operação do processo e a falta de regularização retardaram uma implementação maior dessas tecnologias em escala industrial (JERMANN *et al.*, 2015).

Entre as novas tecnologias, as mais difundidas são alta pressão, campo elétrico pulsado, luz ultravioleta, aquecimento por microondas, radiação, aquecimento infravermelho, aquecimento ôhmico, ozônio, pressão e CO<sub>2</sub>, ultrassom de potência, plasma a frio e água eletrolisada. Essas novas opções de processamento também podem propiciar mais diversidade de produtos e processos mais competitivos e eficientes (JERMANN *et al.*, 2015).

A alta pressão é a tecnologia emergente mais implementada nas indústrias, tendo atingido em 2015 mais de 300 unidades de equipamentos comerciais em todo o mundo e sendo a América do Norte com maior quantidade de equipamentos comerciais (Figura 2) (HUANG *et al.*, 2017).



**Figura 2** - Números de unidades de equipamentos comerciais de alta pressão no mundo e sua distribuição continental. Fonte: HUANG *et al.*, (2017) adaptado de (HIPERBARYC, Burgos, Spain).

A utilização da alta pressão em alimentos foi primeiramente relatada por Hite em 1899, o qual observou o prolongamento da conservação do leite através da pressurização, surgindo assim um dos primeiros estudos com essa tecnologia na conservação de alimentos, a qual foi efetivamente adotada em nível comercial somente na década de 90 do século XX, no Japão, para conservação de frutas, sucos, bolos de arroz e lula (SMELT, 1998). Desde então, esta tecnologia vem se difundindo em outros países, em especial nos europeus e nos Estados

Unidos, com aplicação em diversos produtos como ostras, iogurtes, frutas, molhos para salada e presuntos (CHAWLA *et al.*, 2011).

A alta pressão hidrostática é um método de conservação não térmico que consiste em submeter alimentos a pressões entre 100 e 800 MPa, durante um determinado tempo que pode variar de um milésimo de segundo a mais de vinte minutos, associada ou não com a elevação da temperatura (FDA, 2014).

Esse método é baseado nos princípios de Le Chatelier e no princípio isostático. De acordo com o princípio de Le Chatelier, qualquer fenômeno compreendendo reações químicas, transição de fases ou mudanças na configuração molecular acompanhado por diminuição de volume é favorecido pelo aumento da pressão. Já o princípio isostático considera que a pressão é transmitida uniformemente e quase instantaneamente por todo o alimento, independente da sua massa, tamanho ou composição (CHEFTEL, 1995).

No processamento por alta pressão, o alimento embalado é carregado no vaso de pressão, a válvula de alívio é fechada e é bombeado um líquido de transmissão da pressão, para deslocar o ar. Após o término do tempo de processo, a válvula de alívio de pressão é aberta e a água utilizada para compressão expande e retorna à pressão atmosférica. O recipiente é aberto e o alimento embalado é removido, finalizando o processo (FDA, 2014).

Conforme mencionado anteriormente, o produto por inteiro é submetido ao mesmo tratamento, pois a pressão é transmitida uniformemente no alimento. Dessa forma, tamanho, forma e composição da embalagem não são variáveis condicionantes do processo. Apesar de a alta pressão hidrostática ser uma tecnologia não térmica, o aumento da pressão acarreta em um aumento adiabático da temperatura, em aproximadamente 3°C para cada 100 MPa elevado, dependendo da constituição do alimento (CHAWLA *et al.*, 2011). Em “Quesos Frescos”, Tomasula *et al.*, (2014) observaram um aumento de 3,6 °C para cada 100 MPa. Já Hnosko *et al.*, (2012) observaram um aumento de temperatura de 4°C para cada 100 MPa quando a temperatura inicial das amostras eram de 21°C, e atribuem esse aumento ao teor de gordura dos queijos, que possui menor calor específico do que a água, resultando em um maior aumento da temperatura.

O uso da alta pressão em lácteos é considerado uma ferramenta poderosa para desenvolver novos produtos mais seguros e de melhor valor nutricional e sensorial atendendo, assim, as novas exigências dos consumidores (CRUZ *et al.*, 2010).

Em queijos, há poucos produtos processados por alta pressão disponíveis no mercado, contudo, o uso dessa tecnologia tem se mostrado promissor no processamento de diversas variedades de queijos (MARTINEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2012). As aplicações da alta pressão nesse alimento vêm sendo estudada 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 (TOMASULA *et al.*, 2014).

#### **2.4.1 Efeito da alta pressão hidrostática na inativação de microrganismos**

A alta pressão hidrostática tem-se mostrado uma alternativa no controle de patógenos tóxicos e infecciosos encontrados em queijos tornando, assim, esses produtos microbiologicamente mais seguros e proporcionando o prolongamento de sua vida útil. Esta tecnologia pode atuar em um ou mais alvos nas células bacterianas (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012).

O processamento de alta pressão a partir de 50 MPa pode inibir a síntese proteica de microrganismos, em 100 MPa pode induzir a desnaturação parcial da proteína e em 200 MPa causar danos na membrana celular bem como nas estruturas internas das células. E a partir de 300 MPa pode causar a desnaturação de proteínas e enzimas irreversivelmente, levando a ruptura da membrana celular e a liberação de substâncias internas. No entanto, cada tipo de

micro-organismo pode responder diferente a este processamento devido suas características fisiológicas e seu grau de resistência a pressão (HUANG *et al.*, 2014). A fase de crescimento do micro-organismo também pode influenciar na eficiência do processo. Os micro-organismos na fase de crescimento são menos resistentes a pressão do que na fase estacionária. A matriz alimentícia é outro fator que pode interferir na taxa de inativação destes micro-organismos, pois, esta pode fornecer condições favoráveis para os micro-organismos repararem os danos causados pela aplicação da pressão (LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007).

A aplicação da alta pressão hidrostática em queijos tem demonstrado potencial para inativação de cepas de *L. monocytogenes* (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2012). Gallot-Lavallée (1998) estudou a eficiência da alta pressão na destruição de *L. monocytogenes* em queijos de cabra feitos com leite cru e verificou que tratamentos a 450 MPa por 10 minutos ou 500 MPa por 5 minutos reduziu 5,6 logarítmicos desse patógeno, sem afetar as características sensoriais do alimento. Arquez *et al.*, (2005) verificaram que após 60 dias de armazenamento dos queijos processados por alta pressão a 300 MPa durante 10 minutos a 10°C não foi detectado *L. monocytogenes*, enquanto no queijo controle foi encontrado 5,66 logarítmico ufc/g.

Contudo, a eficácia do processamento por alta pressão na destruição da *Listeria monocytogenes* depende de parâmetros como os níveis de pressão, tempo e temperatura. Envrendilek *et al.*, (2008) investigaram a aplicação da alta pressão hidrostática de 50 a 600 MPa por 10 minutos a 25°C na inibição da *L. monocytogenes* em queijos brancos turcos. Foi observado que as contagens de *L. monocytogenes* foram reduzidas conforme o aumento do nível da pressão, sendo a redução máxima (4,9 log ufc/g) alcançada com 600 MPa. Lopez-Pendemont *et al.*, (2007) constataram que pressões de 500 MPa a 20°C durante 10 minutos alcançaram reduções de quase 6 ciclos logarítmicos na população de *L. monocytogenes* em queijo logo após a pressurização. Analogamente, Linton *et al.*, (2008) que avaliaram utilização da pressão de 500 MPa durante 10 minutos a 20°C no queijo Camembert inoculado com de 2 e 4 ciclos logarítmicos ufc/mL de *L. monocytogenes*, não detectaram a presença desse microrganismo após 14 dias de armazenamento.

#### **2.4.2 Combinação da alta pressão com antimicrobianos naturais**

Os métodos combinados de conservação de alimentos consistem na utilização de parâmetros de diferentes obstáculos em conjunto, que podem atuar de maneira sinérgica para inibir ou retardar o crescimento microbiano, de forma que assegurem a estabilidade e qualidade microbiológica dos alimentos com tratamentos brandos, melhorando, assim, suas propriedades sensoriais e nutricionais (CHIRIFE & FAVETO, 1992).

A utilização da alta pressão hidrostática combinada com outros métodos de conservação pode possibilitar reduções nos níveis de pressão para inativar um determinado micro-organismo, resultando em tratamentos mais suaves e evitando efeitos negativos em alimentos mais sensíveis, reduzindo, também, os custos do processo (EVRENDILEK & BALASUBRAMANIAM, 2011; GAYAN *et al.*, 2012).

Os compostos antimicrobianos obtidos de fontes naturais como os óleos essenciais, extratos vegetais, ácidos naturais, bacteriocinas e bacteriófagos competitivos têm sido propostos para utilização com a alta pressão para melhorar as taxas de inativação de microrganismos patogênicos e deteriorantes (OLIVEIRA *et al.*, 2015), pois esses compostos podem atuar como um obstáculo adicional ou sinérgico contra esses micro-organismos (BLEOANCĂ *et al.*, 2016).

O processamento de alta pressão hidrostática e os antimicrobianos naturais atuam de forma semelhante nas estruturas das células e podem ter efeito sinérgico na inativação dos micro-organismos (GÁYAN *et al.*, 2012). Níveis brandos de pressão (por volta de 200 MPa)

podem ocasionar danos à membrana celular dos micro-organismos que, embora não sejam letais às células, podem causar rupturas e aumento da permeabilidade de compostos não específicos (HUANG *et al.*; TOMASULA *et al.*, 2014), tornando essas células possivelmente mais permeáveis e susceptíveis à ação dos antimicrobianos naturais (GAYÁN *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Arquéz *et al.*, (2005), o uso de alta pressão de 300 MPa por 10 minutos e bacteriocinas promoveu uma maior redução na contagem de *L. monocytogenes* Scott A durante a maturação de queijo, em comparação com o tratamento somente de alta pressão. Desse modo, a contagem no 3º dia de armazenamento correspondia a 6,13 ufc/g para o queijo somente pressurizado e a 3,83 ufc/g para o queijo pressurizado contendo bacteriocinas, e no 60º dia de armazenamento o queijo somente pressurizado apresentava 3,48 ufc/g enquanto no pressurizado contendo bacteriocinas correspondia a 1 log ufc/g. Evrendilek & Balasubramanian (2011) relataram que a combinação de óleo essencial de hortelã com o processo de alta pressão hidrostática proporcionou a redução do tempo e da metade do nível de pressão necessária para obter a mesma inativação de *Listeria monocytogenes* em iogurte do que com o tratamento apenas com a alta pressão (de 600 MPa por 5 minutos para 300 MPa por 3,5 minutos). Bleonca *et al.*, (2016) avaliaram o efeito da utilização combinada da alta pressão hidrostática (300 MPa por 2 minutos a 22°C) com óleo essencial de tomilho em queijos frescos e observaram que a utilização desse antimicrobiano natural elevou a taxa de inativação para 5 log ufc/g, comparado com a inativação de 1,5 log ufc/g pelo uso individual da alta pressão.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Material

O leite pasteurizado integral (3,0% m/m de gordura) (Cooperativa Mista de Valença, Rio de Janeiro, Brazil) e as cenouras destinadas à fabricação do queijo foram adquiridos em um comércio localizado no Rio de Janeiro e armazenado em 4°C até a realização do processamento. Os aditivos utilizados foram: coagulante (marca Christian Hansen®, 75 IMCU), cloreto de cálcio e ácido láctico (marca Ricanata®) e NaCl da (marca Cisne®).

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1 Formulação do queijo

A Tabela 1 a seguir mostra a formulação básica do queijo Minas Frescal incorporado com cenoura, utilizada no estudo.

**Tabela 1-** Formulação do queijo tipo Minas Frescal incorporado com cenoura

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
Leite	1L
Cenoura	0; 30; ou 60g
Sal	15* ou 25g
Coagulante	1mL
Cloreto de cálcio	400µL
Acido Láctico	100µL

\*Concentração adotada para os experimentos envolvendo pressão com base em testes sensoriais preliminares (4.1).

#### 3.2.2 Processamento do queijo minas frescal incorporado com cenoura

Para a fabricação do queijo Minas Frescal, foram utilizados 1L de leite pasteurizado e padronizado a 3,0% (m/m) de gordura, o qual foi incorporado com 3 ou 6% de cenoura previamente descascada em solução clorada 100 ppm por 20 minutos. Posteriormente, o leite com cenoura foi filtrado para a remoção do bagaço. Ao qual foi aquecido a 36°C e adicionado cloreto de cálcio, 400 µL/L. O leite utilizado foi então acidificado lentamente com ácido láctico, 0,85% (m/v), 100 µL/L de leite, de modo a aumentar a acidez. E então procedeu-se a coagulação, usando o coagulante (Christian Hansen®, poder coagulante 75 IMCU) na concentração de 1,0 mL/L de leite. O tempo de coagulação foi de 1 hora em estufa a 36°C (condições estas verificadas em testes preliminares o quais a massa de queijo incorporado com cenoura apresentava maior firmeza). Após a coagulação, a coalhada foi cortada lentamente, com facas de aço inox em cubos (1,5 de aresta) e deixada para repouso por 3 minutos. O processo de mexedura foi fixado em 20 após o início da mexedura da coalhada. A salga foi realizada nessa etapa com a adição de 1,5% de NaCl. Para os queijos destinados às análises sensoriais, a massa foi enformada em forma de Minas Frescal de 250 g, as quais foram deixadas em repouso para dessoramento e para a realização de uma viragem (após 1 hora). Os queijos então foram armazenados em câmara refrigerada a 4°C por 24 horas para dessoragem. Após esse período os queijos foram cortados, embalados a vácuo e pressurizados. Para as análises físico-químicas, microbiológicas e de carotenoides, com intuito de otimizar o tempo de processamento foi produzido os mini-queijos, desta forma, a

massa foi colocada em tubos falcon de 50 mL e centrifugada por 15 minutos a 4000 rpm. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante (soro) e os mini-queijos foram embalados a vácuo e pressurizados. É importante destacar que se esta adicionando mais água no leite com a incorporação da cenoura, levando a um desequilíbrio da relação proteína-água, com menor porcentagem de proteínas no leite e, conseqüentemente, uma pior coagulabilidade. Desta forma, foi necessário aumentar a quantidade de coagulante para 1 mL/L, em relação a concentração usual, e tempo de coagulação para 1 hora (tempo estimado do ponto de corte). Outro aspecto relevante é a correta higienização das cenouras e as boas práticas de fabricação empregadas, de forma a evitar uma possível contaminação do queijo. Em experimentos preliminares, a higienização das cenouras com solução clorada a 100 ppm por 20 minutos foi eficiente para redução da carga microbiana desse vegetal. No entanto, é necessário um rígido controle nas boas práticas de fabricação dos queijos incorporados com cenoura, caso não sejam pressurizados.

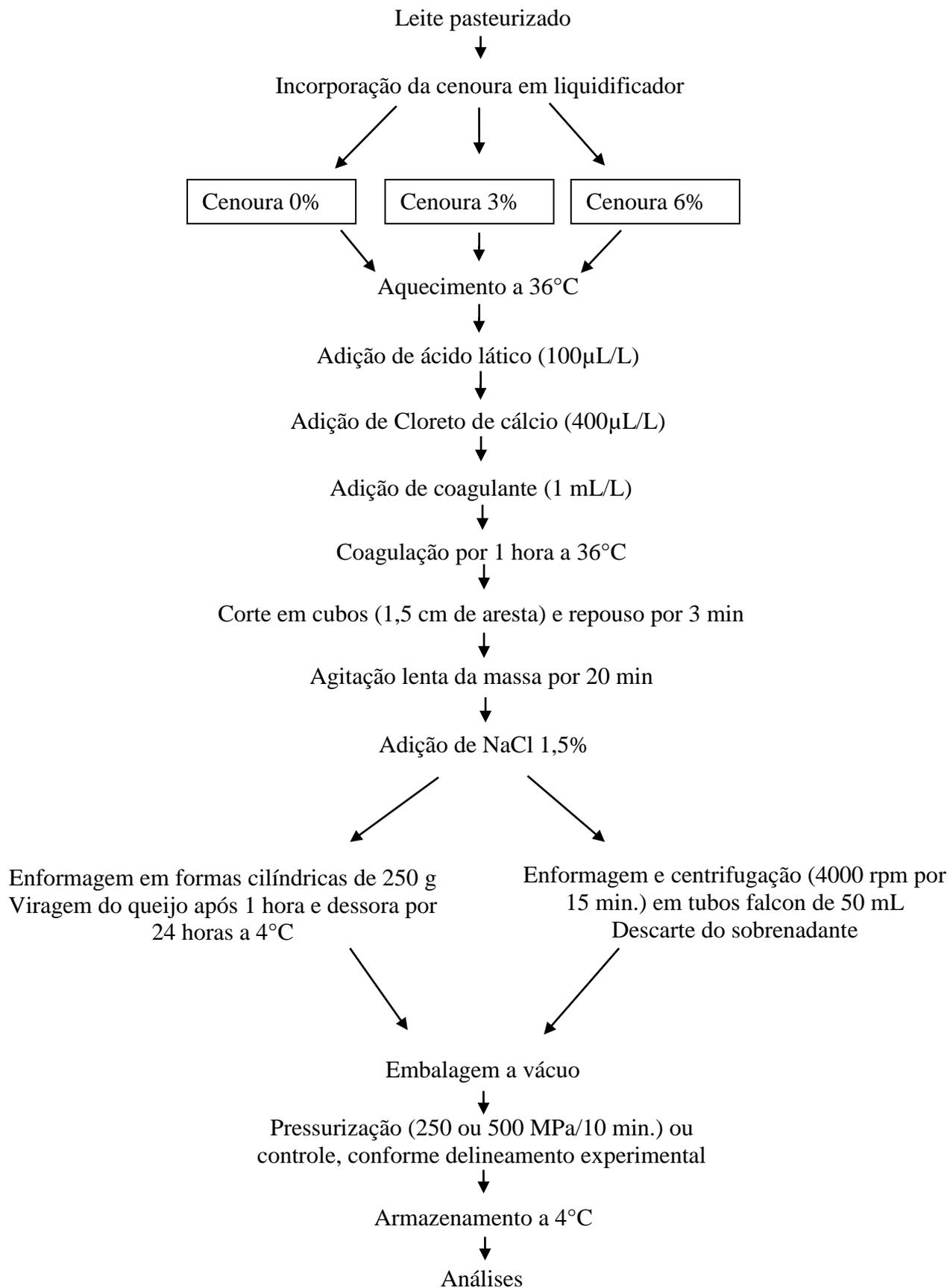
A Figura 3 apresenta algumas etapas do processamento do queijo Minas Frescal incorporado com cenoura.



**Figura 3-** Processamento do Queijo Minas Frescal com cenoura destinado à análise sensorial (A) Coagulação, (B) mexedura, (C) enformagem, (D) corte.

### 3.2.3 Fluxograma do queijo Minas Frescal

O fluxograma a seguir (Figura 4) apresenta o processamento do queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e tratado por alta pressão.



**Figura 4-** Fluxograma do processamento de queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou pressurizado.

### 3.2.4 Definição do teor de sal da formulação do queijo em relação aos níveis de cenoura com base em avaliação sensorial preliminar

Para definição do teor de sal a ser utilizado na formulação dos queijos incorporados de cenoura, foi realizado um teste sensorial com 8 avaliadores treinados, no qual foi avaliado a intensidade de sal e da cenoura nos queijos não pressurizados. Esse teste teve como objetivo definir o teor de sal ideal para as formulações bem como verificar a influência das concentrações de cenoura (3 e 6 %) na percepção do sal. As amostras testadas foram: A (1,5 % de sal e 6 % de cenoura); B (2,5 % de sal e 6 % de cenoura); C (1,5 % de sal e 3 % de cenoura); D (2,0 % de sal e 3 % de cenoura); E (2,5 % de sal e 3 % de cenoura).

### 3.2.5 Pressurização dos queijos

Os queijos previamente embalados foram pressurizados no equipamento de alta pressão hidrostática marca Stand Fluid Power modelo SF-L-850-9-W, Inglaterra, com câmara de pressão de 250 mL (Figura 5). As amostras foram pressurizadas em 250 e 500 MPa por 10 minutos a temperatura inicial ambiente, e o líquido utilizado como meio de pressurização foi álcool 70%. Os parâmetros de processo (Tempo, temperatura e nível de pressão foram selecionados com base na literatura (Lopez-Pendemont et al., 2014; Tomasula et al., 2014; Evert-Arriagada et al., 2014).



**Figura 5-** Equipamento de APH Stanted Fluid Power modelo S-FL-850-9-W, Inglaterra. (A) aberto (B) fechado. Fonte: LEAL (2010)

## 3.3 Planejamento Experimental

### 3.3.1 Avaliação do efeito do processamento por alta pressão nas características físicas, químicas e microbiológicas do queijo com cenoura

O delineamento do trabalho para avaliação do efeito do processamento por alta pressão nas características físicas, químicas e microbiológicas do queijo com cenoura seguiu um planejamento experimental fatorial  $2^2$  com 3 repetições do ponto central, conforme a Tabela 2. As variáveis independentes foram a pressão (0, 250 e 500 MPa) e o teor de cenoura misturado com o leite (0; 3 e 6 %). O tempo estipulado dos tratamentos por alta pressão foi de 10 min. As variáveis dependentes foram: composição físico-química, teor de carotenoides (carotenóides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno), cor instrumental e contagem de

*Listeria innocua* no queijo previamente inoculado e submetido ao processamento por alta pressão e analisado no tempo (1, 8, 15 e 22 dias).

**Tabela 2-** Planejamento experimental 2<sup>2</sup> utilizado nos experimentos para avaliação do efeito da alta pressão e/ou concentração de cenoura nas características físicas, químicas e microbiológicas do queijo

Ensaio	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
			Pressão (MPa)	Cenoura (%)
1	-1	-1	0	0
2	-1	+1	0	6
3	+1	-1	500	0
4	+1	+1	500	6
5	0	0	250	3
6	0	0	250	3
7	0	0	250	3

### 3.4 Quantificação dos Carotenoides totais, Luteína, $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno

As amostras de queijo (aproximadamente 80 gramas) foram homogeneizadas em graal e pistilo, em seguida foram pesadas 10 gramas de amostra homogeneizada, acondicionada em frascos âmbar e congelada até a realização da análise.

A extração dos carotenoides foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Rodriguez-Amaya (2001). A amostra homogeneizada foi macerada com acetona (Tedia®) e celite (Tedia®) com pistilo e filtrado a vácuo em funil de vidro com placa sinterizada acoplada ao Kitassato. Procedeu-se essa operação até a amostra ficar despigmentada. Após esta etapa, o extrato de carotenoides obtido foi transferido para um funil de separação de 500 mL contendo 30 mL de éter de petróleo grau HPLC (Tedia®), e procedeu-se a lavagem com água ultrapura até o extrato ficar límpido. Posteriormente, transferiu-se o extrato para um balão volumétrico âmbar de 50 mL através de um funil de vidro contendo uma camada fina de lã de vidro e sulfato de sódio anidro P.A. e avolumou-se com éter de petróleo. Em seguida, foi realizada a leitura por espectrofotometria na região do visível, em comprimento de onda de 450 nm, utilizando éter de petróleo como branco. A faixa de absorvância utilizada foi de 0,2 a 0,8, onde as leituras acima de 0,8 foram precedidas de diluição de 1:1 com éter de petróleo para a determinação dos carotenoides totais, de acordo com a equação a seguir:

$$\text{concentração } (\mu\text{g}/100) = \frac{\text{Abs.} \times \text{Dil.} \times \text{Vol.} \times 10000}{2592 \times \text{Ma.}}$$

Onde: Abs = valor da leitura de absorvância

Dil. = fator de diluição do extrato

Vol. = volume do balão volumétrico (mL)

Ma. = Massa da amostra em (g)

Em seguida, a luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno foram determinados a partir da transferência de alíquotas do extrato para um frasco de vidro. O volume das alíquotas foi retirado de acordo com a absorvância obtida (Tabela 3).

**Tabela 3-** Relação da absorbância e volume das alíquotas

Absorbância	Volume
0,20 a 0,3	5mL
0,31 a 0,4	4mL
0,41 a 0,5	3mL
0,51 a 0,8	2mL

Fonte: Pacheco et al., (2014)

As alíquotas foram secas com ar comprimido e ressuspendidas com a adição de 200 µg de acetona e agitação em vortex. Em seguida, a solução foi transferida para vial com redutor de volume e injetadas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando o cromatógrafo Walters® Modular composto por bomba 600, injetor automático 717 plus, com detector de arranjo de fotodiodos Walters® modelo 996 (varredura 300 a 500 nm com quantificação em 450 nm), software Empower®, coluna YCM Carotenoid S-3 (250 x 4,6 mm; 3 µm), fluxo de 0,8 mL/min, volume de injeção de 15 µL, modo de eluição por gradiente usando como fase móvel metanol: éter-terc-butil (80:20) e tempo de corrida de 20 minutos. Utilizou-se a curva analítica de acordo com metodologia Pacheco *et al.*, (2014).

### 3.5 Análise Instrumental da Cor

A coloração dos queijos foi determinada por reflectância a partir de quatro pontos da amostra disposta em cubeta de quartzo de 10 mm utilizando-se o equipamento Color Quest XE, escala CIELAB e CIELCh, com abertura de 25mm de diâmetro, com iluminante D65/10. Sendo os parâmetros de CRO medidos: L\* = luminosidade (0 = preto e 100 = branco); a\* (-80 até zero = verde, de zero a +100 = vermelho); b\* (-100 até zero = azul, de zero a +70 = amarelo; C\* Chroma =  $(a^*2 + b^*2)^{1/2}$ ) define a intensidade ou saturação de cor, sendo definido pela distância do ângulo hue no centro do diagrama tridimensional. Valores próximos a zero são indicativos de cores neutras (branco e/ou cinza) e valores ao redor de 60 indicam cores vívidas e/ou intensas (FERNANDES *et al.*, 2010); h° ângulo hue =  $\arctan(b^*/a^*)$  mostra a localização da cor em um diagrama tridimensional, onde o ângulo 0° representa o vermelho puro, o 90° representa o amarelo puro, o de 180° o verde puro e o 270° o azul (MCGUIRE, 1992).

### 3.6 Análises Físico-químicas

Para caracterização físico-química das amostras foram realizadas a composição centesimal dos queijos em duplicatas.

A umidade foi realizada de acordo com o método Termo Gravimétrico, a 70°C com areia (Método: 931.04, conforme a AOAC, 2010).

O resíduo Mineral Fixo foi determinado pela destruição da matéria orgânica por queima em mufla a 550°C, e pesagem do resíduo obtido de acordo com o Método: 923.03 (AOAC, 2010).

A gordura foi realizada no aparelho Extrator Automático de Gordura da Ankon. Método oficial da AOCS (2005).

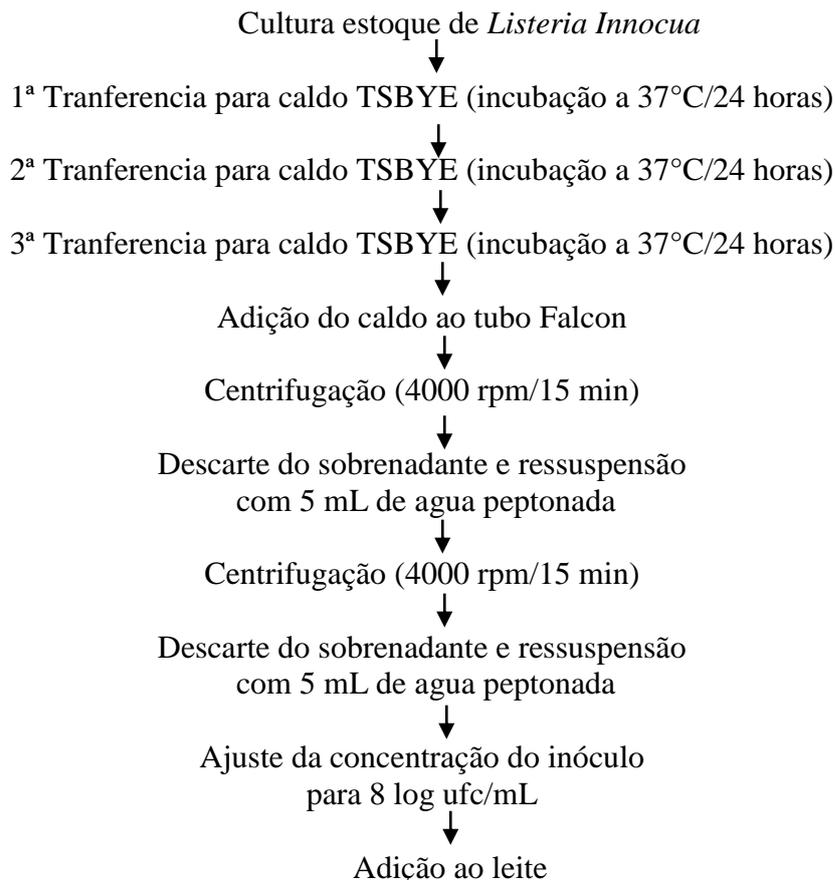
A proteína foi obtida da determinação do nitrogênio protéico, segundo o método utilizado método Kjeldahl. Consistiu na digestão da amostra com ácido sulfúrico concentrado até que o carbono e o oxigênio fossem oxidados. O nitrogênio da proteína foi então reduzido e transformado em sulfato de amônia em um volume conhecido de ácido bórico. O borato de amônia formado foi dosado com ácido sulfúrico 0,05M. O valor de nitrogênio foi obtido pela

multiplicação por valor específico que para a matriz queijo é adotada como 6,38, para ser transformado no valor da respectiva proteína de acordo com o método 2001.11 modificado da AOAC (2010).

### 3.7 Análises Microbiológicas

#### 3.7.1 Preparo do inóculo de *Listeria innocua* e inoculação no queijo Minas Frescal

O fluxograma (Figura 6) a seguir apresenta as etapas do preparo do inóculo.



**Figura 6-** Fluxograma do preparo do inóculo de *Listeria innocua* para inoculação no queijo.

A cultura estoque de *Listeria innocua* ATCC 33090 foi preparada através do repique das cepas em Agar tripcase de soja (TSA) (BD®) com 0,6 % extrato de levedura (BD®) em tubo inclinado e incubado a 37°C por 24 horas, e posteriormente armazenada a 4°C. Para o preparo do inóculo, as cepas foram transferidas com a alça de inoculação da cultura estoque para um tubo contendo 18 mL de TSBYE (caldo tripcase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (BD®) e incubadas a 37°C por 24 horas. Procedeu-se mais duas transferências para tubo TBYE consecutivas com a mesma alça de inoculação.

Após as três transferências, o caldo TSBYE foi colocado no tubo falcon e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e adicionado 5 mL de água peptonada 0,1 % ao precipitado. Essa operação foi realizada duas vezes e, então, a massa celular purificada foi ressuspensa e ajustada para um volume final de 10 mL com água peptonada 0,1 %, de modo a obter-se um inóculo com concentração de aproximadamente 8 log

ufc/mL, a sendo posteriormente verificada pelo Densimat e pelo plaqueamento por superfície em TSA.

Em seguida, em capela com fluxo laminar, o inóculo de 10 mL (concentração de aproximada de 8 log) foi adicionado no leite previamente incorporado com cenoura e aquecido a 36°C, mexendo-se a mistura de modo a distribuir o inóculo completamente, sendo então adicionado o cloreto de cálcio, ácido láctico e o coagulante. Posteriormente, foram realizadas as demais etapas para o preparo (item 3.2.3) e armazenamento do queijo em condições de abuso (8°C por até 22 dias). O fluxograma acima (Figura 6) apresenta as etapas do preparo do inóculo.

### **3.7.2 Contagem da população de *Listeria innocua***

As amostras foram preparadas de acordo com a metodologia descrita por Marshall (1992), na qual 11 gramas de queijo foram diluídos com 99 mL de água peptonada 0,1 % em saco plástico flexível e homogeneizado em Stomacker por 2 minutos. Quando necessário, o tempo de homogeneização foi aumentado até a completa emulsificação da amostra. Foi realizada uma diluição seriada até  $10^{-5}$  em água peptonada e 0,1 mL de cada diluição foi espalhada em superfície em placas de Agar Seletivo para *Listeria* (Oxoid) com Suplemento Seletivo para *Listeria* (Sigma). As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 48 horas de acordo com a metodologia adaptada de Lopez-Pendemonte *et al.*, (2007). Manualmente, foram contadas as colônias características de *Listeria*. As análises de *Listeria* foram realizadas no dia posterior ao processamento, oitavo, décimo quinto e vigésimo segundo dia.

## **3.8 Análise Sensorial**

### **3.8.1 Levantamento de atributos**

O levantamento dos termos utilizados no questionário CATA foi realizado por meio da apresentação de quatro amostras de queijos incorporados com cenoura, com ou sem pressurização, a nove avaliadores não treinados, objetivando levantar o maior número de características sensoriais relacionado à textura, sabor, aparência e aroma. No dia da análise, as amostras, cortadas em cubos e acondicionadas sob refrigeração previamente à avaliação, foram servidas em copos plásticos de polietileno. A líder da sessão perguntou aos provadores sobre as características que melhor descreviam os produtos a serem avaliados e instruiu como iriam provar cada amostra. Das características descritas relacionadas às amostras, foram selecionados dezoito atributos descritos a seguir: sabor de cenoura, adocicado, pouco sal, macio, sabor suave, textura firme, sabor agradável, aroma característico de queijo, aroma suave, partículas de cenoura, borrachudo, aparência uniforme, cor alaranjada, cor amarelo intenso, cor amarelo claro, superfície lisa, sabor residual, quebradiço.

### **3.8.2 Aceitação global e questionário CATA**

A aceitação global e os atributos sensoriais dos queijos Minas Frescal incorporados com cenoura e/ou processados por alta pressão foi realizada na Embrapa Agroindústria de Alimentos com 102 consumidores recrutados no local. As amostras foram servidas em temperatura de refrigeração e porcionadas em torno de 10 gramas e colocadas em copos plásticos codificadas com três dígitos.

Foram apresentadas aos participantes as seguintes amostras: queijo não pressurizado e sem adição de cenoura (NPSC); queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. sem cenoura (APH250SC); queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura (APH500SC); queijo não

pressurizado com 3% de cenoura (NPC3); queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura (APH250C3); queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 3% de cenoura (APH500C3); queijo não pressurizado com 6% de cenoura (NPC6); queijo pressurizado com 6% de cenoura (APH250C6); queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura (APH500C6).

Após receber as amostras codificadas os provadores foram convidados a avaliar a aceitação global das amostras através de uma escala Hedônica de 9 pontos, variando entre 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo), conforme a metodologia descrita por Stonen e Silden (1993). E, em seguida, responderam a um questionário *check-all-that-apply* (CATA), que continha os 18 termos previamente levantados (item 3.8.1), em que os consumidores tinham que marcar todos que julgavam apropriados para a amostra. O questionário CATA consiste de uma lista de palavras ou frases que são apresentadas ao consumidor para que estes possam escolher as que melhor descrevam o produto, permitindo entender a maneira que o consumidor percebe as características do produto (ARES et al., 2010). Este teste foi selecionado por ser uma metodologia considerada de baixo custo, rápida, fornece informações sobre as características sensoriais de acordo com o ponto de vista do consumidor e tem sido bem sucedida na utilização para desenvolvimento de produtos.

Os consumidores também responderam perguntas sócias econômicas e em relação ao consumo de queijo Minas Frescal conforme o Anexo1. A coleta dos dados foi realizada por meio do software FIZZ.

### **3.8.2 Análise estatística**

As notas da aceitação dos queijos foram analisadas através de análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância, considerando amostra como fonte de variação e consumidores como efeito aleatório. Com o intuito de analisar os dados afetivos considerando a resposta individual de cada consumidor e não apenas a média, os dados de aceitação foram, também, analisados pelo Mapa de Preferência Interno.

A análise de agrupamento (Cluster) foi utilizada com a finalidade de identificar os segmentos de consumidores com diferentes padrões de preferência, considerando a distância Euclidiana e agregação de Ward. A análise de correspondência (AC) foi utilizada para obter uma representação das amostras e a relação entre as mesmas e os termos das questões CATA. A frequência de utilização de cada atributo sensorial foi determinada por contagem do número de consumidores que utilizaram este termo para descrever cada amostra. Teste Q de *Cochran* foi aplicado para identificar diferenças significativas entre as amostras para cada um dos termos incluídos na questão CATA.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

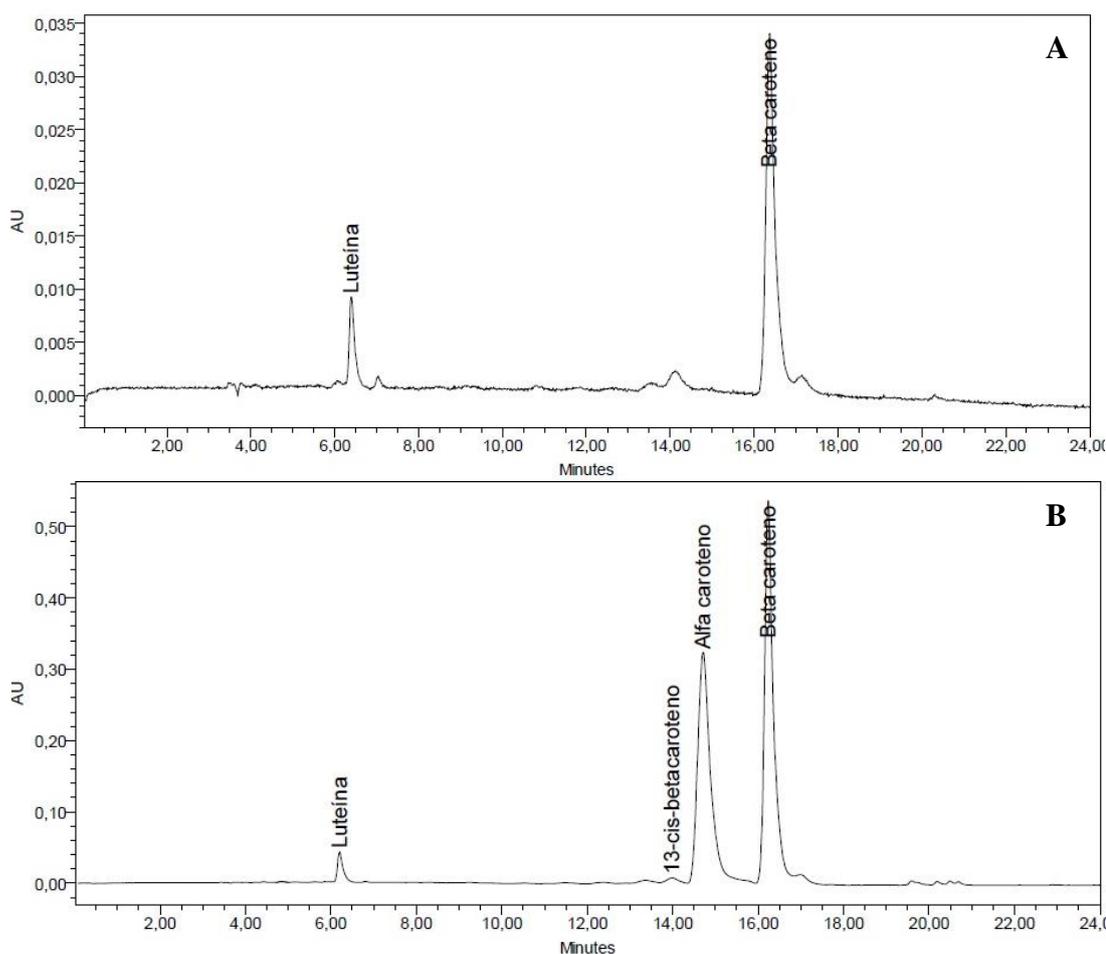
### 4.1 Teor de Sal da Formulação do Queijo em Relação aos Níveis de Cenoura

A Tabela 5 apresenta o resultado da análise sensorial realizada para definição do teor de sal empregado na formulação do queijo com cenoura, compreendendo a descrição efetuada pelos avaliadores das diferentes amostras.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5 o teor de sal 1,5 % foi o mais adequado para os queijos formulados com 3 e 6 % de cenoura. No qual as formulações contendo 1,5 % de sal (A e C) obtiveram respostas que variaram de pouco sal a ideal, enquanto as formulações com 2 e 2,5 % de sal foram avaliadas pela maioria como salgada a muito salgada. A intensidade da cenoura não mascarou o teor de sal. Dessa forma, o teor de sal adotado para a formulação do queijo foi de 1,5%.

### 4.2 Efeito da Alta Pressão no Teor de Carotenoides Totais, Luteína, $\alpha$ -caroteno e $\beta$ -caroteno.

Na Figura 7 são apresentados os cromatogramas revelando os carotenoides encontrados no queijo Minas Frescal (sem incorporação de cenoura e sem pressurização) e no queijo Minas Frescal incorporado com 6% de cenoura.



**Figura 7** - Cromatograma dos carotenoides presentes no (A) Queijo Minas Frescal e no (B) incorporado com 6% de cenoura.

**Tabela 4- Avaliação sensorial da intensidade do sal e do teor de cenoura dos queijos tipo Minas Frescal**

<b>Provedores</b>	<b>Amostra A</b> (1,5 % de sal e 6 % de cenoura)	<b>Amostra B</b> (2,5 % de sal e 6 % de cenoura)	<b>Amostra C</b> (1,5 % de sal e 3 % de cenoura)	<b>Amostra D</b> (2,0 % de sal e 3 % de cenoura)	<b>Amostra E</b> (2,5 % de sal e 3 % de cenoura)
1	Menos salgado Gosto suave de cenoura	Muito salgado Sem sabor de cenoura	Salgado Sem sabor de cenoura	Muito salgado Sem sabor de cenoura	Muito salgado Sem sabor de cenoura
2	Mais salgado que o ideal Sabor de cenoura fraco	Teor de sal ideal Sem sabor de cenoura	Sal ideal Sabor de cenoura fraco	Teor de sal ligeiramente maior que o ideal Sabor de cenoura não perceptível	Mais salgado que o ideal Sem sabor de cenoura
3	Pouco salgado Pouco sabor de cenoura	Salgado ideal Presença de cenoura	Pouco salgado Leve presença de sabor de cenoura	Pouco salgado Pouco sabor de cenoura	Salgado ideal Leve sabor de cenoura
4	Pouco sal Muita cenoura	Muito salgado Muita cenoura	Menos salgado Sem sabor de cenoura	Muito sabor de cenoura Salgado	Muito salgado Pouco sabor de cenoura
5	Inosso Sem gosto de cenoura	Pouco sal Presença de sabor de cenoura perceptível	Inosso	Pouco sal Sabor de cenoura perceptível	Pouco sal Sabor de cenoura não perceptível
6	Sal ideal Cenoura ideal	Muito salgado Pouca percepção da cenoura	Sal ideal Pouca percepção de cenoura	Salgado Pouca percepção de cenoura	Muito salgado Pouca percepção da cenoura
7	Pouco sal Sabor cenoura mais pronunciado	Salgado Cenoura (sal mascarou o sabor)	Sal ideal Pouco sabor de cenoura	Levemente salgado Sabor cenoura suave	Salgado Sabor cenoura não perceptível
8	Pouco sal Muita cenoura	Muito sal Pouca cenoura	Teor de sal ideal Pouca cenoura	Muito sal Cenoura ideal	Muito sal Pouca cenoura

Fica evidente na Figura 7 (A e B) a acentuada elevação de  $\alpha$ -caroteno com a incorporação de cenoura, a despeito de ter também ocorrido elevação nos teores de  $\beta$ -caroteno, luteína e carotenoides totais, conforme mostrado pela Tabela 6, que também apresenta as amostras pressurizadas com e sem incorporação de cenoura, conforme discutido posteriormente.

Desse modo, observa-se pela Tabela 5 que, conforme esperado, a porcentagem de cenoura teve efeito significativo na concentração de carotenóides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno para o planejamento proposto.

**Tabela 5-** Média dos teores de carotenoides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno nos queijos tipo Minas frescal incorporados com cenoura e/ou processados por alta pressão

Tratamentos (Pressão/Cenoura)	Carotenoides Totais $\mu\text{g}/100\text{g}$	Luteína $\mu\text{g}/100\text{g}$	$\alpha$ -caroteno $\mu\text{g}/100\text{g}$	$\beta$ -caroteno $\mu\text{g}/100\text{g}$
NPSC	201,5 $\pm$ 3,54 <sup>a</sup>	21 $\pm$ 0 <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	156,5 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>
NPC6	2521,5 $\pm$ 88,39 <sup>b</sup>	64 $\pm$ 1,41 <sup>b</sup>	1110 $\pm$ 41,01 <sup>b</sup>	1249,5 $\pm$ 28,99 <sup>b</sup>
APH500SC	109,5 $\pm$ 4,95 <sup>a</sup>	10,5 $\pm$ 0,71 <sup>c</sup>	ND <sup>a</sup>	90 $\pm$ 2,83 <sup>c</sup>
APH500C6	1804 $\pm$ 24,04 <sup>c</sup>	72 $\pm$ 1,41 <sup>d</sup>	683,5 $\pm$ 9,19 <sup>c</sup>	992 $\pm$ 8,49 <sup>d</sup>
APH250C3	1525,5 $\pm$ 38,89 <sup>d</sup>	49,5 $\pm$ 0,71 <sup>e</sup>	668 $\pm$ 15,56 <sup>c</sup>	754,5 $\pm$ 12,02 <sup>e</sup>
APH250C3	1108 $\pm$ 18,38 <sup>e</sup>	41,5 $\pm$ 0,71 <sup>f</sup>	427,5 $\pm$ 10,61 <sup>d</sup>	609 $\pm$ 5,66 <sup>f</sup>
APH250C3	1136 $\pm$ 35,36 <sup>e</sup>	37,5 $\pm$ 3,54 <sup>f</sup>	449 $\pm$ 14,14 <sup>d</sup>	619,5 $\pm$ 12,02 <sup>f</sup>

ND\* = Níveis não detectáveis

\*Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam entre si significativamente ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura. APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura;

Os produtos de origem animal, como os queijos, possuem baixos teores de carotenoides, porque os animais não os sintetizam e os obtêm através da alimentação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). No presente estudo, pode-se observar (Tabela 5) que o teor de carotenoides no queijo Minas Frescal controle (NPSC) apresentou 201,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de carotenoides totais, 21  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de luteína, 156,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno e não foi detectado nesta amostra o  $\alpha$ -caroteno. A incorporação de 6% de cenoura no queijo não pressurizado (NPC6) aumentou os níveis de carotenoides totais para 2521,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , a luteína para 64  $\mu\text{g}/100\text{g}$  e para 1110 e 1249  $\mu\text{g}/100\text{g}$  o teor de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno respectivamente.

O processamento por alta pressão a 500 MPa por 10 minutos no queijo sem incorporação de cenoura não reduziu significativamente o teor de carotenoides totais (109,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), luteína (10,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) e  $\beta$ -caroteno (90  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). O mesmo comportamento foi observado nos queijos pressurizados a 500 MPa e incorporados com 6% de cenoura, em que a aplicação da pressão reduziu o teor de carotenoides totais (1804  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ),  $\alpha$ -caroteno (668  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) e  $\beta$ -caroteno (992  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), com exceção da luteína que aumentou significativamente para (72  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ). Dois dos três pontos centrais, queijos pressurizados a 250 MPa e incorporados com 3% de cenoura não diferiram significativamente entre si, apresentando entre (1136-1108  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de carotenóides totais, (41,5-37,5  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de luteína, (449-427  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de  $\alpha$ -caroteno e (619-609  $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) de  $\beta$ -caroteno. Porém, o outro ponto central diferiu significativamente dos outros dois para todos os carotenoides, contendo teores maiores desses compostos. Esse resultado provavelmente pode ter ocorrido por uma variação no processamento ou erro de análise.

De forma geral, pode-se observar que a incorporação de ambas as concentrações de cenoura (3 e 6%) no queijo Minas Frescal não pressurizados ou pressurizados (250 e 500 MPa) apresentaram uma boa retenção de carotenoides, isso se deve principalmente porque esses compostos são lipossolúveis e são extraídos das fibras da cenoura pela gordura presente no leite, quando incorporado em liquidificador.

Os carotenoides vêm sendo relatados como benéficos a saúde, pois possuem propriedades antioxidantes capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio, os quais estão relacionados com desencadeadores de doenças crônicas e degenerativas (STAHL & SIES, 2005). Desta forma, a incorporação de cenoura no queijo incrementaria o consumo de carotenoides na dieta. O  $\beta$ -caroteno e o  $\alpha$ -caroteno também são considerados pro-vitâmicos podendo, assim, contribuir para o aumento de pro-vitamina A no queijo Minas Frescal.

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), “considera-se um alimento fortificado/enriquecido ou simplesmente adicionado de nutrientes todo alimento ao qual for adicionado um ou mais nutrientes essenciais contidos naturalmente ou não no alimento, com o objetivo de reforçar o seu valor nutritivo e/ou prevenir ou corrigir deficiências demonstradas em um ou mais nutrientes, na alimentação da população ou em grupos específicos da mesma” (BRASIL, 1998).

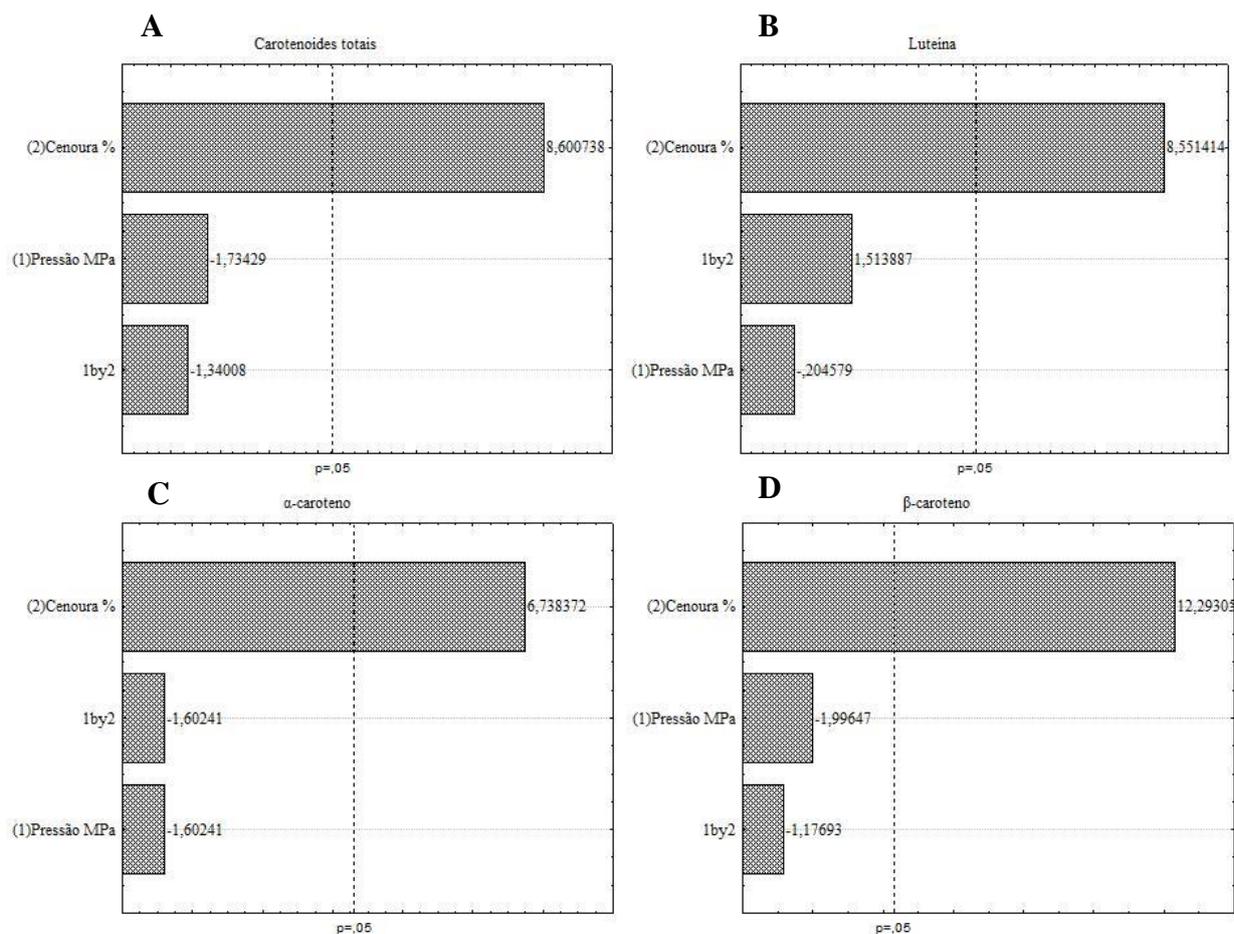
Ainda de acordo com a ANVISA, os alimentos adicionados de vitamina que forneçam no mínimo 15% da IDR de referência em 100 gramas no produto pronto para consumo, podem conter a alegação “Fonte”. Enquanto, os alimentos adicionados de vitaminas, que forneça no mínimo 30% da IDR de referência em 100 gramas no produto pronto para consumo, podem conter a alegação “Alto teor” ou “Rico” (BRASIL, 1998).

O queijo Minas Frescal, naturalmente, possui em média 161  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de retinol (sintetizada pelo organismo do animal e transmitida ao leite) (TACO, 2011), correspondendo a 20% da IDR da vitamina A, já podendo ser considerado Fonte desse nutriente. O queijo Minas Frescal, incorporado com 3% de cenoura e pressurizado a 250 MPa, supostamente conteria, além dos 20% de retinol já presentes no queijo, também a quantidade de retinol equivalente adicionados pela incorporação da cenoura. Como 1  $\mu\text{g}$  de retinol = 1  $\mu\text{g}$  de retinol equivalente = 12  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno ou 24  $\mu\text{g}$  de outros carotenoides provitaminicos, a incorporação de 3% de cenoura no queijo Minas Frescal resultou na adição de 609  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno e 427  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de  $\alpha$ -caroteno. Tal teor, quando convertido, resultou em 68  $\mu\text{g}/100\text{g}$  de retinol equivalente, em acréscimo a 161  $\mu\text{g}/100\text{g}$  do retinol já contido em média no queijo, fornecendo 229  $\mu\text{g}$  de vitamina A em uma porção de 100 g do produto, o qual corresponde a mais 9% da IDR. Desse modo, o produto poderia ser alegado como “Fonte” de vitamina A, assim como no caso do próprio queijo, porém no limite de ser considerados como “Ricos” ou com “Alto Teor”.

Por outro lado, os queijos incorporados com 6% de cenoura, não pressurizado ou pressurizados a 500 MPa, acrescentariam 14 a 19% de retinol equivalente no produto, e poderiam ser alegados de “Alto teor” ou “Rico” em vitamina A, pois 100 gramas do produto forneceria 39 e 34% da IDR de vitamina A.

Além de atuar como provitamina A, como já mencionado os carotenoides são considerados compostos bioativos, fornecendo benefícios extras à saúde além da nutrição básica. E como a incorporação de cenoura nos queijos aumentou significativamente o teor de carotenoides, o produto poderia ter um apelo diferencial de saudabilidade.

O apelo de saudabilidade e/ou o processamento por uma tecnologia de preservação mais branda poderiam ser um atrativo de inovação. Salienta-se que o acréscimo de custos variáveis poderiam ser embutidos no custo final do produto, aumentando em média somente R\$ 1,50 por quilo de queijo, com base em estudos envolvendo outros tipos de produtos (RASTOGI *et al.*, 2012). Lançamentos recentes de linhas de queijo Minas Frescal light e ou com embalagens com fácil abertura e que melhoram o acondicionamento do produto foi bem sucedidas no mercado, evidenciando que potencialmente os consumidores produto estariam dispostos a pagar mais por um produto inovador com valor agregado. No entanto, estudos com consumidores considerando tais aspectos devem ser realizados para confirmação de tais possibilidades.



**Figura 8-** Diagrama de Pareto sobre o efeito da alta pressão hidrostática e/ou incorporação de cenoura nos teores de carotenoides totais (A), luteína (B),  $\alpha$ -caroteno (C) e  $\beta$ -caroteno (D)

De acordo com o Diagrama de Pareto (Figura 8) e com a superfície de contorno (Figura 9), como esperado a incorporação de cenoura teve efeito significativo no teor de carotenoides totais, luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno no queijo Minas Frescal. A análise de variância do modelo é disponibilizada no Anexo 2.

De forma contrária, a alta pressão não apresentou efeito significativo sobre os teores de carotenoides, o que é extremamente relevante do ponto de vista tecnológico e nutricional. O baixo impacto desta nova tecnologia em compostos bioativos, como os carotenoides, polifenóis e ácido ascórbico vem sendo reportado na literatura (ANDRÉS *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2015).

A alta pressão hidrostática exerce efeitos mínimos em compostos de baixo peso molecular, em comparação com seu efeito sobre macromoléculas de polímeros orgânicos, decorrente do baixo impacto do processo nas ligações covalentes, associado com a baixa temperatura empregada no processamento (CHEN *et al.*, 2015). No entanto, é importante ressaltar que um dos três pontos centrais foi significativamente diferente e com valor superior aos outros dois e, possivelmente aumentou o erro puro e atenuou o impacto relativo mais pronunciado verificado nos outros pontos, mascarando o efeito da alta pressão bem como a interação nas amostras.

Pode-se observar na Figura 9 (A) que com a porcentagem de cenoura baixa, a influência da alta pressão no teor de carotenoides é mínima em termos relativos. Em contraposição, à medida que se aumenta a porcentagem de cenoura, o tratamento de alta pressão passa a ter maior influência e, apesar do método de conservação não ter efeito estatístico significativo para o

planejamento proposto, ocorreu uma diminuição no teor de carotenoides totais. Apesar de a alta pressão hidrostática ser uma tecnologia reconhecida pelos seus impactos mínimos nos alimentos, a utilização de parâmetros de processo mais extremos podem causar efeitos negativos, no entanto comumente de menor impacto quando comparados com os métodos de conservação térmicos. O aumento da pressão acarreta um aumento da temperatura adiabática que pode variar de acordo com a constituição do alimento, variando desde 3°C/100 MPa em alimentos com teores elevados de água, até 8°C em alimentos com teores elevados de gordura, aproximadamente (Balasubramaniam et al., 2008). Desse modo, em matrizes alimentícias com teores de gordura elevados, como os queijos, a temperatura adiabática pode implicar em um maior efeito térmico associado ao processo de alta pressão, notadamente a níveis maiores de pressão. Assim, os processamentos a 500 MPa no presente estudo pode ter contribuído para uma maior degradação térmica dos carotenoides.

No entanto, salienta-se que os resultados mostraram-se divergentes ao que vem sendo relatado na literatura (JACOBO-VELÁZQUEZ & BRENE; 2013, HUANG *et al.*; CARBONELL-CAPELLA *et al.*, 2013). Carbonell-Capella *et al.*, (2013) observaram que o aumento do nível de pressão (500 MPa) e tempo de processamento (15 minutos) aumentou o teor de carotenoides totais em uma bebida a base de frutas. Similarmente, Jacobo-Velázquez & Brene (2012) observaram um aumento no teor de carotenoides totais em pasta de abacate após o tratamento por alta pressão a 600 MPa por 3 minutos. O aumento no teor de carotenoides vem sendo explicado pela maior extração desses compostos ocasionada pela alta pressão hidrostática. Em vegetais, os carotenoides estão ligados a proteínas presentes na superfície da membrana celular, formando um complexo carotenoide-proteína, e o processamento a alta pressão pode modificar a estrutura dessas proteínas, facilitando a liberação dos carotenoides da matriz vegetal e levando a um aumento da extração (JACOBO-VELÁZQUEZ & BRENE, 2012).

Contudo, as diferentes matrizes alimentícias tornam difícil a comparação, havendo influência do tipo de alimento sobre a extração e preservação dos carotenoides e outros compostos funcionais decorrentes do processamento por alta pressão, bem como dos parâmetros do processo em si, como nível de pressão, tempo de pressurização e temperatura. Em uma smoothie produzido com leite desnatado e frutas e processado por alta pressão hidrostática a 600 MPa por 3 minutos e temperatura constante de 20°C foi observado um aumento significativo no teor de carotenoides totais (de 20,62 mg/mL na amostra não pressurizada para 22,57 mg/mL na amostra pressurizada). Um aumento no teor de carotenoides totais também foi reportado por Barba *et al.*, (2012) em uma bebida produzida com leite desnatado (20 %) e suco de laranja (50%), no qual o processamento por alta pressão a 400 MPa durante 9 minutos com temperatura final atingindo 32°C aumentou o teor de carotenoides totais de 0,066 mg/mL (amostra não pressurizada) para 0,084 mg/mL.

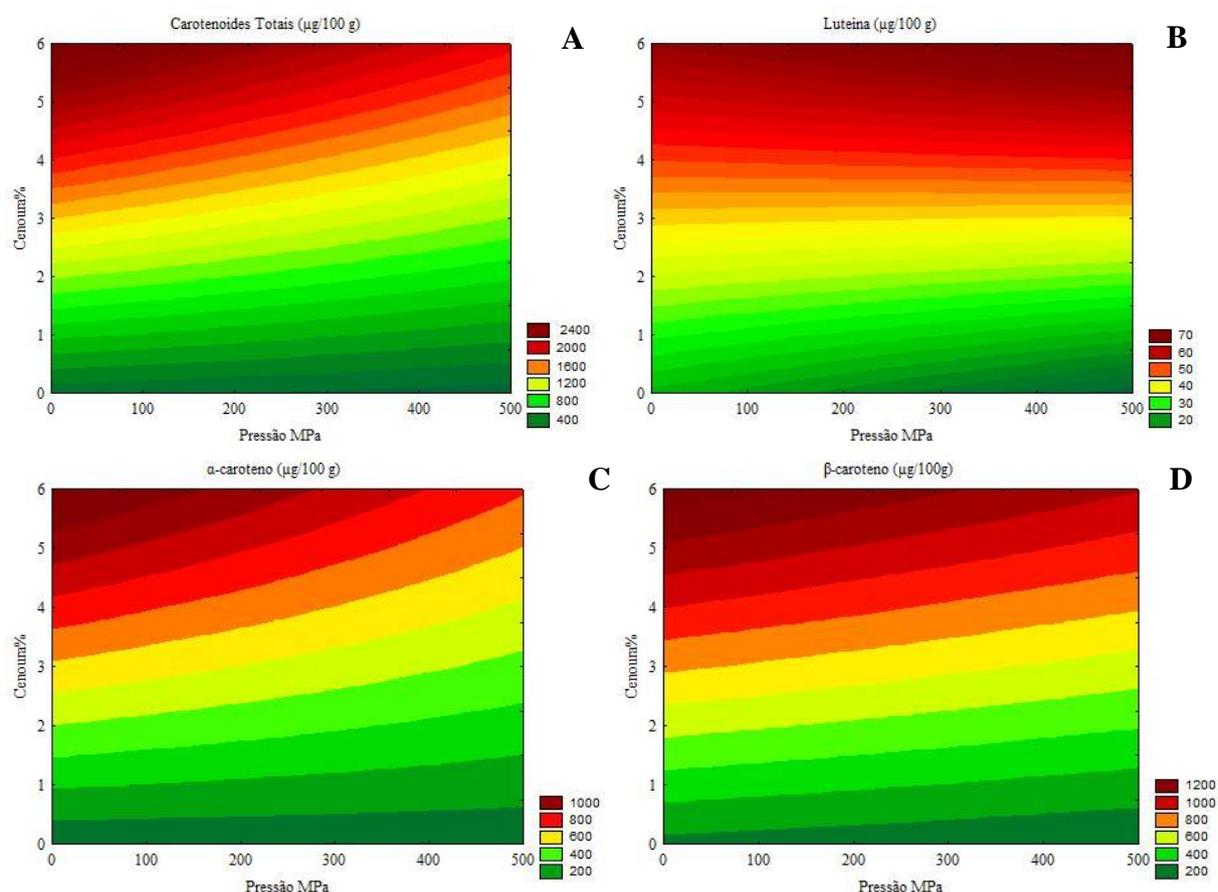
É importante enfatizar que no presente estudo foi utilizado o leite integral, ou seja, com 3% de gordura, ao contrario do comumente encontrado na literatura utilizando leite desnatado, e esta gordura presente no leite pode ter contribuído para a extração dos carotenoides da cenoura, independente da aplicação da alta pressão.

Comportamento similar foi observado para a Luteína, no entanto no maior nível de pressão (500 MPa) seu teor tendeu a um acréscimo (Figura 9B). Huang *et al.*, (2013) reportaram um decréscimo no teor de luteína em néctar de damasco pressurizado a 400 MPa por 10 minutos, de 6,22µ/L para 5,82 µ/L, enquanto Jacobo-Valaquez & Brene (2012) observaram um aumento de 40% no teor de luteína após a pressurização a 600 MPa por 3 minutos de pasta abacate. A luteína é um antioxidante natural e recentemente vem sendo associada na proteção de doenças oculares causadas pelo envelhecimento, como a catarata e a degeneração macular BERNSTEIN *et al.*, 2016).

Na Figura 9 (C e D) pode-se notar que conforme foi aumentada a porcentagem de cenoura, o aumento da pressão reduziu proporcionalmente o teor de α-caroteno e β-caroteno.

Andrés *et al.*, (2016) não observaram modificação significativa no teor de  $\alpha$ -caroteno em smoothie de frutas com leite desnatado pressurizado a 600 MPa por 3 minutos a 20°C, o qual apresentou 3,77 mg/100g nas amostra controle e 3,75 mg/100g, e um aumento significativo no teor de  $\beta$ -caroteno de 7,2 mg/100g na amostra controle para 9,02 mg/100g nas amostras pressurizadas. Em um smoothie de soja com frutas. Andrés *et al.*, (2016B) também observaram modificação significativa no teor de  $\alpha$ -caroteno em smoothie de soja com frutas pressurizado a 550 MPa por 3 minutos a 20°C, e observaram aumento de cerca de 10% no no teor de  $\beta$ -caroteno do produto processado a 450 MPa por 3 minutos a 20°C. Enquanto Jacobo-Valazquez & Brenes (2012) observaram um aumento de 284 % no teor  $\alpha$ -caroteno e de 107% no teor de  $\beta$ -caroteno em pasta de abacate processado por 600 MPa por 3 minutos.

Salienta-se que os resultados do presente estudo apresentaram o teor de carotenoides dos tratamentos após o processamento, no entanto considerando que esses compostos são sensíveis à degradação pela luz e oxigênio, seria interessante um estudo futuro para avaliar a estabilidade desses carotenoides ao longo da validade comercial do queijo.



**Figura 9-** Superfícies de contorno para (A) carotenoides totais, (B) luteína, (C)  $\alpha$ -caroteno e (D)  $\beta$ -caroteno em queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou pressurizados.

#### 4.3 Efeito da Alta Pressão na Cor Instrumental dos Queijos Incorporados com Cenoura e Pressurizados.

Na Tabela 6 e Figura 10 são apresentados a análise de variância e o Diagrama de Pareto do efeito do processamento por alta pressão e incorporação de cenoura nos parâmetros de cor.

**Tabela 6-** Efeito do teor de cenoura e/ou processamento por alta pressão nos parâmetros de cor instrumental (L\*, a\*, b\*, C\*, h) do queijo tipo Minas frescal

Tratamento	L*	a*	b*	C*	H
NPSC	97,31±0,17 <sup>a</sup>	-0,78±0,05 <sup>a</sup>	14,53±0,46 <sup>a</sup>	14,55±0,46 <sup>a</sup>	93,07±0,29 <sup>a</sup>
NPC6	90,44±0,42 <sup>b</sup>	11,55±0,45 <sup>b</sup>	26,06±1,81 <sup>b</sup>	28,52±1,6 <sup>b</sup>	66,03±1,94 <sup>b</sup>
APH500SC	96,78±0,25 <sup>a</sup>	-0,48±0,41 <sup>a</sup>	13,06±1,45 <sup>a</sup>	13,08±1,46 <sup>a</sup>	91,98±1,48 <sup>a</sup>
APH500C6	88,49±0,26 <sup>c</sup>	13,44±0,56 <sup>c</sup>	27,13±0,76 <sup>b</sup>	30,28±0,79 <sup>b</sup>	63,64±0,97 <sup>c</sup>
APH250C3	91,07±0,47 <sup>bd</sup>	9,31±0,13 <sup>d</sup>	26,4±1,66 <sup>b</sup>	28,00±1,6 <sup>b</sup>	70,55±0,95 <sup>e</sup>
APH250C3	91,19±0,44 <sup>bd</sup>	9,51±0,3 <sup>d</sup>	25,00±0,94 <sup>b</sup>	26,75±0,98 <sup>b</sup>	69,17±0,24 <sup>e</sup>
APH250C3	91,66±0,37 <sup>d</sup>	9,00±0,78 <sup>d</sup>	24,22±1,05 <sup>b</sup>	25,85±0,98 <sup>b</sup>	69,59±1,97 <sup>e</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam entre si significativamente ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura. APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura;

O parâmetro de cor h (hue) é o ângulo de tonalidade, é calculado pela tangente de  $a^*/b^*$ , quanto mais próximo do eixo de  $0^\circ$  mais vermelho é a tonalidade da amostra e, a medida que se aproxima do eixo de  $90^\circ$ , mais amarelo se torna. Pode-se observar na Tabela 7 que amostra controle (NPSC) apresentou o valor h de 93,07, tendendo assim mais para o amarelo. E a aplicação da pressão de 500 MPa no queijo sem adição de cenoura não alterou significativamente o valor h, o qual apresentou o valor de 91,98. Ao passo que a incorporação de 3% de cenoura e pressurização de 250 MPa alterou significativamente o valor h nos pontos centrais para (70,55, 69,17 e 69,59), tornando o queijo mais alaranjado. Os queijos incorporados com 6% de cenoura tenderam mais para o vermelho, apresentando o h de 66,03 e 66,64. Os carotenoides são pigmentos naturais e normalmente são encontrados em queijos de leite de vaca em pequenas quantidades, sendo responsável pela cor levemente amarelada nos queijos. A incorporação da cenoura, como esperado, propiciou uma mudança na cor, a qual pode atuar como diferenciação do produto.

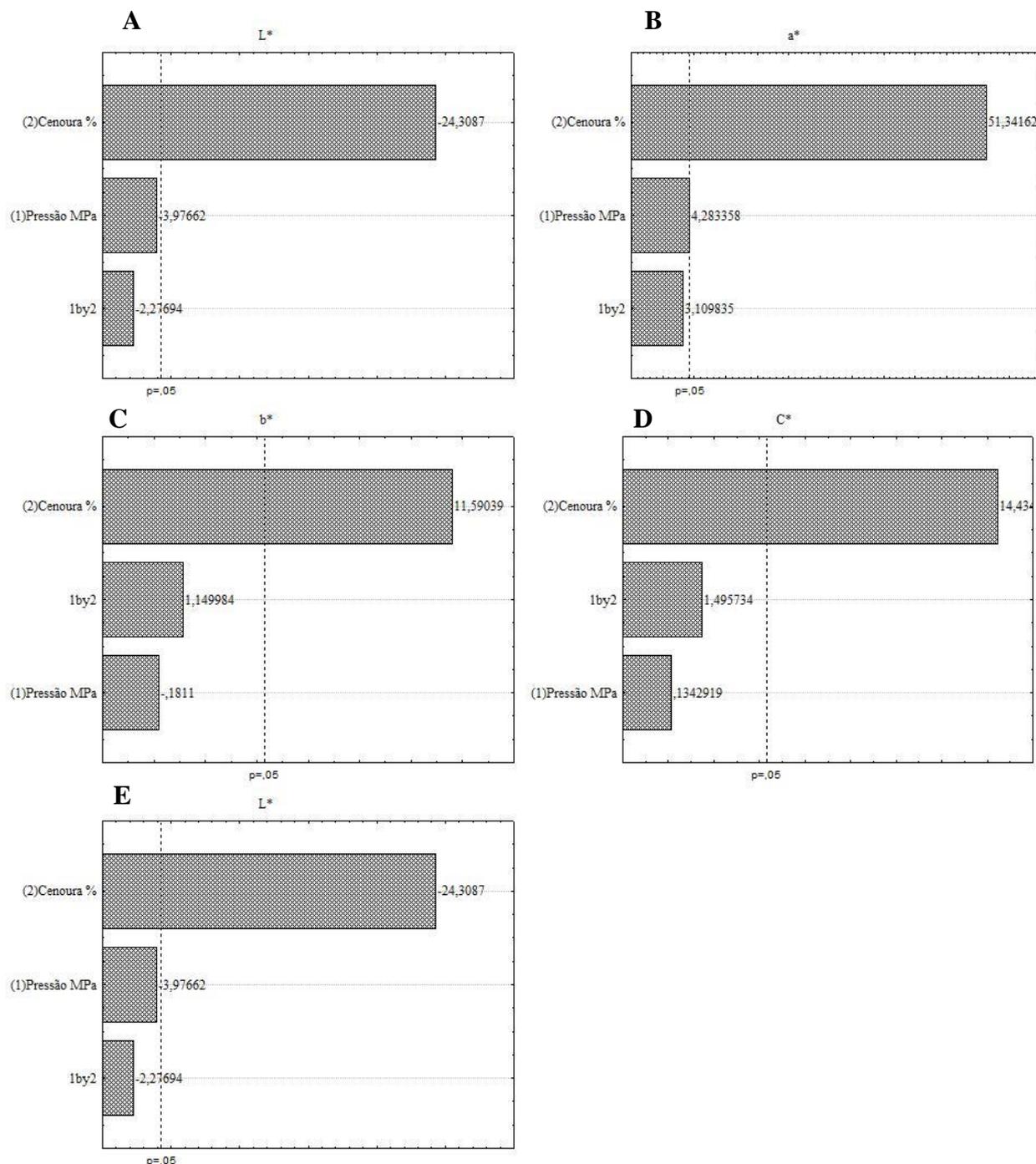
O processamento por alta pressão hidrostática a 500 MPa por 10 minutos não alterou o parâmetro h no queijo sem cenoura, enquanto que no queijo incorporado com 6% de cenoura houve uma leve alteração de 66,03 (0 MPa pressão) para 63,64 (500 MPa). O parâmetro C\* (croma) representa a saturação, ou seja, quanto maior o C\* mais viva é a cor. Conforme esperado, a incorporação de cenoura aumentou o croma, que variou de 14,53 até 30,28. A pressurização em ambos os níveis (250 ou 500) não afetou os valores de croma dos queijos.

O parâmetro luminosidade (L\*) varia em uma escala de 0 a 100, e quanto mais alto mais claro é a amostra e, ao contrário, quanto menor mais escura. Houve uma diferença significativa entre o queijo pressurizado (500 MPa) e o não pressurizado, ambos incorporados com 6% de cenoura, indicando um leve escurecimento no queijo pressurizado. Um leve decréscimo na luminosidade em amostras de queijo de leite de ovelha processado por alta pressão a 300 MPa por 10 minutos também foi reportado por Juan *et al.*, (2008).

De acordo com os resultados a aplicação da alta pressão alterou de forma significativa o valor L\*, como pode ser observado na Figura 10(A), sendo que o aumento do nível da pressão resultou em diminuição da luminosidade (L\*) nas amostras de queijos e, portanto, em escurecimento da amostras.

Adrés *et al.*, (2016) também observaram um leve decréscimo porem significativo no valor L\* de amostras de smoothies com frutas e leite desnatado pressurizadas em 600 MPa por 3 minutos, reduzindo de 44,49 para 43,53. No entanto, os autores ressaltaram que a redução do valor L\* causada pelo processamento de alta pressão foi menor do que a causada pelo tratamento térmico de pasteurização a  $80^\circ\text{C}$  por 3 minutos. Resultados similares também foram reportado por Huppertz *et al.*, (2004) em leite, que observaram que amostras de leite pressurizadas (100-

600 MPa por 30 min a 20°C) e armazenadas a 5°C apresentaram valor L\* menor do que o leite controle. Juan *et al.*, (2008) também observaram uma redução significativa do valor L\* em queijos de leite de ovelha pressurizados em 300 MPa por 10 minutos.



**Figura 10-** Diagrama de Paretos relativo ao efeito da concentração de cenoura e níveis de pressurização sobre os parâmetros de cor de queijo tipo Minas frescal, sendo (A) L\*, (B) a\*, (C) b\*, (D) C\* e (E) h

De acordo com O’Sullivan *et al.*, (2002), o valor L\* (refletância medida em escala de 1 a 100) do leite é relacionado com estado de agregação das micelas de caseína (dissociada ou não dissociada). Isto porque as micelas de caseínas interagem umas com as outras e com o fosfato de

cálcio, formando micelas esféricas grandes, com diâmetros médios que variam de 90 a 300 nm. A dispersão da luz por esses complexos é responsável pela aparência branca do leite. E, possivelmente, a aplicação da alta pressão compromete a integridade da micela através da solubilização do fosfato de cálcio micelar (MCP), com o desprendimento do cálcio e de fosfato amorfo presente no nucleotídeo da proteína (HUPPERTTZ *et al.*, 2006). Já Evert-Arriagada *et al.*, (2012) não observaram uma alteração significativa na luminosidade em queijos frescos pressurizados a 300 e 400 MPa por 5 minutos a 6°C. Salienta-se, no entanto, a duração do tempo de processo de pressurização bem como a temperatura são fatores determinantes para a alteração na cor (MARTINEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2012).

No presente estudo a aplicação da alta pressão não alterou os parâmetros de cor a\* (Figura 10B), b\* (Figura 10C), C\* (Figura 10D) e h (Figura 10E). A coordenada de cor a\* não foi influenciada pela pressurização. Juan *et al.*, (2008) relataram que a coordenada de cor a\* não foi alterada nos queijos pressurizados, conforme igualmente relatado por Evert-Arriagada *et al.*, (2012) em queijos de leite de ovelha. Porém, em ambos os estudos, a pressurização influenciou na coordenada de cor b\*, sendo que no primeiro estudo os queijos pressurizados a 400 MPa por 5 minutos tiveram um leve aumento nesse parâmetro, tendendo a ser mais amarelo do que o controle, e no segundo os queijos pressurizados a 300 MPa por 10 minutos também mostraram um amarelecimento maior do que no controle. Opkala *et al.*, 2010 observaram que o aumento da pressão aumentou o valor b\* de amostras de queijos frescos pressurizados até 291 MPa e 29 minutos.

Como esperado a cenoura teve efeito significativo em todos os parâmetros de cor. Os queijos pressurizados e não pressurizados incorporados com 6% de cenoura apresentaram h entre 63,64 e 66,58 enquanto o controle apresentou h de 91,74 e 92,87. Já em queijos incorporados com 3% de cenoura o h resultou em 70,42.

#### 4.4 Efeito da Concentração de Cenoura e/ou Pressão no Teor de Umidade, Proteína, Extrato Etéreo e Resíduo Mineral Fixo.

Os resultados do efeito da incorporação da cenoura e do processamento de alta pressão hidrostática nas amostras de queijo Minas Frescal são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7-** Composição centesimal dos queijos Minas Frescal incorporados com cenoura e/ou processados por alta pressão hidrostática.

Amostras	Umidade	Proteínas	Extrato etéreo	RMF
NPSC	62,14,57 <sup>a</sup>	11,7±0,11 <sup>ab</sup>	14,3±4,09 <sup>a</sup>	2,6±0,01 <sup>a</sup>
NPC6	61,9±16,22 <sup>a</sup>	12,2±0,03 <sup>ab</sup>	13,7±1,94 <sup>a</sup>	2,5±0,0 <sup>a</sup>
APH500SC	63,2±7,11 <sup>ac</sup>	12,7±0,45 <sup>ab</sup>	13,5±1,47 <sup>a</sup>	2,6±0,01 <sup>a</sup>
APH500C6	69,2±10,84 <sup>b</sup>	10,8±1,51 <sup>a</sup>	11,7±0,38 <sup>bd</sup>	2,4±0,01 <sup>a</sup>
APH250C3	70,7±5,58 <sup>b</sup>	12,0±0,0 <sup>ab</sup>	10,7±2,68 <sup>bc</sup>	2,4±0,01 <sup>a</sup>
APH250C3	68,3±5,58 <sup>cb</sup>	12,8±0,60 <sup>b</sup>	10,3±4,15 <sup>c</sup>	2,4±0,0 <sup>a</sup>
APH250C3	65,9±0,0 <sup>ab</sup>	12,0±0,0 <sup>ab</sup>	12,0±0,11 <sup>d</sup>	2,5±0,0 <sup>a</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam entre si significativamente ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura. APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura;

O padrão de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal estabelece que o teor de umidade deste tipo de queijo seja igual ou superior a 55% e que contenha o teor de gordura entre 25 a 44,9% (BRASIL, 2004). Fatores como a composição do leite e o tratamento empregado

nesse, antes da produção do queijo, influem diretamente na variabilidade da composição centesimal do produto final (MAGENIS *et al.*, 2014).

No presente estudo, os queijos apresentaram teor de umidade em conformidade com o regulamento dos queijos Minas Frescal ( $\geq 55\%$ ). E pode ser observado pela Figura 11 (A) que a incorporação da cenoura no queijo não influenciou significativamente no teor de umidade deste produto. De acordo com a Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (2011), a cenoura crua possui o teor de umidade de 90,1%, sendo assim, sua adição no queijo Minas Frescal possivelmente aumentaria o teor de umidade, o que não ocorreu nos queijos analisados. Salienta-se, no entanto, que a maior porção de umidade proveniente da cenoura deve ter sido eliminada conjuntamente com o soro, restando em sua maior parte os sólidos que, proporcionalmente representam pequena proporção na formulação final.

A variação do teor de umidade dos queijos estudados ficou entre 62,1 e 69,2%, situando-se dentro da faixa encontrada para o queijo Minas Frescal. Magenis *et al.*, (2014) avaliaram a composição centesimal de 21 marcas comerciais de queijo Minas Frescal e verificaram uma variação no teor de umidade entre 50,07% a 74,49%. No entanto, é importante ressaltar que comumente quanto maior é o teor de umidade menor é validade comercial deste produto. Embora os resultados encontrados no presente trabalho atendam ao padrão de identidade e qualidade do queijo Minas Frescal, na indústria é mais comumente a utilização de teor de umidade de até 62%, teor esse conseguido por meio do controle do ponto de corte e mexedura (DE PAULA, 2009). Teores de umidade superiores ocasionam uma deterioração mais acelerada e conseqüentemente uma redução na validade comercial do queijo Minas Frescal.

Na coagulação do leite, a enzima utilizada como coagulante transforma a kappa-caseína em paraproteína, que recobre as mistelas de caseína, que em seguida se agregam por meio de ligações com os íons de cálcio, formando, uma rede na qual fica retida a gordura, formando assim o gel característico do coágulo (DE PAULA, 2009). Entre os fatores que influenciam na estabilidade desse gel, incluem-se a relação proteína/água presentes na composição do leite. Ao incorporar a cenoura no leite, esta se adicionando como consequência mais água ao produto, em termos proporcionais, alterando-se, assim, a relação proteína/água, o que torna o gel possivelmente mais enfraquecido, formando uma estrutura menos firme e com menor potencial de retenção de água, e apresentando uma maior dessoragem ao longo do armazenamento. O processamento por alta pressão hidrostática pode alterar a estrutura do queijo por meio das alterações na rede protéica permitindo, assim, uma melhor hidratação das proteínas e retenção de água (RODRIGUES, 2016).

O processamento de alta pressão hidrostática também não apresentou efeito significativo sobre o teor de umidade dos queijos no presente estudo. Resultados similares foram reportados na literatura em relação a queijo fresco tipo Escocês (CAPELLA *et al.*, 2001), queijo tipo Queso Fresco (SANDRA *et al.*, 2004) e Queijo Branco com salga em salmoura (KOCA *et al.*, 2011).

Sandra *et al.*, (2004) observaram que a aplicação de 400 MPa por 20 minutos a 20°C em um queijo (Queso Fresco) não causou mudança no teor de umidade comparado com o controle, indicando que não houve maior desprendimento de soro durante o processamento por alta pressão. Koca *et al.*, (2011) também verificaram que o aplicação de pressão em 100, 200, 300 e 400 MPa por 15 minutos a 22°C em um Queijo Branco com salga em salmoura não modificou o teor de umidade desse queijo.

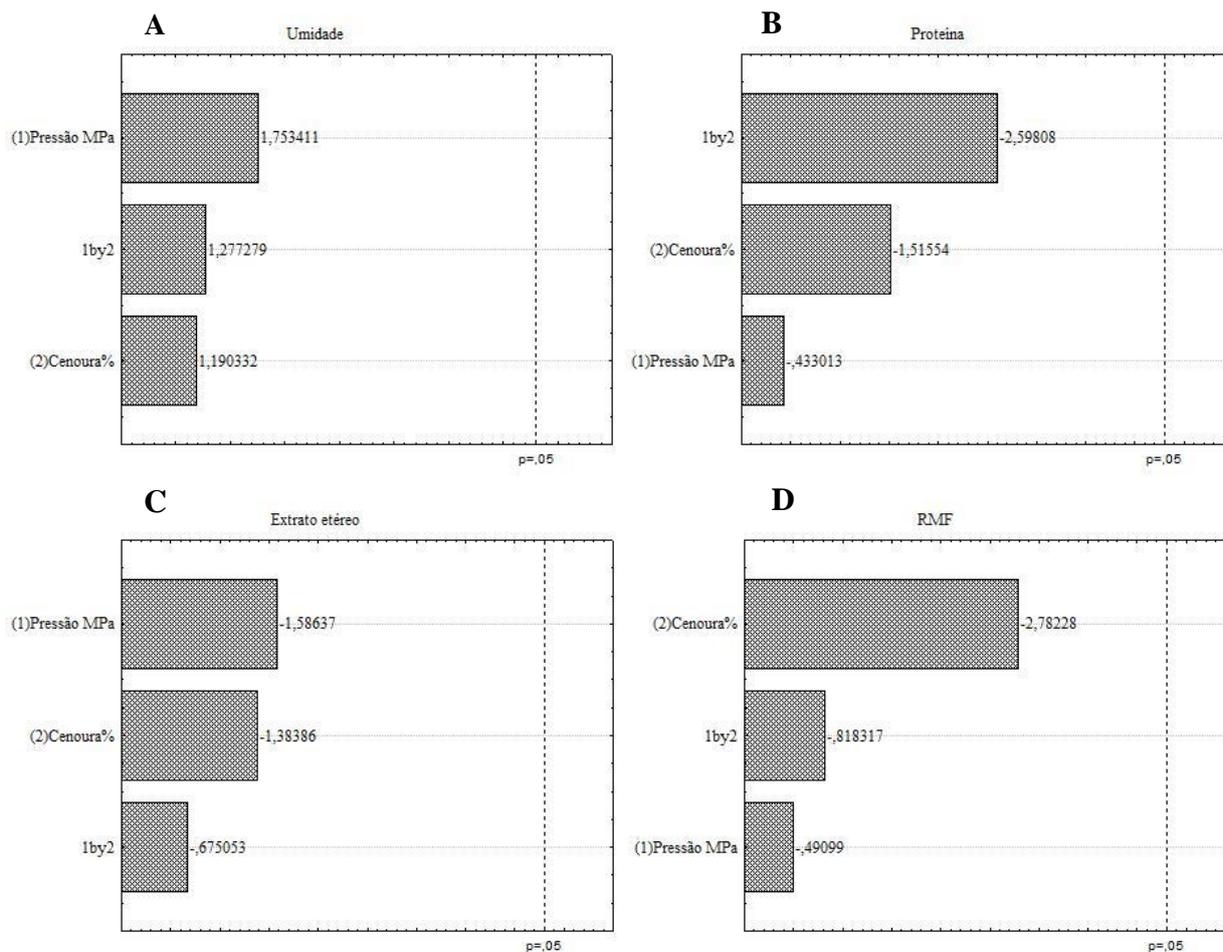
Opostamente Okpala *et al.*, (2010) observaram que o processamento de alta pressão acima de 150 MPa em queijo fresco escocês ocasionou uma redução acentuada no teor de umidade. No entanto, Evert-Arriagada *et al.*, (2012) notaram que, em relação as amostras de Quesos Frescos processadas por 400 MPa por 5 minutos, os queijos pressurizados expeliram no primeiro dia após o processamento mais soro do que o controle, o qual ficou retido nas embalagens plásticas e foi possivelmente desprendido pela compactação dos queijo devido à pressão. No entanto, ao longo do período de validade comercial, o queijo pressurizado perdeu

menos soro do que o controle, e os autores sugerem que é devido à maior perda ocorrida no início. Não foi verificado efeito significativo da interação teor de cenoura e nível de pressão no teor de umidade dos queijos.

Os queijos apresentaram teores de proteína de 10,8 a 12,8% e, como pode ser observado na Tabela 7, houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém, não foi possível explicar a razão de tais diferenças comprovadas pelo teste de Tukey no presente estudo, salientando a pequena faixa de variação dos valores obtidos. As médias dos teores de proteína dos queijos incorporados com cenoura e/ou pressurizados foram menores ou similares ao encontrados na literatura, que variaram de 11,22% (BURITI *et al.*, 2005) a 12,71-24,95% (MAGENIS *et al.*, 2014) para queijo tipo Minas Frescal. No entanto, como citado acima, a composição do leite interfere diretamente na composição centesimal do queijo (MAGENIS *et al.*, 2014).

O diagrama de Pareto (Figura 11 B) mostra que não houve influencia significativa da incorporação da cenoura no teor de proteínas nos queijos. Similarmente, o teor de proteína também não foi influenciado pelo processamento de alta pressão hidrostática, bem como, pela interação entre esses dois fatores.

A literatura vem reportando que o processamento de alta pressão hidrostática não influencia no teor de proteínas de queijos frescos (CAPELLAS *et al.*, 2001; SANDRA *et al.*, 2004; EVERT-ARRIAGADA *et al.*, 2012).



**Figura 11**-Diagrama de Paretos relativo ao efeito da incorporação da cenoura e do processamento da alta pressão hidrostática na composição centesimal dos queijos tipo Minas frescal

Koca *et al.*, (2011) observaram que o aumento da pressão de 50 a 400 MPa por 5 e 15 minutos a 22°C em Queijo Branco com salga em salmoura não alterou o teor de proteína do queijo. Evert-Arriagada *et al.*, (2014) também verificaram que a aplicação do processamento de alta pressão em escala industrial em queijos frescos (500 MPa por 5 minutos a 16°C), não alterou o teor de proteína comparado com o controle.

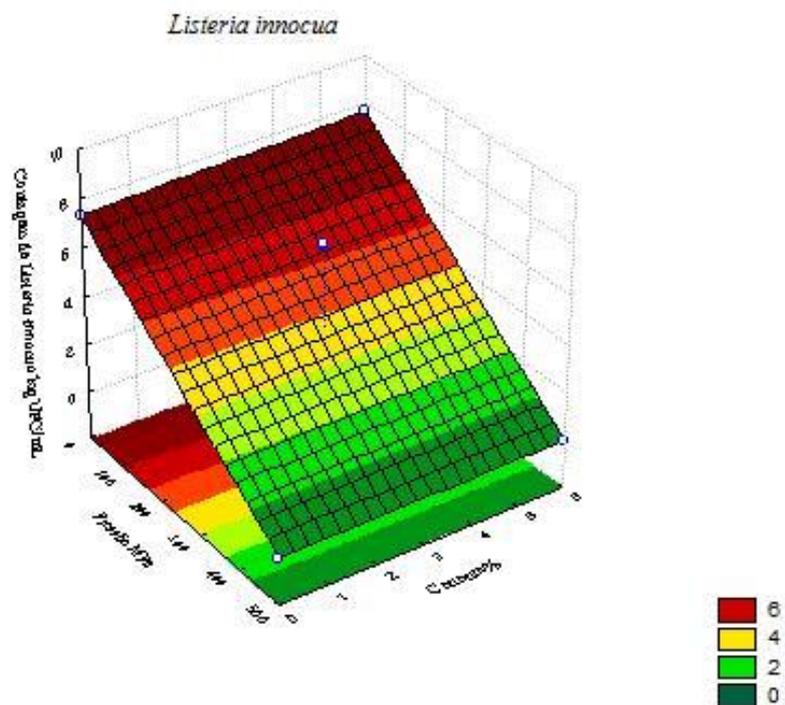
Quanto ao teor de extrato etéreo, os resultados encontrados mostram que estes variaram entre 10,3 e 14,3%. A amostra NPSC obteve 14,3% de extrato etéreo e não diferenciou significativamente das amostras NPC6, correspondentes a 13,7% e amostra APH500SC mas diferenciaram das amostras pressurizadas e incorporadas com cenoura.

Em contrapartida, pode-se observar na Figura 11 (C) que a alta pressão e a concentração de cenouras aplicadas de forma isolada ou conjunta no queijo não tiveram efeito significativo no teor de extrato etéreo. Capellas *et al.*, (2001) observaram que aplicação de alta pressão de 500 MPa por 5, 15 e 30 minutos a 10 ou 25°C em Mató, um queijo fresco espanhol, não alterou o teor de gordura deste produto. Evert-Arriagada *et al.*, (2012) também relataram que o processamento a 500 MPa por 5 minutos a 6°C não alteraram o teor de gordura em Queso Fresco.

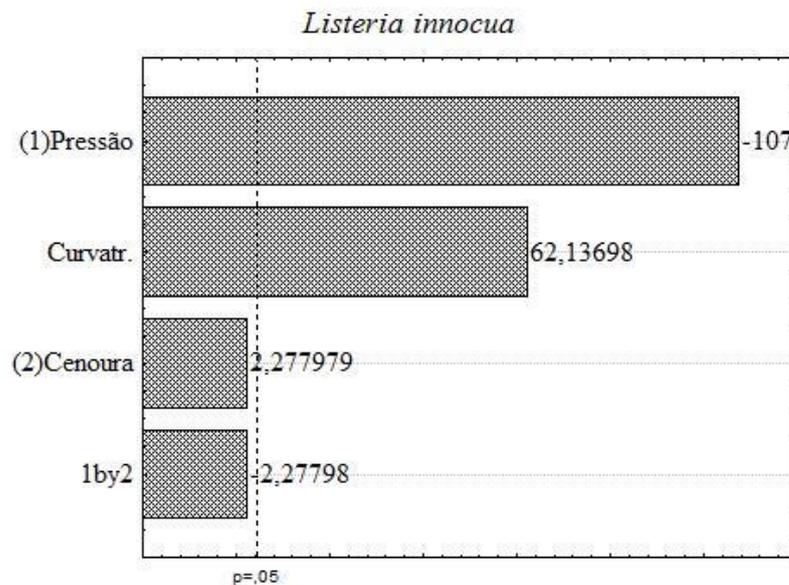
Do mesmo modo o teor de RMF nos queijos não foi afetado pela incorporação da cenoura e pela pressurização, e também não houve efeito pela interação destes fatores, e situaram-se entre 2,4 a 2,6%.

#### 4.5 Efeito da Concentração de Cenoura e/ou Aplicação de Alta Pressão na Inibição da *Listeria innocua*.

A Figura 12 e a Figura 13 mostram o efeito da incorporação da cenoura e/ou do processamento de alta pressão na inativação da *Listeria innocua* analisado no primeiro dia após o processamento.



**Figura 12-** Superfície de resposta do efeito da incorporação da cenoura e do processamento por alta pressão hidrostática na inibição de *Listeria innocua* em queijo tipo Minas Frescal



**Figura 13-** Diagrama de Pareto sobre o efeito da incorporação da cenoura e do processamento por alta pressão hidrostática na inibição de *Listeria innocua* em queijo tipo Minas Frescal.

Como pode ser observado na superfície de resposta (Figura 12) e no Diagrama de Pareto (Figura 13) a incorporação da cenoura não teve efeito significativo na inibição da *Listeria innocua* um dia após o processamento.

Beuchat e Brackett (1990) verificaram uma redução para níveis não detectáveis na população de cepas de *Listeria monocytogenes* Scott A em suspensão de  $7,0 \times 10^6$  ufc/mL após a imersão em cenoura triturada. Os resultados reportados na literatura sobre o efeito antimicrobiano da cenoura na inativação deste patógeno foram obtidos a partir da inoculação direta na cenoura ou em seu suco (BECHAUT & BRACKETT, 1990; LIAO, 2007; NORIEGA *et al.*, 2010). Porém o efeito antimicrobiano da cenoura quando incorporado no alimento pode sofrer influência dos fatores intrínsecos, da matriz alimentícia e por sua vez reduzir a ação do antimicrobiano. Os queijos possuem alto teor de proteínas e gorduras, os quais podem envolver os micro-organismos, protegendo-os da ação dos compostos naturais (GUTIERREZ *et al.*, 2008), além da possível influência da tecnologia de fabricação do Queijo Minas Frescal, bem como do armazenamento na degradação destes compostos.

O processamento de alta pressão hidrostática a 250 MPa por 10 minutos combinado com a incorporação de 3% de cenoura no queijo (Tabela 8) não reduziu a contagem de *Listeria innocua*, resultando em contagens de 7,11, 7,03 e 7,17 log ufc/mL comparado com o controle, que apresentou contagem de 7,38 log de ufc/mL. A literatura vem relatando que aplicação de pressões em torno de 200 MPa não são suficientes para inativar *Listeria monocytogenes* (LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007; TOMASULA *et al.*, 2014).

O processamento de alta pressão hidrostática a partir de 200 MPa causa danos à membrana celular (HUANG *et al.*, 2014). Tomasula *et al.*, (2014) observaram, através da microscopia eletrônica de varredura, que as células de *Listeria monocytogenes* após a aplicação da pressão de 200 MPa por 20 minutos a 20°C apresentavam marcas na sua superfície celular, evidenciando uma ruptura ou perda da integridade da membrana da célula. Contudo, estas injúrias não foram letais para as células, pois verificou-se que apesar das injúrias, a contagem de células de *Listeria monocytogenes* no queijo não foi reduzida. Lopez-Pendemont *et al.*, (2007) também não observaram redução na contagem de *Listeria monocytogenes* em um sistema modelo de queijo fresco processado a 300 MPa por 10 minutos.

No presente estudo o processamento em 500 MPa por 10 minutos reduziu a contagem de *Listeria innocua* para níveis abaixo do limite de detecção um dia após o processamento) nos queijos tratados com 6% de cenoura ou 0% de cenoura, apresentando assim, uma redução de aproximadamente 7 log ufc/mL.

Reduções na contagem de *Listeria innocua* e *Listeria monocytogenes* 24 horas após o processamento por alta pressão em 500 MPa por 10 minutos em queijos frescos foram relatados por Hnosko *et al.*, (2012), que observaram uma redução de 4,04 log ufc/mL, e por Lopez-Pendemont *et al.*, (2007), que observaram uma redução de quase 6 log. Variações na taxa de inativação da pressão sobre estes micro-organismos patogênicos pode ser devido a diferença entre as matrizes alimentícias, as diferentes cepas bem como a fase de crescimento do micro-organismo (LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007).

O Diagrama de Pareto gerado (Figura 13) apresentou curvatura significativa no modelo, o que pode ser supostamente devido à própria variabilidade das amostras ou em função do delineamento utilizado.

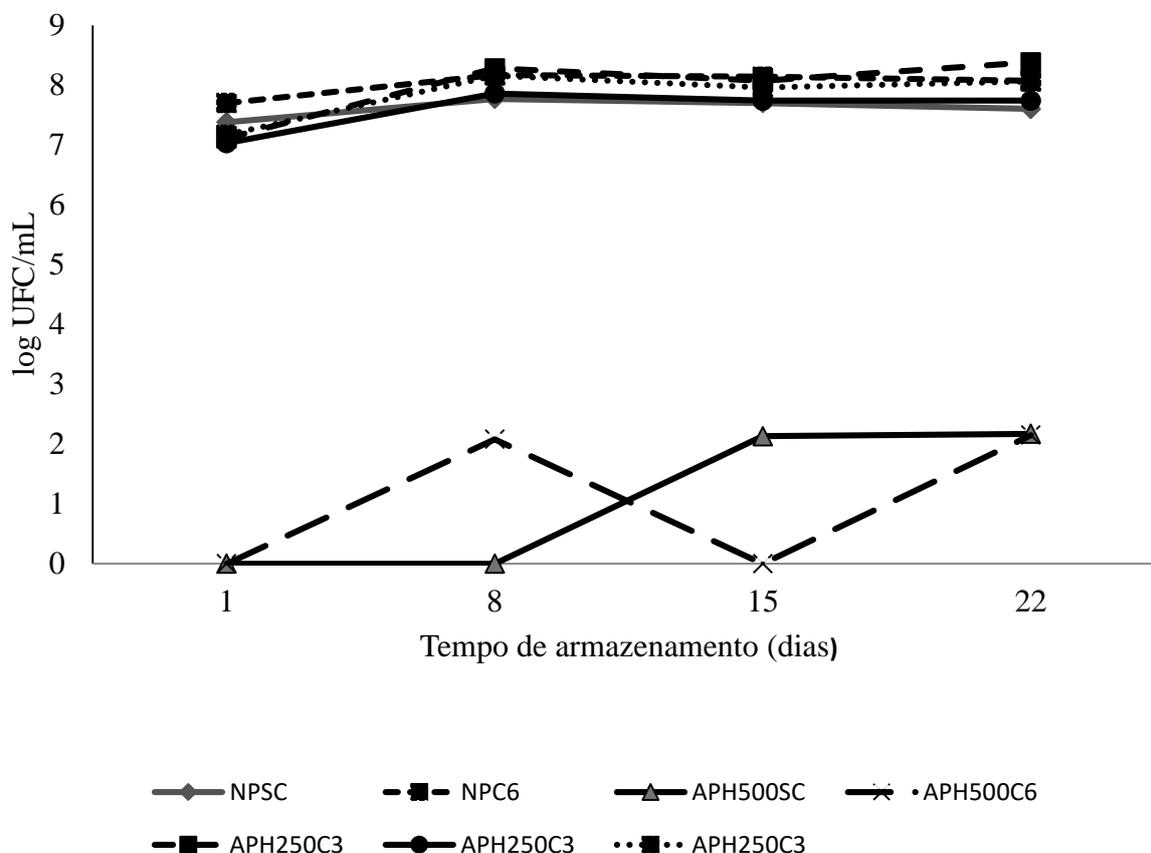
**Tabela 8-** População de *Listeria innocua* (log ufc/mL) nos queijos incorporados de cenoura e/ou processados por alta pressão hidrostática ao longo do armazenamento refrigerado a (8°C) por 22 dias.

Tratamentos	Tempo (dias)			
	1	8	15	22
NPSC	7,38 <sup>aA</sup>	7,77 <sup>aA</sup>	7,7 <sup>aA</sup>	7,6 <sup>aA</sup>
NPC6	7,7 <sup>aA</sup>	8,17 <sup>aB</sup>	8,14 <sup>aA</sup>	8,07 <sup>aA</sup>
APH500SC	n.d <sup>BA</sup>	n.d <sup>bA</sup>	2,13 <sup>bA</sup>	2,17 <sup>aA</sup>
APH500C6	n.d <sup>BA</sup>	2,08 <sup>bA</sup>	n.d <sup>AA</sup>	2,15 <sup>aA</sup>
APH250C3	7,11 <sup>aA</sup>	8,28 <sup>aB</sup>	8,07 <sup>aA</sup>	8,38 <sup>aB</sup>
APH250C3	7,03 <sup>aA</sup>	7,86 <sup>aB</sup>	7,74 <sup>aB</sup>	7,74 <sup>aB</sup>
APH250C3	7,17 <sup>aA</sup>	8,16 <sup>aA</sup>	7,96 <sup>aA</sup>	8,06 <sup>aA</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna (minúsculas) e linha (maiúsculas) não se diferenciam entre si significativamente ( $p \leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura. APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura;

Os resultados da atividade antimicrobiana da cenoura e/ou do processamento da alta pressão hidrostática no crescimento da *Listeria innocua* inoculada nos queijos, ao longo do armazenamento de 22 dias a 8°C, são apresentados na Tabela 8 e Figura 14.

A Figura 14 mostra a evolução da contagem de *Listeria innocua* nas amostras de queijos ao longo de 22 dias de armazenamento a 8°C, esta temperatura foi assumida como de abuso, pois é superior a temperatura supostamente adequada para armazenar o Queijo Minas Frescal (4°C), e foi utilizada com o objetivo de simular a temperatura muitas vezes encontradas nas gôndolas do supermercado. Pode ser observado que o queijo sem incorporação de cenoura e não pressurizado (controle) manteve sua contagem da população de *Listeria innocua* após o processamento constante ao longo do armazenamento (aproximadamente de 7 log ufc/mL). O mesmo comportamento foi observado no queijo incorporado com 6% de cenoura não pressurizado, permanecendo constante a contagem de aproximadamente 7 log ufc/mL. Portanto, com base nesses resultados a cenoura incorporada no queijo mesmo na concentração máxima (de 6%), não demonstrou efeito antimicrobiano à *Listeria innocua*.



**Figura 14-** Evolução da contagem de *Listeria innocua* (log de ufc/mL) (médias de duas replicatas) no queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão armazenado a 8°C por 22 dias

NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura. APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura;

A combinação da incorporação da cenoura na concentração de (3%) com o processamento de alta pressão mais moderado (250 MPa) não reduziu a contagem de *Listeria innocua* ao longo do armazenamento de vinte e dois dias a 8°C. Pode-se observar (Figura 14) que a população deste patógeno após o processamento por alta pressão hidrostática era aproximadamente de 7 log ufc/mL e, com exceção de uma das repetições do ponto central, a população de *Listeria innocua* sofreu um leve aumento, tendo alcançado 8 log ufc/mL no oitavo dia de armazenamento e se mantido constante até o final do armazenamento. O mesmo comportamento foi observado no queijo Controle (NPSC), demonstrando assim que a cenoura e o processamento por alta pressão nos níveis intermediários das condições estudadas não tiveram efeito sobre a população de *Listeria innocua* inoculada no queijo. Salienta-se, por outro lado, que outros estudos vêm reportando um efeito sinérgico da combinação entre certos antimicrobianos naturais e a alta pressão hidrostática na inativação de *Listeria* (Oliveira *et al.*, 2015). Desse modo, segundo Gayán *et al.*, (2012), a alta pressão hidrostática e certos compostos antimicrobianos podem impactar as mesmas estruturas microbianas, em particular na membrana celular com decorrente aumento da sua permeabilidade, o que pode levar a uma maior

incorporação do antimicrobiano para o interior da célula com consequente aumento taxa de inativação microbiana.

A pressão de 200-300 MPa por 10 minutos aplicadas em leites e queijos vem sendo relatada como não letal às células de *Listeria* (GERVILLA *et al.*, 1995; LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007; TOMASULA *et al.*, 2014). No entanto, esses intervalo de pressão causa injúria na membrana celular das células de *Listeria* (HUANG *et al.*; TOMASULA *et al.*; 2014), a qual possivelmente poderia facilitar a ação dos antimicrobianos naturais e acelerar a inativação permitindo assim, a utilização de níveis de pressão mais moderados, bem como, a redução do riscos de recuperação de células com injúrias subletais (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Paterson *et al.*, (2012) observaram que o suco de cenoura inoculado com um cocktail de cepas de *Listeria monocytogenes* tratado com alta pressão hidrostática a 500 MPa por 1 minuto a 20°C e armazenados a 8°C apresentam contagem de *Listeria* abaixo do limite de detecção (redução de 6 log), enquanto que no tratamento com alta pressão nas mesmas condições em caldo TSBYE reduziu somente 1,65 log. Os autores sugeriram que o efeito anti-*Listeria* da cenoura é aumentado pela alta pressão hidrostática. No entanto, de acordo com Bleoanca *et al.*, (2016), a atividade antimicrobiana dos compostos naturais podem ser limitado pela rede de proteínas com alto teor de gordura, os quais podem servir de barreira a ação desses compostos aos microrganismos.

Considerando outros antimicrobianos, Karatzas *et al.*, (2001) verificaram que a redução da contagem de *Listeria monocytogenes* foi maior quando combinado carvacrol (3 mmol/L) e alta pressão hidrostática (300 MPa) do que quando aplicados individualmente. Individualmente, o tratamento com carvacrol reduziu 1,8 log e o tratamento por alta pressão reduziu 2 log, enquanto que combinados a redução foi superior a 5 log (em um meio de laboratório). Quando testado em leite semidesnatado, a concentração de 3 mmol/L de carvacrol individualmente não reduziu a contagem de *Listeria monocytogenes*, e o processamento por alta pressão hidrostática em 300 MPa reduziu 2,3 log aplicado individual, ao passo que quando combinados a contagem de *Listeria monocytogenes* viáveis alcançou redução de 3,2 log.

Bleoanca *et al.*, (2016) avaliaram a cinética de inativação da *Listeria monocytogenes* inoculadas em queijos frescos pressurizados e adicionados com extrato de tomilho. Os autores verificaram que a 200 MPa não houve redução da contagem de *Listeria* em ambas as amostras com ou sem extrato de tomilho, contudo a partir da pressão de 225 MPa foi observado uma inativação acelerada nas amostras que continham extrato de tomilho e, a 300 MPa por 2 minutos, as amostras adicionadas com extrato de tomilho reduziram em 5 log a contagem de *Listeria monocytogenes*, enquanto o tratamento por alta pressão individual promoveu redução de apenas 3,5 log na população microbiana.

Evrendilek & Balasubramaniam (2011) relataram que para a redução da contagem de *Listeria monocytogenes* inoculada na concentração de 6 log de ufc/mL em iogurte foi necessário nível de pressão de 600 MPa por 5 minutos para resultar em contagem <1 log, enquanto que essa redução foi alcançada com processamento a 300 MPa por 5 minutos no produto acrescido de óleo essencial de tomilho na concentração de 0,1 mL/100mL.

No presente estudo, o processamento por alta pressão a 500 MPa por 10 minutos reduziu a contagem de *Listeria innocua* para níveis não detectáveis logo após o processamento (redução superior a 7 log) e, apesar de verificar-se uma contagem de 2 log ao longo do armazenamento, esta variação não foi significativa estatisticamente. A contagem encontrada nos queijos pressurizados a 500 MPa ao longo do armazenamento pode ter supostamente ocorrido por uma variação entre amostras, na qual a *Listeria innocua* pode ter sobrevivido ao processamento. Outra possibilidade é ter ocorrido recuperação da *Listeria innocua*, parcialmente injuriada nessas amostras devido ao processamento, viabilizando tal contagem ao longo do armazenamento. Não houve diferença significativa na população microbiana entre os queijos incorporado com 6 % de cenoura e sem adição de cenoura, ambos tratados a 500 MPa.

Resultados similares foram reportados por Gervilla *et al.*, (1995), que observaram uma redução de 7 a 8 log na população de *Listeria innocua* em leite de ovelha após o processamento de alta pressão a 500 MPa por 10 minutos a 25°C. Analogamente, Linton *et al.*, (2008) observaram que o queijo Camembert produzido com leite cru inoculado com 4 log ufc/mL de *Listeria monocytogenes* e processado a 500 MPa por 10 minutos a 10°C não apresentou contagem detectável ao final da maturação, comparado com o controle.

Lopez-Pendemont *et al.*, (2007) também observaram uma redução de quase 6 log ufc/g na contagem de *Listeria monocytogenes* inoculada em um modelo de queijo fresco pressurizado a 500 MPa por 10 minutos a 20°C, resultando em níveis não detectáveis que se mantiveram constantes ao final de 30 dias armazenamento a 8°C. No entanto, não foi conseguida uma inativação completa pois, após a incubação por 18 horas a 32°C da diluição inicial homogeneizada, ainda era observado o crescimento de colônias de *Listeria monocytogenes*. Hnosko *et al.*, (2012) também verificaram que, embora o tratamento a 500 MPa por 10 minutos em queso fresco reduziu em mais de 5 log a população de *Listeria innocua*, a inativação não foi completa e permanente.

A *Listeria innocua* é considerada um indicador da *Listeria monocytogenes* devido a sua proximidade filogenética (GERVILLA *et al.*, 1995), no entanto não é considerada um patógeno para os humanos. Sendo assim, foi utilizada no presente estudo como substituta da *Listeria monocytogenes*. Evrendilek & Balasubramaniam (2011) investigaram o efeito do processamento de alta pressão hidrostática em cepas de *Listeria monocytogenes* e de *Listeria innocua* em iogurte Ayran e observaram que o processamento a 250, 300 e 350 MPa por 5 minutos a contagem de *Listeria monocytogenes* foi de 2,39, 2,09 e 1,62, enquanto de *Listeria innocua* foi de 1,52, 1,43 e 1,0 log ufc/mL. Em 600 MPa por 5 minutos, a contagem de *Listeria monocytogenes* foi reduzida de 6 log ufc/mL para 1,4 log ufc/mL e de *Listeria innocua* para 1,0 log ufc/mL.

Em queijos, Lopez-Pendemont *et al.*, (2007) e Tomasula *et al.*, (2014) observaram que o processamento de 200 MPa por 10 minutos não causou redução na contagem de *Listeria monocytogenes* em queijo de massa lavada e em Queso Fresco, respectivamente, não havendo estudo reportado com *Listeria innocua* neste mesmo nível de pressão em queijos. Quando aumentado o nível de pressão para 300 MPa, Lopez-Pendemont *et al.*, (2007) também não constataram redução significativa na contagem de *Listeria monocytogenes* em queijo de massa lavada enquanto em Queijo Fresco, Bleonca *et al.*, 2016 verificaram uma redução de 3,5 log na contagem deste micro-organismo com 2 minutos de pressurização.

No processamento de 400 MPa por 10 minutos do queijo de massa lavada a contagem de *Listeria monocytogenes* foi reduzida em 2,9 log (NCTC11994) e 1,5 log ufc/mL (Scott A) (LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007), enquanto a *Listeria innocua* apresentou redução de 1,96 log em Queso Fresco (HNOSKO *et al.*, 2012). Quando o tempo do processamento foi aumentado para 20 minutos, foi observado uma redução adicional de 3 log ufc/mL também em Queso Fresco (TOMASULA *et al.*, 2014).

No processamento do queijo de massa lavada a 500 MPa por 10 minutos, foi observada redução de 5 log ufc/mL na contagem de *Listeria monocytogenes* (LOPEZ-PENDEMONT *et al.*, 2007) e 4,04 log ufc/mL na contagem de *Listeria innocua* em Queso Fresco (HNOSKO *et al.*, 2012). Já no processamento a 600 MPa por 5 minutos de Queso Fresco, foi verificado uma redução de 4,6 log ufc/mL (TOMASULA *et al.*, 2014) e 5 log ufc/mL para *Listeria innocua* (HNOSKO *et al.*, 2012).

## 4.6 Análise Sensorial

### 4.6.1 Perfil socioeconômico dos consumidores

A Tabela 9 mostra o perfil socioeconômico e de frequência de consumo de queijo Minas Frescal dos participantes do estudo. Como pode ser observado, dentre os 102 consumidores que responderam ao questionário aplicado, 62% foram do sexo feminino e 38% do masculino. A maioria adultos jovens (79%), na faixa de idade entre 18-45 anos. A escolaridade desse painel de consumidores foi elevada, pois a maioria tinha curso superior ou pós-graduação. Em relação à renda, aproximadamente 50% dos indivíduos relataram ganhar acima de 10 salários mínimos. Foi observado um elevado consumo de queijo Minas Frescal pelos participantes do estudo.

**Tabela 9-** Perfil socioeconômico dos consumidores participantes do teste sensorial (n=102) de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão

<b>Características</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<i>Gênero</i>		
Feminino	63	62
Masculino	39	38
<i>Idade</i>		
18-25 anos	23	23
26-35 anos	25	24
36-45 anos	31	30
46-55 anos	16	16
56-65 anos	7	7
>65 anos	0	0
<i>Escolaridade</i>		
Fundamental incompleto	0	0
Fundamental completo	1	1
Médio incompleto	2	2
Médio completo	7	7
Superior incompleto	21	20
Superior completo	11	11
Pós-graduação	60	59
<i>Renda Familiar (salário mínimo no Brasil = R\$ 880,00)</i>		
1 a 5	28	27
>5 a 10 salários	28	27
>10 a 20 salários	36	35
>20 a 30 salários	12	12
>30 salários	3	3
<i>Frequência do consumo de Queijo Minas Frescal</i>		
Nunca	0	0
Raramente	15	15
Frequentemente	71	69
Diariamente	14	14
Mais do que uma vez por dia	2	2

#### 4.6.2 Teste de aceitação

Na Tabela 10 são apresentadas às médias de aceitação das amostras dos queijos Minas frescal desenvolvidos neste estudo.

**Tabela 10-** Médias e desvio padrão entre parênteses da avaliação global dos Queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão.

<b>Amostras</b>	<b>Aceitação</b>
NPSC	6,4 (1,64) <sup>a</sup>
APH250SC	6,2 (1,66) <sup>ab</sup>
APH500SC	6,0 (1,83) <sup>ab</sup>
NPC3	5,8 (1,79) <sup>ab</sup>
APH250C3	6,4 (1,69) <sup>a</sup>
APH500C3	5,8(1,67) <sup>ab</sup>
NPC6	5,5(1,94) <sup>b</sup>
APH 250C6	5,8(1,88) <sup>ab</sup>
APH500C6	5,5(1,92) <sup>b</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si significativamente p ( $\leq 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

§avaliada em escala hedônica de 9-pontos.

NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; APH250SC: queijo pressurizado a 250 MPa/10min. sem cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; NPC3: queijo não pressurizado com 3% de cenoura; APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura; APH500C3: queijo pressurizado a 500 MPa/10min. com 3% de cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH250C6: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 6% de cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 6% de cenoura.

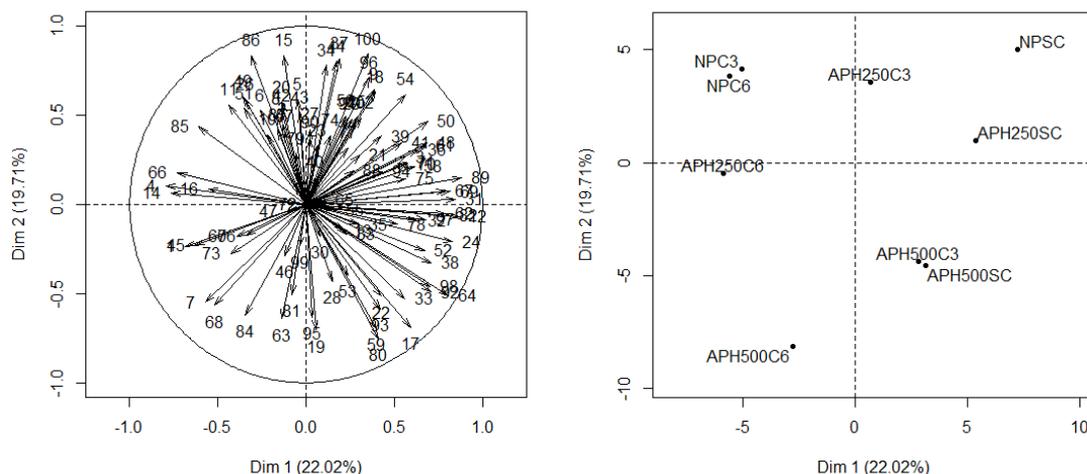
Pode se observar que a pressão não influenciou na aceitação global do produto. Resultados semelhantes foram verificados por Trujillo *et al.*, (2000) e Evert-Arriagada *et al.*, (2014) em queijos frescos pressurizado em 500 MPa por 5 -30 min a 25 °C e 500 MPa por 5 min a 16°C, respectivamente, os quais não apresentaram diferença na preferência em relação aos queijos não pressurizados. A incorporação da cenoura na concentração de 6% teve uma menor aceitação, exceto para a amostra (APH 250C6), pressurizada a 250 MPa, diferindo estatisticamente da amostra Controle. Quando em combinação, a pressão e a concentração de cenoura em níveis intermediários tenderam a ter maior aceitação comparado com os níveis e concentrações extremos.

#### 4.6.3 Mapa de Preferência Interno

Os resultados apresentados anteriormente foram relativos às médias de todos os participantes do estudo (n=102), no entanto, a média não é a forma mais adequada de expressar resultados. Desta forma, foi avaliada a aceitação das amostras de queijos de acordo com a aceitação individual dos consumidores por meio da análise de componentes principais e análise de agrupamento.

Os resultados do mapa de preferência interno são mostrados na Figura 15. A primeira e a segunda dimensão explicaram 41,7% da variabilidade dos dados com relação à aceitação das diferentes amostras de queijo Minas Frescal. O primeiro componente (22,02%) separou as amostras em quatro grupos: o primeiro composto pelas amostras APH500C6, APH250C6, NPC6 E NPC3, localizadas nos quadrantes à esquerda do eixo X; o segundo composto pelas amostras APH250C3 localizadas em valores intermediários da primeira dimensão e positivos da segunda; o terceiro formado pelas amostras APH500C3 e APH500SC localizadas em valores positivos da primeira dimensão e negativos da segunda; e por fim, o quarto grupo formado pelas amostras

NPSC e APH250SC localizadas em valores positivos da primeira e segunda dimensão. Observa-se uma menor concentração de consumidores, onde estão localizadas as amostras do primeiro grupo. Este grupo apresenta todas as amostras com a concentração de 6% de cenoura, e a amostra não pressurizadas com 3%, o que pode indicar que essas amostras foram as menos preferidas.

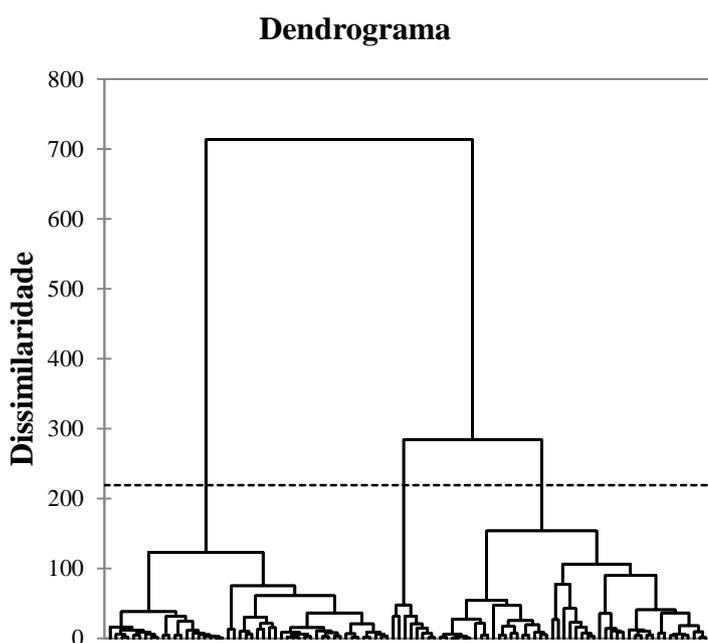


**Figura 15-** Mapa de preferência interno mostrando (a) posição dos consumidores e (b) a posição das amostras de queijo Minas Frescal incorporadas com cenoura e/ou tratadas por alta pressão NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; APH250SC: queijo pressurizado a 250 MPa sem cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa sem cenoura; NPC3: queijo não pressurizado com 3% de cenoura; APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa com 3% de cenoura; APH500C3: queijo pressurizado a 500 MPa com 3% de cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH250C6: queijo pressurizado com 6% de cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa com 6% de cenoura.

É interessante destacar a presença de um maior número de consumidores onde está localizada a amostra do grupo 2, correspondente a amostra pressurizada a 250 MPa e incorporada com 3% de cenoura, e no grupo quatro referentes as amostras de queijo não pressurizado e não incorporado de cenoura; e o queijo pressurizado em 250 MPa e também não incorporado com cenoura. Esse resultado demonstra que a incorporação de 3% de cenoura pode ser uma alternativa para diferenciar o produto por meio do enriquecendo do queijo com carotenoides e com possível apelo de saudabilidade, uma vez que um segmento de consumidores preferiu essa amostra. Além disso, verifica-se que a pressão de (250 MPa) foi bem aceita pela maior parte dos consumidores.

Com relação ao terceiro grupo, composto pelas amostras pressurizada a 500 MPa sem incorporação de cenoura e com 3% de cenoura, um número intermediário de consumidores atribuiu notas elevadas para essas amostras, podendo ser uma alternativa a ser mais estudada, uma vez que com base nos resultados de microbiologia foi verificado que a pressão de 500 MPa foi mais efetiva na redução da contagem de *Listeria innocua*.

Por meio da segmentação baseada na similaridade de respostas da avaliação da aceitação global foram identificados três grupos de consumidores que podem ser visualizados na Figura 16 e Tabela 10.



**Figura 16-** Dendrograma dos participantes da avaliação sensorial nas amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão

O segmento 1, composto pelo menor número de consumidores ( $n=8$ ) atribuiu as menores médias para as diferentes amostras de queijos Minas Frescal, quando comparado aos demais segmentos. Também pode ser verificado que amostras APH500SC e APH500C6 diferiram estatisticamente da amostra NPSC, sendo as menos preferidas para este segmento, o que demonstra que para esses consumidores a pressurização pode ter provocado a queda da aceitação.

Para o segmento 2, formado pelo maior número de consumidores ( $n=48$ ), verifica-se que os consumidores atribuíram notas superiores para todos os queijos, diferindo estatisticamente dos demais apenas o queijo NPC6, sendo a menos preferida. Por fim, para o segmento 3 ( $n=46$ ), foi observado que os consumidores preferiram todas as amostras de queijos não incorporados com cenoura, bem como a amostra pressurizada a 250 MPa com incorporação de 3% de cenoura.

Podemos destacar que somente as amostras NPSC, APH250SC, APH250C3 não diferiram estatisticamente entre si, nos três segmentos, o que confirma os resultados anteriores verificados pelo Mapa de Preferência Interno e pela superfície de resposta os quais indicaram que pressões e concentrações de cenoura intermediárias não apresentaram um efeito negativo na preferência dos consumidores, uma vez que a preferência destas amostras não se diferenciou da amostra controle.

Foi analisado o perfil sócio-econômico e frequência de consumo de queijo Minas Frescal pelos consumidores de cada segmento (dados não mostrados), verificando-se que o perfil dos três segmentos era homogêneo, demonstrando que a aceitação ou rejeição do produto foi apenas função da preferência individual, não tendo ligação com fatores demográficos e nem baseada na quantidade do produto consumida por esses.

**Tabela 11-** Médias da avaliação global segmentada das amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão

Amostras	Segmento 1 (n=8)	Segmento 2 (n=48)	Segmento 3 (n=46)
NPSC	4,5 <sup>gh</sup>	7,2 <sup>a</sup>	5,9 <sup>d</sup>
APH250SC	3,6 <sup>hi</sup>	7,2 <sup>a</sup>	5,6 <sup>def</sup>
APH500SC	3,0 <sup>i</sup>	6,8 <sup>a</sup>	5,8 <sup>de</sup>
NP C3	3,1 <sup>hi</sup>	6,8 <sup>a</sup>	5,2 <sup>fg</sup>
APH250C3	3,5 <sup>hi</sup>	7,1 <sup>a</sup>	6,1 <sup>cd</sup>
APH500C3	3,5 <sup>hi</sup>	6,7 <sup>a</sup>	5,3 <sup>efg</sup>
NPC6	3,1 <sup>hi</sup>	6,5 <sup>bc</sup>	4,9 <sup>g</sup>
APH250C6	3,3 <sup>hi</sup>	6,8 <sup>a</sup>	5,2 <sup>fg</sup>
APH500C6	2,3 <sup>i</sup>	6,7 <sup>a</sup>	4,8 <sup>g</sup>

\*Letras iguais na mesma coluna não se diferenciam entre si significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; APH250SC: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. sem cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; NPC3: queijo não pressurizado com 3% de cenoura; APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura; APH500C3: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 3% de cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH250C6: queijo pressurizado a 250/10 min. com 6% de cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 mi. com 6% de cenoura

#### 4.6.4 CATA (check-all-that-apply)

De acordo com o teste Q de *Cochran* não foi verificada diferença significativa na frequência de apenas um dos 18 termos CATA usados para descrever as amostras de queijo Minas Frescal. Este resultado evidencia que os termos utilizados para caracterização sensorial das amostras foram adequados, pois, os participantes conseguiram perceber as diferenças das características sensoriais dos queijos (Tabela 12).

**Tabela 12-** Frequência de menção de cada termo do questionário CATA usado para descrever as amostras de queijos Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou tratado por alta pressão

<b>Termos/Amostras</b>	<b>NPSC</b>	<b>APH250SC</b>	<b>APH500SC</b>	<b>NPC3</b>	<b>APH250C3</b>	<b>APH500C3</b>	<b>NPC6</b>	<b>APH250C6</b>	<b>APH500C6</b>
Sabor de cenoura **	0	0	0	13	17	39	23	32	62
Gosto adocicado **	4	8	13	6	9	25	6	8	32
Pouco sal **	66	71	82	42	40	71	43	53	68
Macio **	66	53	41	57	45	26	65	36	23
Sabor suave **	47	51	58	28	38	39	19	26	35
Textura firme **	57	59	61	39	66	68	36	62	60
Sabor agradável <sup>ns</sup>	43	50	40	43	48	37	34	34	35
Aroma característico**	62	60	29	62	68	19	45	53	19
Aroma suave**	44	41	56	34	19	48	33	21	43
Partículas de cenoura**	0	0	0	32	41	39	44	54	55
Borrachudo *	18	26	17	12	17	26	12	21	21
Aparência uniforme**	63	70	67	28	39	37	32	37	39
Cor alaranjada**	1	0	1	53	62	58	79	83	77
Cor amarelo intenso**	0	0	0	5	13	11	12	12	15
Cor amarelo claro**	9	13	9	36	28	30	7	7	5
Superfície lisa**	74	67	70	30	50	48	28	47	33
Sabor residual**	9	6	7	31	15	7	36	17	14
Quebradiço**	2	5	18	9	9	23	5	7	21

\*\*( $p \leq 0,001$ ); \* ( $p \leq 0,05$ ); de acordo com o teste Q de *Cochran*

ns = não diferenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) de acordo com o teste Q de *Cochran*

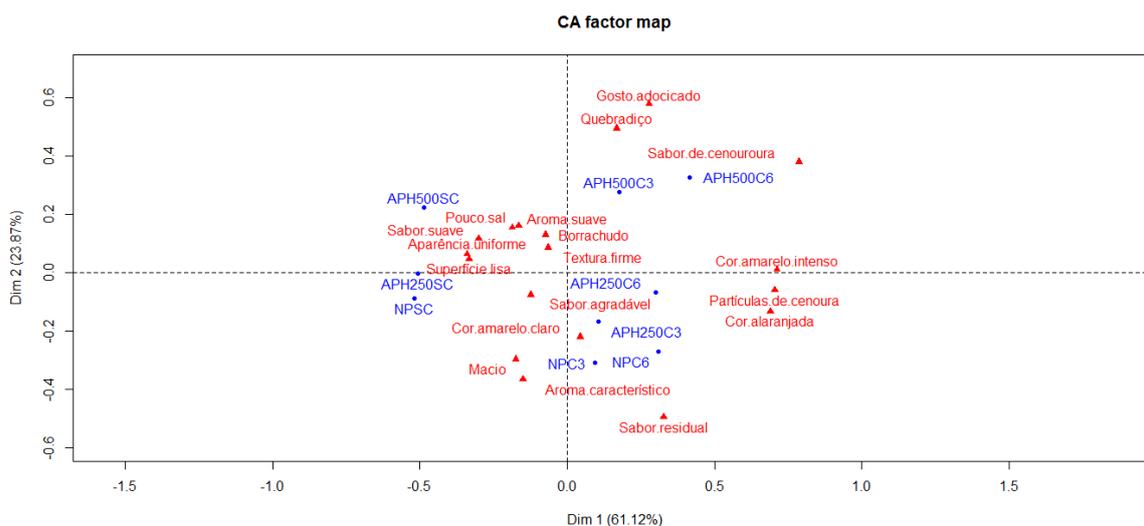
NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; APH250SC: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. sem cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; NPC3: queijo não pressurizado com 3% de cenoura; APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura; APH500C3: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. com 3% de cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH250C6: queijo pressurizado a 250/10 min. com 6% de cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 mi. com 6% de cenoura

Podemos observar que os consumidores perceberam e diferenciaram os queijos adicionados de cenoura uma vez que não marcaram os termos sabor cenoura, partículas de cenoura e cor alaranjada para as amostras que não foram incorporadas de cenoura.

As amostras pressurizadas a 500 MPa incorporadas com 3% e 6% de cenoura apresentaram maiores menções dos termos sabor adocicado que as demais amostras, sugerindo que o maior nível de pressão pode ter intensificado o sabor doce das amostras incorporadas com cenoura. Pode-se verificar, também, que o termo aroma característico teve altas menções para todas as amostras, com exceção das amostras pressurizadas a 500 MPa.

As amostras não pressurizadas e adicionadas de 3 e 6% de cenoura foram mais percebidas como possuindo sabor residual, do que as pressurizadas em 500 MPa. Estas amostras também tenderam a ter menos sabor suave. Este termo foi mais marcado para as amostras com cenoura e pressurizadas do que para as amostras com cenoura não pressurizadas. Esses resultados podem demonstrar uma influência da pressurização na redução do sabor de cenoura.

A representação dos atributos CATA e das amostras dos queijos Minas Frescal pela análise de correspondência (AC) são apresentadas na Figura 19. A primeira e a segunda dimensões explicaram 85% da variância dos dados experimentais, com 61.12% na primeira dimensão e 23.87% na segunda dimensão.



**Figura 17-** Mapa de correspondência de análise

NPSC: queijo não pressurizado sem cenoura; APH250SC: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. sem cenoura; APH500SC: queijo pressurizado a 500 MPa/10 min. sem cenoura; NPC3: queijo não pressurizado com 3% de cenoura; APH250C3: queijo pressurizado a 250 MPa/10 min. com 3% de cenoura; NPC6: queijo não pressurizado com 6% de cenoura; APH250C6: queijo pressurizado a 250/10 min. com 6% de cenoura; APH500C6: queijo pressurizado a 500 MPa/10 mi. com 6% de cenoura.

A primeira dimensão separou as amostras sem cenoura daquelas adicionadas de cenoura. Os queijos *NPSC*, *APH250C0*, *APH500C0* foram descritos como tendo aroma suave, sabor suave, aparência uniforme, textura firme, aroma característico, macio, superfície lisa e borrachudo, os quais, com exceção da última são características do queijo Minas Frescal.

As amostras adicionadas de cenouras foram percebidas como tendo gosto adocicado, quebradiço, sabor de cenoura, cor amarelo intenso, cor alaranjada, cor amarela claro, partículas de cenoura e sabor residual.

A segunda dimensão separou as amostras em dois grupos relacionados à pressão aplicada. Observa-se que os queijos *APH500C0*, *APH500C3*, *APH500C6* todos processados no nível mais alta de pressão ficaram separados das amostra *NPC3* e *NPC6*, queijos nos quais a alta pressão não foi aplicada. Observa-se que as amostras adicionadas de cenouras foram percebidas com sabor de cenoura, gosto adocicado e quebradiço. Estas duas amostras possuem em comum a pressurização a 500 MPa.

O termo pouco sal, embora tenha diferido significativamente entre as amostras, teve alta frequência de menção para todas. De modo geral o processamento por alta pressão hidrostática aparentemente não influenciou na percepção do gosto salgado. Esta tecnologia vem sendo relatada pela maior difusão do sal nos queijos, ou seja, contribui para a melhor distribuição do sal na massa (MARTINEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2012) que potencialmente poderia aumentar a percepção do gosto salgado no produto (RODRIGUES *et al.*, 2016). Osturk *et al.*, (2013) reportaram resultados semelhantes aos apresentados no presente estudo em relação a percepção de sal em tipo de queijo distinto. Os autores observaram que a aplicação da alta pressão hidrostática (405 MPa/3 min) em queijos Cheddar produzidos com diferentes concentrações de sal não alterou as propriedades sensoriais dos queijos.

Mudança na textura provocada pelo processamento por alta pressão em queijos maturados vem sendo relatado na literatura (SALDO *et al.*, 2000; DELGADO *et al.*, 2012). Uma das hipóteses refere-se à mudança na rede proteica da matriz do queijo causada pela alta pressão que poderia alterar a microestrutura do alimento e, por sua vez, a textura (JUAN *et al.*, 2008; EVERT-ARRIAGADA *et al.*, 2014). Em queijos frescos a avaliação de características como a textura ainda está incipiente e estudos sobre os efeitos dos parâmetros pressão/tempo/temperatura nas características sensoriais são necessários. Evert-Arriagada *et al.*, (2014) avaliaram sensorial e instrumentalmente a textura de queijos frescos pressurizados a 500 MPa por 5 minutos a 16°C e observaram que os queijos ficaram mais firme do que os não pressurizados. No presente estudo pode ser observado na dimensão 2 que os queijos adicionados de cenoura e pressurizados tenderam a ser mais firme do que os com cenoura não pressurizados. E os queijos pressurizados a 500 MPa (independentes da concentração de cenoura, tenderam a ser menos macio e borrachudos (*APH500SC*), *APH500C3*) e *APH500C6*).

## 5 CONCLUSÃO

A incorporação de cenoura no queijo Minas Frescal, a partir dos ajustes realizados no processo de fabricação (definição da proporção de cenoura no leite, do teor de coagulante, do processo de mistura, entre outros), possibilitou o desenvolvimento de um produto em conformidade como Padrão de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal bem como proporcionou um incremento nos teores de luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno no produto. A adição desses carotenoides permitiu o enriquecimento do produto com provitaminas A e antioxidantes, os quais vêm sendo associados a benefícios extras para a saúde do consumidor, além da nutrição básica, propiciando ao produto um diferencial associado ao apelo de saudabilidade, com perspectivas promissoras de reverter em inovação e agregação de valor.

Os queijos desenvolvidos com a incorporação de 3% de cenoura apresentaram boa aceitação pelos consumidores, em níveis similares ao queijo Minas Frescal convencional, tendo sido caracterizados sensorialmente como apresentando sabor de cenoura, sabor agradável, cor alaranjada, partículas de cenoura, aroma característico e gosto adocicado.

A aplicação da alta pressão hidrostática não afetou a composição centesimal dos queijos, e impactou minimamente na cor destes produtos. Apesar da redução ocasionada pelo processo de alta pressão no teor de carotenoides, acentuada pelo aumento do nível de pressão empregado no processamento, os teores de carotenoides encontrados permaneceram em níveis elevados no produto pressurizado.

Salienta-se que o processamento por alta pressão hidrostática a 500 MPa por 10 minutos nos queijos foi eficiente na inativação da *Listeria innocua*, reduzindo em mais de 7 log a população deste micro-organismo, comumente utilizado indicador de efetividade na inativação de patógeno de grande incidência e preocupação com esse tipo de produto. Por outro lado, o aumento da concentração em níveis de 6% resultou em diminuição da aceitação do produto, tanto no produto pressurizado como no produto não submetido ao tratamento por APH.

O processo combinado, compreendendo a pressurização a 250 MPa e incorporação de 3% de cenoura, além de ter resultado em manutenção dos teores de carotenoides em níveis elevados e aceitação equivalente ao queijo convencional, pode supostamente propiciar um aumento da validade comercial desse produto, a partir da inativação de outros microrganismos patogênicos e deteriorantes. Tais aspectos devem ser investigados em estudos futuros de modo a melhor consubstanciar a perspectiva de implementação industrial do processo combinado, bem como um aprofundamento no estudo da viabilidade econômica do processo.

De todo modo, a adição da cenoura, combinada ou não com o processo por alta pressão em níveis intermediários da concentração estudada (3%), proporcionou um incremento significativo nos teores de luteína,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno no queijo Minas Frescal, permitindo o enriquecimento do produto com provitaminas A e antioxidantes, os quais vêm sendo associados a benefícios extras para a saúde do consumidor, além da nutrição básica. Desse modo, o processo pode propiciar ao produto um diferencial associado ao apelo de saudabilidade, com perspectivas promissoras de reverter em inovação e agregação de valor, com potencial de contribuição para o desenvolvimento do setor lácteos e originar uma nova linha de pesquisa envolvendo a incorporação de vegetais com potencial funcional, bem como a perspectiva de aplicação de alta pressão a queijos frescos de importância para o mercado consumidor brasileiro.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ALMEIDA, R. MAGALHÃES, L. CARNEIRO, I. SANTOS, J. SILVA, V. FERREIRA, T. HOGG, P. TEIXEIRA. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, p. 303-309, 2013.
- ANDRÉS, V. VILLANUEVA, M. J. TENORIO, M. D. The effect of high-pressure processing on colour, bioactive compounds, and antioxidant activity in smoothies during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 192, p.328–335, 2016.
- ANDRÉS, V. VIVARACHO, L. M . GUILLAMÓM, E. VILLANUEVA, M. J. TENORIO, M.D. High hydrostatic pressure treatment and storage of soy-smoothies: colour, bioactive compounds and antioxidant capacity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 123-130, 2016.
- AOAC – **Association of Official Analytical Chemists**. 18 ed., 3ª rev, 2010.
- AOCS. **American Oil Chemists' Society. Official Method Am 5-04**, Rapid determination of oil/fat utilizing high temperature solvent extraction. Urbana: Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society, 2005.
- ARQUÉS JL, RODRÍGUEZ E, GAYA P. Effect of combinations of high-pressure treatment and bacteriocin-producing lactic acid bacteria on the survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk cheese. **International Dairy**, v. 15, p. 893–900, 2005
- BALASUBRAMANIAM, V.M, FARKAS, D., AND TUREK, E.J. Preserving foods through highpressure processing. **Food Technology**, v. 62, p.11, 32-38, 2008.
- BARANCELLI, G. V. CAMARGO, T.M. GAGLIARDI, N. G. PORTO, E. SOUZA, R. A. CAMPIONI, F. FALCÃO, J.P. HOFER, E. CRUZ, A. G. OLIVEIRA, C. A. F. Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 21–29, 2014.
- 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.
- BECKERS, H. J. SOENTORO, P. S. S. DELFGOU-VAL ASCH, E. H. M. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, p. 249-256, 1987.
- BERNSTEIN P.S, LI, B. VACHALI, P.P, GORUSUPUDI, A. SHYAM, R. HENRIKSEN, B. S.NOLAN, J. M. Lutein , zeaxanthin , and meso-zeaxanthin : The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 50, p. 34-66, 2016.
- BEUCHAT, L.R, BRACKETT, R.E. Inhibitory effects of raw carrots on *Listeria monocytogenes*. **Application Environmental Microbiology** v.56, p. 1734–1742, 1990.

BEUCHAT, L.R, DOYLE M.P. Survival and growth of *Listeria monocytogenes* in foods treated or supplemented with carrot juice. **Food Microbiology**,v.12, p.73–80, 1995.

BLEOANC, I. SAJE, K. MIHALCEA, L. ONICIUC , E. A. SMOLE-MOZINA , S. NICOLAU , A. I. BORDA, DContribution of high pressure and thyme extract to control *Listeria monocytogenes* in fresh cheese - A hurdle approach. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 38, p. 7–14, 2016.

BONILLA , J. VARGAS, F.C. OLIVEIRA, T.G. MAKISHI , G. L. A. SOBRAL, P. J. Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 1–7, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria n 352, de 04 de setembro de 1997**. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Brasília: Diário Oficial da União, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n 4, de março de 2004**. Altera o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Brasília: Diário Oficial da União, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n 9 de abril de 2009**. Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n 31, de 13 de janeiro de 1998**. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. Diário Oficial da União, 13 de janeiro de 1998.

BRITO, J.R.F. SANTOS, E.M.P. ARCURI, E.F. Retail Survey of Brazilian Milk and Minas Frescal Cheese and a Contaminated Dairy Plant To Establish Prevalence , Relatedness , and Sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. **Application Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4954-4961, 2008.

BURITI, F.C.A, ROCHA, J.S. SAAD, 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, p. 1279-1288, 2005.

CAPELLAS, M. MOR-MUR M, SENDRA E, GUAMIS B.Effect of high-pressure processing on physico-chemical characteristics of fresh goats ' milk cheese Mato. **International Dairy Journal**, v. 11, p.165–173, 2001.

CARTWRIGHT, E.J. et al. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v.19, p.1-9, 2013.

CARVALHO, R.J. SOUZA, G.T, HONÓRIO, V.G. Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v.52, p. 59–65, 2015.

CDC (CENTRE FOR DISEASE CONTROL and PREVENTION). **Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc. (Final Update)**. Disponível em <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html>> Acesso em 26 nov. 2016.

CHAWLA R, PATIL GR, SINGH AK. High hydrostatic pressure technology in dairy processing: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 260–268, 2011.

CHEN, D. PANG, X. ZHAO, J. GAO, L. LIAO, X. WU, J. LI, Q. Comparing the effects of high hydrostatic pressure and high temperature short time on papaya beverage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 94, p.1061–1068, 2012.

CHEFTEL, J.C. High-pressure, microbial inactivation and food preservation. **Food Science and Technology International**, v.1, p. 75-90, 1995.

CHIRIFE, J. FAVETTO, G. Some physico-chemical basis of food preservation by combined methods. **Food Research International**, v. 25, p.389-386, 1992.

COELHO, M.C. SILVA, C.C.G. RIBEIRO, S.C. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p. 53–9, 2014.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Conjuntura mensal de leites e derivados**. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_05\\_04\\_17\\_33\\_34\\_leite\\_abril\\_2016.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_05_04_17_33_34_leite_abril_2016.pdf)> acesso em: 20 dez. 2016.

CRUZ, A.G. FARIA, J. A. F. SAAD, S. M. I. BOLINI, H. M. SANTANA, A.S. CRISTIANINI, M. A High pressure processing and pulsed electric fields: potential use in probiotic dairy foods processing. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 483–493, 2010.

DELGADO, F.J. GONZALEZ-CRESPO, J. CAVA, R. RAMIREZ, R. The influence of high hydrostatic pressure on regular, reduced, low and no salt added Cheddar cheese. **LWT - Food Science and Technology**, v. 48, p. 268-275, 2012.

DE PAULA, J. C. J. CARVALHO, A. F. FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista Instituto de Laticínio Candido Tostes**, v. 64, p. 19–25, 2009.

EUROMONITOR INTERNATIONAL. **Cheese in Brasil**. 2015. Disponível em: <<http://www.euromonitor.com/cheese-in-brazil/report>> Acesso em: 13.09.2015.

EVRENDILEK, G. A.; KOCA, N.; HARPER, J. W.; BALASUBRAMANIAM, V. M. High-pressure processing of turkish white cheese for microbial inactivation. **Journal of Food Protection**. n. 1, p. 102-108, 2008.

EVERT-ARRIAGADA, K. HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M, JUAN, B. GUAMIS, B. TRUJILLO, A. J. Effect of high pressure on fresh cheese shelf-life. **Journal of Food Engineering**, v. 110, p. 248–253, 2012.

EVERT-ARRIAGADA, K. GUAMIS, B. TRUJILLO, A. J. Commercial application of high-pressure processing for increasing starter-free fresh cheese shelf-life. **LWT - Food Science and Technology**, v.55, p. 498–505, 2014.

EVRENDILEK, G.A AND BALASUBRAMANIAM, V.M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. **Food Control**, v. 22, p. 1435–1441, 2011.

FAO/WHO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS/WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. **Microbiological Risk Assessment Series**. v. 4, p. 1–48, 2004. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream>> Acesso em: 16 set. 2015.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies**. **High pressure processing**. 2014. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses/ucm101456>>. Acesso em: 05 out. 2015.

FDA (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION). **Quantitative Assessment of Relative Risk to Public Health From Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods**. 2003. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/UCM197330.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

FERNANDES, A. M; SORATTO, R. P; EVANGELISTA, R. M; NARDIN, I. Qualidade físico-química e de fritura de tubérculos de cultivares de batata na safra de inverno. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 3, p. 299-304, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATIONS OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Milk production**. Disponível em: <<http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.WCc-aPorLIU>>. Acesso em: 12 nov. de 2016.

GAYAN, E. TORRES, A. J. PAREDES-SABJA, D. Hurdle Approach to Increase the Microbial Inactivation by High Pressure Processing: Effect of Essential Oils. **Food Engineering Review**, n. 4, p. 141–148, 2012.

GALLOT-LAVALLÉE, T. Efficacité du traitement par les hautes pressions sur la destruction de *Listeria monocytogenes* dans les fromages de chèvre au lait cru. **Sciences des Aliments**, v. 18, p. 674-655, 1998.

GERVILLA R, CAPELLAS M. ERRAGUT, V. GUAMIS, B. Effect of High Hydrostatic Pressure on *Listeria innocua* 910 CECT Inoculated into Ewe's Milk. **Journal of Food Protection**, v.60, p.33–37, 1995.

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

HEISICK, J. E.; WAGNER, D. E.; NIERMAN, M. L.; PEELER, J. T. *Listeria* spp. found on fresh market produce. **Applied and Environmental microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1925–7, 1989.

HITE, B. H. The effect of pressure in the preservation of milk. **West Virginia Agricultural Experiment Station bulletin**. v. 58, p. 15-35, 1998.

HNOSKO, J. GONZALEZ, M.F.S. CLARK, S. High-pressure processing inactivates *Listeria innocua* yet compromises Queso Fresco crumbling properties. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p.4851–4862, 2012.

HUANG, W. BI, X. ZHANG, X. LIAO, X. HU, X. WU, J. Comparative study of enzymes, phenolics, carotenoids and color of apricot nectars treated by high hydrostatic pressure and high temperature short time. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 74-82, 2013.

HUANG, H. LUNG, H. YANG, B. B. WANG, C. Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. **Food Control**, v. 40, p. 250–259, 2014.

HUANG, H. WU S, LU, J. SHYU, Y. WHANG, C. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. **Food Control**, n. 72, p. 1–8, 2017.

HUPPERTZ, T. FOX, P.F. KELLY, A. L. Properties of casein micelles in high pressure-treated bovine milk. **Food Chemistry**, v. 87, p. 103–110, 2004.

HUPPERTZ, T. FOX, P.F. KRUIF, K. G. D. KELLY, A. L. High pressure-induced changes in bovine milk proteins: A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 593–598, 2006.

JERMANN, C. KOUTCHMA, T. MARGAS, E. LEADLEY, C. ROS-POLSKI, V. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p.14–27, 2015.

JUAN, B. FERRAGUT, V. GUAMIS, TRUJILLO, A. J. The effect of high-pressure treatment at 300 MPa on ripening of ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 129–138, 2008.

KARATZAS, A.K. KETS, E.P.W. SMID, E.J. BENNIK, M. H.J. The combined action of carvacrol and high hydrostatic pressure on *Listeria monocytogenes* Scott A. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 463-469, 2001.

KOCA, N. BALASUBRAMANIAM, V. M. HARPER, W. J. High-Pressure Effects on the Microstructure, Texture, and Color of White-Brined Cheese. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 399–404, 2011.

LIAO, C. H. Inhibition of foodborne pathogens by native microflora recovered from fresh peeled baby carrot and propagated in cultures. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 4, p. 134–139, 2009.

LINTON, M. MACKLE, A. B. UPADHYAY, V. K. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: A comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 423–428, 2008.

LOPEZ-PENDEMONT, R. S. Reduction of counts of *Listeria monocytogenes* in cheese by means of high hydrostatic pressure. **Food Microbiology**, v. 24, p. 59–66, 2007.

MAGENIS R, SCHWINDEN E, FRITZEN-FREIRE CB. Rheological, physicochemical and authenticity assessment of Minas Frescal cheese. **Food Control**, v. 45, p. 22–28, 2014.

MARSHALL, V. M. Inoculated ecosystems in a milk environment. **Journal of Applied Microbiology**, v. 73, n. 21, p. 127-135, 1992.

MARTINEZ, S. Introduction of New Food Products With Voluntary Health- and Nutrition-Related Claims, 1989-2010. **Economic Information Bulletin** n. 108, 2013.

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

MCGUIRE RG. 1992. Reporting of objective color measurements. **Horticultural Science**, v. 27, n. 12, p. 1254-1255, 1992.

MELO, J. ANDREW, P. W. FALEIRO, M. L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. **Food Research International**, v. 67, p. 75-90, 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 set. 2015.

MORO, A. LIBRAN, C. M, BERRUGA, M. I, CARMONA, N. ZALACAIN, A. Dairy matrix effect on the transference of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1507-1513, 2014.

NEGI, O. S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 7–17, 2012.

NORIEGA, E. NEWMAN, J. SAGGERS, E. ROBERTSON, J. LACA, A. DIAZ, M. BROCKLEHURST, T. Antilisterial activity of carrots: Effect of temperature and properties of different carrot fractions. **Food Research International**, v. 43, p. 2425–2431, 2010.

OKPALA, C. O. R. PIGGOTT, J. R. SCHASCHKE, C. J. Influence of high-pressure processing ( HPP ) on physico-chemical properties of fresh cheese. **Innovative Food Science Emerging Technology**, v.11, p. 61–67, 2010.

OLIVEIRA T.L.C .RAMOS, A.L.S. RAMOS, E.M. PICCOLI, R. H. CRISTIANINI, M. Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. **Trends Food Science and Technology**, v.45, p. 60–85, 2015.

OZTRUK, M. GOVINDASAMY-LUCEY, S. JAEGGI, J. JOHNSIN, M.E. LUCEY, J.A. The influence of high hydrostatic pressure on regular, reduced, low and no salt added Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 33, p.175-183, 2013.

PACHECO, S.; GODOY, R. L. O.; PEIXOTO, F. M.; GOUVÊA, A. C. M. S.; SANTIAGO, M. C. P. A.; FELBERG, I.; BORGUINI, R. G. Preparation of high purity analytical standards using high performance liquid chromatography in analytical scale. **Analytical Chemistry: An Indian Journal**, v. 12, n. 5, p. 194-197, 2014.

PATTERSON, M. F. MCKAY, A. M. CONNOLLY, M. LINTON, M. The effect of high hydrostatic pressure on the microbiological quality and safety of carrot juice during refrigerated storage. **Food Microbiology**, v. 30, p. 205–212, 2012.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, p. 1–14, 2014.

RASTOGI, N. K. RAGHAVARAO, K. M. S. BALASUBRAMANIAM, V. M. NIRANJAN, K. KNORR, E. D. Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 1, p. 69-112, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**, 2001. 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Fontes Brasileiras de Carotenóides: tabela brasileira de carotenóides em alimentos. Brasília MMA/SBF, 2008. 100 p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Status of carotenoid analytical methods and in vitro assays for the assessment of food quality and health effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 1, p. 56–63, 2015.

RODRIGUES, F. M. **Efeito da alta pressão hidrostática sobre as propriedades físico químicas, microbiológicas e sensoriais de queijo Minas Frescal com redução de sódio**. 2016. 115f. Tese (Tese em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.

RODRIGUES, F.M. ROSENTHAL, A . TIBURSKI, J.H. CRUZ, A. G. Alternatives to reduce sodium in processed foods and the potential of high pressure technology. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, p. 1-8, 2016.

SAINI, R. K. NILE, S. H, PARK, S. W. Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735–750, 2015.

SALDO, J. SENDRA, E. GUAMIS, B. High Hydrostatic Pressure for Accelerating Ripening of Goat ' s Milk Cheese : Proteolysis and Texture. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 65, p. 636–640, 2000.

SALVIA-TRUJILLO, L. QIAN, C. MARTÍN-BELLOSO, O. McClements. Influence of particle size on lipid digestion and  $\beta$ -carotene bioaccessibility in emulsions and nanoemulsions. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1472–1480, 2013.

SANDRA, S. STANFORD, M. A. GODDIK, M. L. The Use of High-pressure Processing in the Production of Queso Fresco Cheese. **Food Engineering and Physical Properties**, n. 69, p. 153–158, 2004.

SCOLLARD, J. FRANCIS, G. A. O'BEIRNE, D. Some conventional and latent anti-listerial effects of essential oils, herbs, carrot and cabbage in fresh-cut vegetable systems. **Postharvest Biology and Technology**, v. 77, p. 87–93, 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**, n. 49, p. 22–32, 2012.

SMELT, J. P. P. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. **Trends in Food Science and Technology**, n. 9, p. 152–158, 1998.

SOBRAL, D. COSTA, R. G. B. TEODORO, V. A. M. MOREIRA, G.M. M. PAULA, J. C. J. NOVAES, T. O. Quantificação e Porcentagem De Recuperação De Luteína Adicionada Na Fabricação De Queijo Prato Esférico. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n.6, p. 405-414, 2014.

STAHL, W. SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1740, p. 101–107, 2005.

STONE, H., SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3 ed. New York: Academic Press, 338p, 1993.

SULLIVAN, B. M. M. KELLY, A.L. FOX, P. F. Influence of transglutaminase treatment on some physico-chemical properties of Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 433-442, 2002.

TACO (TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS/NEPA UNICAMP), 4 ed; Campinas, SP: NEPA-UNICAMP, 2011. 161p.

TAYEL, A. A. HUSSEIN, H. SOROUR, N. M. EL-TRAS, W. F. Foodborne Pathogens Prevention and Sensory Attributes Enhancement in Processed Cheese via Flavoring with Plant Extracts. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2886-M2891, 2015.

TOMASULA, P. M, RENYE, J. A, HEKKEN, D. L. VAN, HEKKEN, D. L. TUNICK, M. H. KWOCZAK, R. TOHT, M. LEGGETT, L. N. LUCHANSKY, J. B. PORTO-FETT, A. C. S. PHILLIPS, J. G. Effect of high-pressure processing on reduction of *Listeria monocytogenes* in packaged Queso Fresco. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1281–1295, 2014.

TRUJILLO, A.J. CAPELLAS, M. BUFFA, M. ROYO, C. GERVILLA, R. FELIPE, X. SENDRA, E. SALDO, J. FERRAGUR, V. GUAMIS, B. Application of high pressure treatment for cheese production. **Food Research International**, v. 33, p. 211-316, 2000.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE). **Dairy: World Markets and Trade**. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/data/dairy-world-markets-and-trade>>. Acesso em: 12 nov. 2016.

VERMA, R. S. PADALIA, R. C. CHAUHAN, A. Chemical composition variability of essential oil during ontogenesis of *Daucus carota* L. subsp. *sativus* ( Hoffm. ) Arcang. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 809–814, 2014.

ZOCCAL, R. Queijos: produção e importação. **Revista Balde Cheio**. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>> acesso em 13 dez. 2016.

WU, Y. XU, Z. LI, HONG. MENG, X. Components of essential oils in different parts of *Daucus carota* L. var. *sativa* Hoffm. **Chemical Research in Chinese University**, v. 22, n. 3, p. 328-334, 2006.

## 7 APÊNDICE

**Anexo I** – Ficha dos testes de avaliação global e questionário *check-all-that-apply* (CATA).

Você está recebendo uma amostra de Queijo Minas Frescal incorporado com cenoura e/ou processado por alta pressão hidrostática. Por favor, prove e avalie o quanto gostou ou desgostou utilizando a escala abaixo.

<input type="checkbox"/>									
Gostei Extremamente									Desgostei Extremamente

Marque todos os termos que você considera adequado para descrever esse queijo

- |                                           |                                                         |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sabor de cenoura | <input type="checkbox"/> Quebradiço                     |
| <input type="checkbox"/> Sabor suave      | <input type="checkbox"/> Aroma característico de queijo |
| <input type="checkbox"/> Sabor agradável  | <input type="checkbox"/> Aroma suave                    |
| <input type="checkbox"/> Sabor residual   | <input type="checkbox"/> Cor alaranjada                 |
| <input type="checkbox"/> Adocicado        | <input type="checkbox"/> Cor amarelo claro              |
| <input type="checkbox"/> Pouco sal        | <input type="checkbox"/> Cor amarelo intenso            |
| <input type="checkbox"/> Textura firme    | <input type="checkbox"/> Aparência uniforme             |
| <input type="checkbox"/> Macio            | <input type="checkbox"/> Partículas de cenoura          |
| <input type="checkbox"/> Borrachudo       | <input type="checkbox"/> Superfície lisa                |

**Anexo II** – Tabelas – Análises de variância para obtenção dos modelos das variáveis de resposta a partir da significância das variáveis independentes

**Tabela 1**- Efeito da concentração de cenoura e do tratamento de alta pressão hidrostática sobre o teor de carotenóides totais, Luteína,  $\alpha$ - caroteno e  $\beta$ - caroteno no queijo Minas Frescal

Variáveis	Carotenóides Totais $\mu\text{g}/100\text{g}$		Luteína $\mu\text{g}/100\text{g}$		$\alpha$ -caroteno $\mu\text{g}/100\text{g}$		$\beta$ -caroteno $\mu\text{g}/100\text{g}$	
	Efeito	p	Efeito	P	Efeito	p	Efeito	p
Pressão (MPa)	-404,7	0,141	-1,25	0,856	-213,2	0,250	-162	0,839
% cenoura	2007,2	0,002	52,25	0,0134	795,7	0,0268	997,5	0,0065

**Tabela 2** - Efeito da concentração de cenoura e do tratamento de alta pressão hidrostática sobre os parâmetros de cor L\*, a\*, b\* e C\* no queijo Minas Frescal

Variáveis	L*		a*		b*		C*	
	Efeito	p	Efeito	P	Efeito	p	Efeito	p
Pressão (MPa)	-1,240	0,0578	1,095	0,0504	-0,200	0,8729	0,145	-4,5007
% cenoura	-7,580	0,0016	13,125	0,0003	12,800	0,0073	15,585	10,9392

**Tabela 3** - Efeito da concentração de cenoura e do tratamento de alta pressão hidrostática sobre o teor de umidade, proteína, extrato etéreo e RMF no queijo Minas Frescal

Variáveis	Umidade		Proteína		Extrato etéreo		RMF	
	Efeito	p	Efeito	P	Efeito	p	Efeito	p
Pressão (MPa)	4,235	0,221	-0,200	0,707	-1,410	0,253	-0,030	0,672
% cenoura	2,875	0,356	-0,700	0,268	-1,230	0,300	-0,170	0,108

**Tabela 4** - Efeito da concentração de cenoura e do tratamento de alta pressão hidrostática sobre a contagem da *Listeria innocua* no queijo Minas Frescal

Variáveis	Contagem de <i>Listeria innocua</i>	
	Efeito	p
Pressão (MPa)	-7,540	0,00008
% cenoura	0,160	0,15040

**Plant extract and essential oils added as antimicrobials to cheeses: a review**

**Extratos vegetais e óleos essenciais adicionados a queijos como antimicrobianos: uma  
revisão**

**-REVIEW-**

**ABSTRACT**

Cheese is a food that is highly susceptible to contamination by pathogenic and spoilage microorganisms, which can result in a decrease in its shelf life and cause serious risks to the consumers' health. Consumers always require healthy food, free of synthetic preservatives, inducing a search for natural alternatives to ensure safety of the products. Essential oils and plant extracts emerge as an alternative for aiding cheese preservation. Some substances have demonstrated good effects against most pathogens and cheese spoilage microorganisms. However, intrinsic and extrinsic factors may influence the actions of these compounds when incorporated into cheese, besides affecting the product characteristics. This review aims at discussing the antimicrobial efficiency of plant extracts and essential oils as well as the impact of their incorporation of lactic bacteria and the sensory characteristics of the products.

**Keywords:** Cheese, natural antimicrobial, essential oil, plant extract.

**RESUMO**

O queijo é um alimento muito susceptível a contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes, que podem ocasionar desde a diminuição da validade comercial até sérios riscos à saúde do consumidor. O consumidor vem demandando cada vez mais alimentos saudáveis e livres de conservantes sintéticos, induzindo à busca de alternativas naturais para garantir a segurança dos produtos. Os extratos de plantas e óleos essenciais surgem como alternativa

promissora para auxiliar na conservação do produto, demonstrado boa eficiência contra os principais microrganismos patogênicos e deteriorantes do queijo. No entanto, fatores inerentes ao alimento, assim como fatores extrínsecos, podem influenciar na ação destes compostos quando incorporados ao queijo, além de impactar nas características do produto. Desta forma, esta revisão pretende analisar a eficiência antimicrobiana de extratos de plantas e óleos essenciais no queijo, bem como o impacto da sua incorporação nas bactérias ácido lácticas e nas características sensoriais do produto.

**Palavras-chaves:** queijo, antimicrobiano natural, óleos essenciais, extratos de plantas.

## INTRODUCTION

Cheese is a food consumed worldwide. Its production from different types of milk and technologies enables people to obtain hundreds of product varieties. Due to its pleasant taste, high biological protein value, and as it is perceived as a healthy food, its consumption has increased in recent years.

On account of the high-handling manufacturing process, inadequate cold chain, and ready-to-eat characteristics, cheeses are very susceptible to contamination by pathogenic and spoilage microorganisms, which can decrease the shelf life, entailing recalls, and leading to a risk to the consumer's health. Among the pathogens, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella* spp. are often associated with food outbreaks from the consumption of cheese (HASSANIEN *et al.*, 2014).

On the other hand, driven by the concern about health and well-being, consumers have demanded safer and healthier food, free of synthetic preservatives, which are often considered harmful and carcinogenic substances (MORO *et al.*, 2015).

In order to meet the new demands from the consumers and also increase market competitiveness through product differentiation, the food industry and research institutions have been looking for natural preservatives as alternatives to synthetic ones.

Aromatic and medicinal plants are already used in pharmaceutical industries for their active ingredients and in food industries as flavorings. More recently, because of the potential antimicrobial effect they have attracted the increased interest of food scientists and technologists (COSTA *et al.*, 2015), as natural preservatives. Thus, the aim of this review lies in the potential effect of the addition of herbs, medicinal extracts, and essential oils to cheeses. They are added to act against major pathogens and spoilage microorganisms, as well as for their implication on the product's characteristics.

### **Aromatic plants and essential oils**

Aromatic plants are defined as plant species with characteristic aromas and/or tastes, whose importance lies in having volatile components in denominated essential oils, with specific properties. These substances make them helpful to be used in different applications, for example, in comestic and pharmaceutical industries. These compounds are secondary metabolites that can accumulate in leaves, roots, flowers, and seeds (FORLIN, 2012). They commonly have biological functions in plants related to defense mechanisms against infections, excessive ultraviolet (UV), and herbivory (COSTA, 2015). Among aromatic plants, there are some subgroups of plants that include herbs and spices, which are used in food (LIBRAN *et al.*, 2013). In recent years research has shown that these compounds may also have antimicrobial activity with potential application for food preservation (CALO, 2015).

Plant extracts are concentrated preparations of several possible compositions and consistencies, obtained from dried plant materials by steam distillation, cold pressing or solvent extraction, preceeded or not by pretreatments. The most common processes used for

extraction may also involve maceration, infusion, decoction, digestion, percolation, distillation, and drying (FIB, 2010). Essential oils (EOs) are aromatic oily liquids constituted of a mixture of volatile compounds of low molecular weight groups, such as, terpenoids, phenylpropanoids, and sulfur- and nitrogen-containing compounds. Besides the traditional methods, new extraction methods such as ultrasonic, microwave, and supercritical fluid extraction have been investigated (DIMA & DIMA, 2015).

In plant extracts and EOs, the components found in higher concentrations and related to antimicrobial activity are phenolic compounds, such as, thymol, eugenol, carvacrol, and also constituents such as linalool, sabinene, menthol, myrcene, and camphene (MORO *et al.*, 2013; ASENSIO *et al.*, 2015), which explains their different antimicrobial and antifungal properties.

The concentration of these compounds in plant extracts and EOs are determined by genetics, however external factors such as climate and soil, plant management and phenological stage may change their concentration. These variations have been a limitation for the use of plant extracts and EOs in food, due to the lack of a standardized concentration of these bioactive compounds to be utilized from each plant source. Therefore, it is difficult to define and measure the specific quantity of plant material to be added, to ensure an expected antimicrobial effect in food, in addition to the need of analytical methods for a more accurate determination of these compounds (CALO *et al.*, 2015).

Another important aspect in the use of plants and their constituents in food is the toxicity. Although aromatic plants that can be used in food preparation have been applied for a long time, there is no typical toxicological information such as acceptable daily intake (ADI) or observed adverse effect (NEGI, 2012). On the other hand, the EO herbs are usually classified as substances Generally Recognized as Safe (GRAS) (FDA, 2015).

### **Mechanisms of Action**

The mechanism of action of plant extracts and EOs have not been completely established yet. However, studies indicate that compounds of different chemical groups present in these substances are generally able to act on more than one target in the cell, such as, in the permeabilization or disruption of the cytoplasmic membrane, allowing the passage of nonspecific compounds or the release of cytoplasmic contents, respectively (GILL & HOLLEY, 2006A; ZHANG *et al.*, 2016). In addition, they may inhibit the ATPase enzyme responsible for energy generation of the cell, leading to cell death (GILL & HOLLEY 2006B). DIAO *et al.* (2014) found that the increase of concentration and treatment time with fennel seed EOs (*Foeniculum vulgare* Mill.) resulted in a proportional increase of the cell membrane permeability of *Shigella dysenteriae*, causing the release of intracellular compounds, especially potassium, calcium, and sodium ions. The leakage of cytoplasmic content was also observed in cells of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* exposed to cinnamon EO, being also observed as a correlation between the concentration of EO and the leakage increase of cytoplasmic content (ZHANG *et al.*, 2016). BAPJAI *et al.* (2013) also reported that the accumulation of *Cudrania triscupidata* EO led to a significant release of cytoplasmic materials, including leakage of potassium ions responsible for the charge balance in the membrane, causing irreversible damage to *Bacillus cereus* and *Escherich coli* cells.

### **Incorporation of Extracts and Essential Os in cheese**

Extracts and EOs of aromatic and medicinal plants such as fennel, oregano, rosemary, dill, cumin, pepper, sage, thyme, and parsley demonstrated satisfactory *in vitro* antimicrobial activity against pathogens and spoilage microorganisms associated with cheese contamination (MORON *et al.*; CALEJA *et al.*; 2015; HASSANIEN *et al.*, 2014) thus indicating great potential in their use as preservatives. However, those values obtained *in vitro* cannot be reported as strictly true for food due to the complexity of the food matrix, in which the

intrinsic and extrinsic factors interfere with the activity of these compounds (CALO *et al.*, 2015).

One of the intrinsic factors that undermines the effectiveness of these natural antimicrobial agents is the lipid content and protein present in food. These substances can wrap the surface of the microorganism, forming a physical barrier that prevents contact of the bioactive compound with the microorganism thus reducing the efficacy of the natural compound (FABBOOD *et al.*, 1976). GUTIERREZ *et al.* (2008) evaluated the interference of lipid in the effectiveness of the EO antimicrobial activity of oregano and thyme in a media simulating a food matrix, and they found that the addition of lipids in high concentrations reduced the inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. This effect was also reported by CAVA *et al.* (2007), who found that the antimicrobial activities of cinnamon and clove EOs were lower in milk samples with higher fat content than in skim milk samples, thereby emphasizing the importance of evaluating the interaction of EOs and extracts with the composition of the product.

As cheese is a food with a high content of proteins and lipids, the concentrations of natural compounds to be added to achieve a particular amount of microbiological inhibition should possibly be greater than the ones tested *in vitro* (MORO *et al.* 2015). In accordance with such a proposition, GAMARIELLO *et al.* (2008) reported that the concentration of active compounds used to inhibit the growth of pathogenic microorganisms in cheese Fior di latte was effectively higher than the level tested *in vitro*. A similar finding was reported by SHAN *et al.* (2011), who reported that the minimum inhibitory concentration of pomegranate EO against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*,  $10^5$  CFU/mL each, was higher than 2.5 mg/mL in a culture medium, while the concentration of 40 mg/mL in Cheddar cheese failed to inhibit the same population of those microorganisms. In that study the EO was extracted from pomegranate peel with ethanol 80% at room temperature.

In a similar manner, HASSANIEN et al (2013) found that the concentration of 0.1% black cumin EO resulted in the reduction of growth of *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *Salmonella enteritidis* in a culture medium, while in cheeses, such concentrations were not effective against *S. aureus* and *L. monocytogenes*. These results show that the concentration of plant extracts required also varies according to the microorganism and their sensitivity to the active compounds.

Another factor to be considered in extrapolating the results of antimicrobial activity to real cheese is that this food contains all the necessary *in vitro* nutrients for microbial growth of the culture cell. This aspect coupled with a low content of water (substance required for the transportation of the natural compound to the microorganisms) compared to the culture media, allows faster recovery of cells damaged by natural antimicrobials (SMITH-PALMER *et al.*, 2001).

Beyond the inherent factors regarding the food composition, external factors such as packaging, storage temperature, concentration of the initial inoculums, and the type of microorganism can also interfere with the natural antimicrobial efficiency (BURT, 2004).

The stability of natural compounds must also be taken into account when they are added to food. Such compounds are usually sensitive to oxygen, light, temperature, and pH (DIMA & DIMA, 2015) and may be lost during cheese processing. LIBRAN *et al.* (2013) observed a decrease in the content of compounds from *Ocimum basilicum* EOS (basil) and *Tanacetum vulgare* (tansy) added during the production of cheese. Similarly, Moro *et al.* (2015) reported that 37.49% of the total volatiles of rosemary EO (*Rosmarinus officinalis*) added to sheep milk were lost during cheese production, as a certain portion was lost in the whey. Thus, the concentration of plant extracts and EOs to be determined for incorporation into cheese must supply the possible losses during production and interaction with food, in

order to provide adequate microbiological inhibition (HASSANIEN *et al.*, 2014; MORO *et al.*, 2015).

Hence, studies have been conducted in the food matrix to determine the minimum inhibitory concentration of EOs in foods (GUTIERREZ *et al.*, 2008; TAYEL *et al.*, 2015). In this sense, microencapsulation can also ensure better stability of these compounds during the processing and storage of cheeses, as well as, a gradual release of these antimicrobials during the shelf life of the product (CALEJA *et al.*, 2015).

### **Impact on the sensory properties of the cheese**

The addition of herbs and spices as flavoring in some varieties of cheeses is already a common practice. One of the most popular cheeses of Turkey named Van Herb, for instance, is produced with the addition of 25 different herbs (DAGDELEN *et al.*, 2014). Therefore, the acceptance of cheese with EOs and extracts can be facilitated if consumers are already accustomed to this type of product. However, these components often have a strong flavor even when used in small concentrations, which can also cause a high sensory impact with possible rejection of the product, turning it into a limiting factor in the use of plants and their constituents (MORO *et al.*, 2015). The acceptance of the product is extremely important because, just having a high antimicrobial effect is not sufficient if the consumer does not sensorially approve of it. Among the extracts of plants and EOs added to cheeses, oregano (GOVARIS *et al.*, 2011), black cumin (HASSANIEN *et al.*, 2014), green pepper (WHABA *et al.*, 2010), rosemary, thyme, and grass lemon (TAYEL *et al.*, 2016) resulted in good sensory acceptance.

To minimize the possible negative effects of plants and their constituents in the flavor of the products, a combination of different extracts and EOs has been investigated, as it can result in a good antimicrobial effect at lower individual concentrations (GUTIERREZ *et al.*, 2008). These combined compounds may have in some cases, a higher antimicrobial activity

than when added separately, thus presenting a synergistic effect. However, it should be pointed out, as considered by BURT *et al.* (2004), that certain substances, even if present in low concentrations, may have a highly enhanced antimicrobial effect. GUTIERREZ *et al.* (2008) reported that a combination of EOs from oregano and thyme was more effective in the antimicrobial activity against pathogenic *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa* than when used singly. Furthermore, a combination of oregano and basil reduced the growth rate of *Escherichia coli* three times.

The combined use of these natural compounds with emerging technologies such as ultrasound, high pressure, and electric pulses can also potentially allow the use of lower concentrations of EOs, as such technologies commonly damage the cell membrane, thus facilitating cell penetration and action of antimicrobials (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

#### **Action against pathogenic microorganisms**

Reports on the antimicrobial activity of aromatic plants and EOs added to cheeses against pathogenic and spoilage microorganisms are displayed in **Table 1**.

The recurrent food outbreaks associated with the consumption of cheeses make the control of contamination by pathogenic microorganisms the dairy's major concern. Therefore, the inhibition of pathogenic microorganisms commonly found in cheeses such as *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp by oils and extracts have been broadly investigated (HASSANIEN *et al.*, 2014; CALEJA *et al.*, 2014; CARVALHO *et al.*, 2014; TAYEL *et al.*, 2015).

*Listeria monocytogenes* is a Gram-positive psychotropic bacterium and has the ability to form biofilms that may persist for years on the surface of equipment and handling devices (CARVALHO *et al.*, 2015). This bacterium is more severe in risk groups such as elderly people, pregnant women, and immunodeficients, being lethal in 30% of cases. The use of oils and extracts has provided anti-*Listeria* activity in cheeses. GOVARIS *et al.* (2011) evaluated

the antimicrobial activity in Feta cheese with addition of EOs from oregano and thyme (0.1 mL/100g each) on a population of two strains of *L. monocytogenes* (Scott A and LMK) for over 36 days of storage, under refrigeration at 4°C. They observed reduction in a population of 10<sup>4</sup> CFU/g to undetectable levels after 18 days of storage with the use of EOs from oregano. The results for thyme EOs were similar, being effective in the inhibition of the two strains of *L. monocytogenes*, which may be due to similar concentrations of the antimicrobial components present in both oils.

SHAN *et al.* (2011) found that garlic extract also had a promising effect on the inhibition of *L. monocytogenes*, over nine days of storage, at room temperature. The microbial population reached its peak on the fifth day of storage and then was stable for a certain period, and finally decreased. At all stages, the population of this pathogen in Cheddar cheese with garlic extract was lower than in the control cheese. TAYEL *et al.* (2015) observed the effect of oregano, cinnamon, water cress, sage, rosemary, and lemon grass extracts in the reduction of *L. monocytogenes* (4x10<sup>5</sup> CFU/ml) in a dairy-based-media and reported that all extracts inhibited the Listeria population. However, the cinnamon extract was more efficient because it required a lower concentration (400 µg/mL) to be effective, in comparison to the others EOs.

*Staphylococcus aureus* is a Gram-positive bacteria mainly found in cheeses produced under poor hygiene conditions. This pathogen produces enterotoxin that can endanger the consumers' health, hence this has also been investigated in several studies with EOs. WAHBA *et al.* (2010) obtained a reduction in a population of 8 log CFU/mL of *S. aureus* to undetectable levels in two days with the use of cayenne pepper and green pepper EOs in Kareich cheese, both in concentrations of 3%. CARVALHO *et al.* (2015) were able to reduce the population of *S. aureus* in one cycle, in Cottage cheese, by using thyme EO with a concentration of 2.5 µl/mL.

*Escherichia coli* 0157:H7 and *Salmonella* spp, both Gram-negative bacteria, have been seen to be more resistant to EOs (GOVARIS *et al.*, 2011; SHAN 2011). These observations are in agreement with other studies that demonstrate the lower antimicrobial efficacy of natural compounds in Gram-negative bacteria, their increased resistance being mainly attributed to the cell wall structure (DAGDELEN *et al.*, 2014; CALLUS *et al.*, 2015). However, HASSANIEN *et al.* (2014) observed that the EO from black cumin seed at concentrations of 0.1% and 0.2% did not significantly reduce the population of *L. monocytogenes* and *S. aureus* (Gram-positive), whereas, these same concentrations significantly reduced populations of *S. enteritidis* and *E. coli* (Gram-negative). TAYEL *et al.* (2015) observed the occurrence of close minimum inhibitory concentrations of oregano EO in dairy-based media to *L. monocytogenes* (950 µg/ml), *E. coli* 0157: H7 (975/ml), and *Salmonella typhimurium* (900 µg/mL), regardless of the Gram classification.

The growth of unwanted mold species is responsible for many sensory defects in cheeses, such as off-flavors and changes in texture and color. Moreover, the production of mycotoxins may represent a hazard besides decreasing the shelf life of the products, making it a challenge to find non-toxic antifungal substances for humans (LIBRAN *et al.*, 2014).

Accordingly, some natural plant compounds have demonstrated promising results in inhibiting the growth of fungi. MORO *et al.* (2013) evaluated the *in vitro* antifungal activity of aromatic plants in cheeses, as inhibitors of *Penicillium verrucosum* growth, a deteriorating agent that acts on the surface of ripening cheese and is responsible for the production of an important mycotoxin named ochratoxin. The authors observed that at concentrations below 0.02 µl/mL of dill (*Anethum graveolens*) or hyssop (*Hyssopus officinalis*) EOs showed 50% inhibition in the growth of *Penicillium verrucosum*. ELGUEA-CULEBRAS *et al.* (2016) observed that the extract of *Hyssopus officinalis* agroindustrial solid residue also had the potential to control the growth of *Penicillium verrucosum* during cheese ripening. The

concentration of solid residue that was required to inhibit 50% of the growth of *Penicillium verrucosum* was 92 µg/mL. LIBRAN *et al.* (2014) observed a synergistic effect between saffron (35 µl/mL) and whey in the inhibition of *P. verrucosum*, higher than the pure substance at the same concentration, and suggested that milk had components that enhanced the saffron effect. BALAGUER *et al.* (2013), on the other hand, reported that the incorporation of 5% cinnamaldehyde (compound present in cinnamon EO) into a film that coated a cheese spread delayed the growth of fungi *Apergillus niger* and *Penicillium expansum* within 10 storage days.

Besides inhibiting the growth of fungi, EOs have also been associated with delaying or even preventing the production of mycotoxins. Thus, VAZQUEZ *et al.* (2001) reported that the addition of eugenol at 200 µl/mL prevented the production of citrinin, a toxin produced by *Penicillium citrinum*, in cheese Arzúa Ulloa. GANDOMI *et al.* (2009) observed the suppression of the production of aflatoxins by EO of *Zataria multiflora* Boiss, a typical Iranian plant, in white Iranian ultrafiltrated cheese immersed in brine, and suggested that this EO prevented the growth of fungal micelles, as well as, the remaining fungi had the ability to produce aflatoxins. SINDHU *et al.* (2011) also reported the inhibition of aflatoxin production by EOs extracted from Curcuma (*Curcuma longa* L.) leaves at a concentration of 1.5%.

### **Effect of plant extracts and Essential Oils on beneficial bacteria cheese**

One of the technological implications of the addition of EOs to cheese is the possible inhibition of its natural microbial population or artificial starter cultures added to the product. The natural cheese microflora and starter cultures are responsible for fermentation and giving the desired sensory characteristics to the product.

The lactic acid bacteria found in cheese have demonstrated their resistance to plant extracts and EOs at concentrations that inhibit the growth of pathogenic microorganisms. MORO *et al.* (2015) reported that the addition of EOs from rosemary prevented the growth of

*Clostridium tyrobutyricum* in sheep's cheese, even though it did not reduce the population of lactic acid bacteria. Gammariello *et al.* (2008) reported a similar check in a study in which 13 plant extracts and EOs of orange species, grapefruit, spring lemon, parsley, and lemon Boyajian did not affect the survival of lactic acid bacteria in cheese Fior di Latte, although it decreased the population of the pathogenic bacteria.

The lactic acid bacteria also contribute to the safety of the cheese by competing with the pathogenic microorganisms and maintaining a low pH (Carvalho *et al.*, 2015). Some studies have demonstrated that certain plant extracts and certain EOs do not significantly affect the pH of cheese or rather assist in maintaining a suitable pH. In this sense, Shan *et al.* (2011) found that the addition of garlic extract maintained the pH of Cheddar cheese stable for nine days of the storage period, meanwhile in the control cheese there was a significant increase in the pH value. Gammariello *et al.* (2008) also found that sage and thyme added to the Fior di Latte cheese did not cause significant reduction in a pH that ranged from 5.4 to 5.8. Han *et al.* (2011) reported only a slight reduction in the milk pH with the incorporation of phenolic compounds derived from green tea, grape, and cranberry extracts, and suggested that these compounds contain organic acids and phosphates that can reduce the pH. Marcial *et al.* (2016) reported that the manufacturing of a traditional Argentinean cheese added with 200 mg/kg of oregano (*Oreganum vulgare* var. *hirtum*) EO did not affect the growth or acidifying activity of lact acid bacteria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, and *Streptococcus thermophilus*, compared to the control cheese. However, Carvalho *et al.* (2015) suggested that depending on the concentration, these natural compounds could inhibit the growth of lactic acid bacteria, leading to cheese pH elevation. The authors reported that the concentration of 2.5 µl/mL of thyme EO added to a broth with a Coalho cheese base caused a slight decrease in the viable cell count of *L. monocytogenes* (1.3 log cfu/mL) after 24 hours of exposure. The same

concentration of thyme EO markedly reduced the counting of starter cultures composed of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (at about 4 log cfu/mL).

## **CONCLUSION**

Some extracts and essential oils from plants have proved to be natural preservatives with significant inhibitory activity against major pathogens and spoilage microorganisms in cheeses. However, considering the losses during processing and their stability during storage, more studies should be performed to determine the concentration of the extracts and EOs that are required to be incorporated into cheeses, as well as the action of these natural antimicrobials on lactic acid bacteria.

Further studies are also necessary with regard to the association and different combinations of various EOs and plant extracts as well as with other ingredients, aiming at characterizing the type of interaction concerning synergistic, antagonistic or additive effects. The increase in the quality of plant extracts and essential oils is also an important requirement for the use of these compounds by the food industry. It is necessary to cultivate and standardize plant material germplasms with the aim of obtaining specific compounds or essential oil compositions. It is also necessary to enhance knowledge of the influence of plant, post-harvest, and agroindustrial management in the composition and final content of the chemical components, in order to minimize undesirable variation or the low effectiveness of these compounds in the products. Finally, it is necessary to broaden and deepen the sensory studies related to the utilization of individual and combined EOs and plant extracts in different types of cheeses in order to better understand the possible impacts on consumer acceptance.

## **REFERENCES**

ASENSIO, C.M. *et al.* Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT- Food science and Technology**, v. 60, p. 664-671, 2015. Available from:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814006896>>. Accessed em: Nov 6, 2015. doi:10.1016/j.lwt.2014.10.054.

BAJPAI, V.K. *et al.* Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of foodborne pathogens. **Food Control**, v. 32, p. 582-590, 2013. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513000558>>. Accessed em: Nov 18, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.032.

BALAGUER, M.P. *et al.* Antifungal properties of gliadin films incorporating cinnamaldehyde and application in active food packaging of bread and cheese spread food stuffs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, p. 369–377, 2013. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513003863>> Accessed: Nov 13, 2015. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.08.012.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potencial applications in foods- a review. **International Journal of Food and Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160504001680>>. Accessed: Nov 6, 2015. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

CALEJA, C. *et al.* *Foeniculum vulgare* Mill. As natural conservation enhancer and health promoter by incorporation in cottage cheese. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 428-438, 2015. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614003958>> Accessed: Dez 5, 2015. doi:10.1016/j.jff.2014.12.016.

CALO, J.R. *et al.* Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. **Food Control**, v.54,p.111119,2015. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515000456>> Accessed: Jan 6, 2016. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.12.040.

CARVALHO, R.J. *et al.* Comparative inhibitory effects of *Thymus vulgaris* L. essential oil against *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and mesophilic starter co-culture in

cheese-mimicking models. **Food Microbiology**, v. 52, p.59–65, 2015. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002015001252>> Accessed: Jan, 06, 2016. doi: 10.1016/j.fm.2015.07.003.

CAVA, R. *et al.* Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2708-2934, 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18095427>. Accessed: Oct 02, 2015.

COSTA, D.C. *et al.* Advances in phenolic compounds analysis of aromatic plants and their potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p.336–354, 2015. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415001521>> Acesso em: Nov 23, 2015. doi: 10.1016/j.tifs.2015.06.009.

DAGDELEN, S. *et al.* Volatile composition, antioxidant and antimicrobial activities of herbal plants used in the manufacture of van herby (OTLU) cheese. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.38, p.1716–1725, 2014. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpp.12134/epdf>> Accessed: Oct 22, 2015. doi: 10.1111/jfpp.12134.

DIAO, W.R. *et al.* Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, p.109–116, 2014. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513003393> > Accessed: Nov 04, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.06.056.

DIMA, C.; DIMA, S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity. **Current Opinion in Food Science**, v. 5, p. 29–35, 2015. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799315000958>> Accessed: Feb 02, 2016. doi: 10.1016/j.cofs.2015.07.003.

ELGUEA-CULEBRA, G.O. *et al.* In vitro antifungal activity of residues from essential oil industry against *Penicillium verrucosum*, a common contaminant of ripening cheeses. **LWT - Food Science and Technology**, v.73, p. 226-232, 2016. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643816303401>>. Accessed: Nov 16, 2016. doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.008.

FOLIN, A. M. Plantas aromática: diferentes formas de multiplicación. **Informe Técnico-Série Extension Rural**, INTA. El Colorado, 2012. Available from: <https://huertasescolares.files.wordpress.com/2010/02/plantas-aromaticas-el-colorado.pdf>  
Accessed: Oct 15, 2016.

FOOD INGREDIENTS BRASIL.Extratos vegetais. **Revista-fi.com**, n. 120, p. 16-20, 2010. Available from: < <http://www.revista-fi.com/materias/120.pdf>> Accessed: Nov 08, 2015.

GAMMARIELLO, D. *et al.* Effects of natural compounds on microbial safety and sensory quality of Fior di Latte cheese, a typical Italian cheese.**Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4138–4146,2008. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030208709603>>. Accessed: Oct 02, 2015.doi: 10.3168/jds.2008-1146.

GANDOMI, H. *et al.*Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 2397–2400, 2009. Available from:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691509002531>> Accessed: Oct 02, 2015. doi: 10.1016/j.fct.2009.05.024.

GILL, A. O.; HOLLEY, R.A. Disruption of *Escherichia coli* ,*Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p.1–9, 2006. Available from: < <http://www.sciencedirect.com>.

com/science/article/pii/S0168160505005684>. Accessed: Oct 02, 2015.doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009.

GILL, A.O.; HOLLEY, R.A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, p. 170–174, 2006. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160506002844>> Accessed: Jan, 05 2015. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.04.046.

GOVARIS, A. *et al.* Antibacterial activity of oregano and thyme essential oils against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in feta cheese packaged under modified atmosphere. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1240–1244, 2011. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810003440>> Accessed: Oct 2. 2015. doi: 10.1016/j.lwt.2010.09.022.

GUTIERREZ, J. *et al.* The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 91–97, 2008. Available from:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160508001177>>. Accessed: Oct 03, 2015.doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028

HAN, J. *et al.* Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. **Food Research International**, v. 44, p. 494–497, 2011. Available from:< <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910004011>>. Accessed: Nov 08, 2015. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.026.

HASSANIEN, M.F.R. *et al.* Soft cheese supplemented with black cumin oil: Impact on food borne pathogens and quality during storage. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 280–288, 2014. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X13000946>> Accessed: Oct 08, 2015. doi: 10.1016/j.sjbs.2013.10.005

LIBRÀN, C.M. *et al.* Potential application of aromatic plant extracts to prevent cheese blowing. **World Journal of Microbiology and Biotechnoly**, v. 29, p. 1179–1188, 2013. Available from: < <http://link.springer.com/article/10.1007/s11274-013-1280-x>>. Accessed: Nov 5, 2015. doi: 10.1007/s11274-013-1280.

OLIVEIRA, T.L.C. *et al.* Natural antimicrobials as additional hurdles to preservation of foods by high pressure processing. **Trends in Food Science & Tecnology**, v. 45, n. 1, p.60-85, 2015. Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224415001417>>. Accessed: Oct 02, 2015. doi:10.1016/j.tifs.2015.05.007.

MARCIAL, G.E. *et al.* Influence of oregano essential oil on tradional Argentinean cheese elaboration: effect on latic starter cultures. **Revista Argentina de Microbiología**, v.48, n.3, p.229-235,2016. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03257540116300116>> Accessed: Nov 16, 2016. doi: doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.006.

MORO, A. *et al.* Dairy matrix effect on the transference of rosemary essential oil compounds during cheese making. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1507-1513, 2014. Available from: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.6853/epdf>>. Accessed: Oct 03, 2015. doi: 10.1002/jsfa.6853.

MORO, A. *et al.* Mycotoxicogenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1112–1118, 2013. Available from :< <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.5859/epdf>> Accessed: Oct 03, 2015. doi: 10.1002/jsfa.5859.

NEGI, P.S. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. **International Journal of Food Microbiology**, v.156, p. 7–17, 2012. Available from: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160712300000>> Accessed: Oct 03, 2015. doi: 10.1016/j.ijfm.2012.03.001.

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512001250>> Accessed: Oct 09, 2015 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.006

OLMEDO, R.H. *et al.* Preservation of sensory and chemical properties in flavoured cheese prepared with cream cheese base using oregano and rosemary essential oils. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, p. 409–417, 2013. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643813001333>>. Accessed: Oct 02, 2015 doi: 10.1016/j.lwt.2013.04.007.

SHAN, B. *et al.* Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 284–90, 2011. Available from: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21142945>>. Accessed: Oct 02, 2015. doi: 10.1089/jmf.2010.0009.

SINDHU, S. *et al.* Chemoprevention by essential oil of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p.1188–1192, 2011. Available from:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511000585>>. Accessed: Oct 02, 2015. doi: 10.1016/j.fct.2011.02.014.

SMITH-PALMER, A *et al.* Influence of subinhibitory concentrations of plant essential oils on the production of enterotoxins A and B and  $\alpha$ -toxin by *Staphylococcus aureus*. **Journal Medical Microbiology**, v. 53, p. 1023–1027, 2004. . Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358826> >. Accessed: Nov 06, 2015. doi: 10.1099/jmm.0.45567-0.

TAYEL, A.A. *et al.* Foodborne Pathogens Prevention and Sensory Attributes Enhancement in Processed Cheese via Flavoring with Plant Extracts. **Journal of Food Science**, v. 80, p. M2886–M2891, 2015. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1750-3841.13138/epdf> . Accessed: Dez 05, 2015. doi: 10.1111/1750-3841.13138.

U.S. GOVERNMENT PUBLISHING OFFICE. Substances Generally recognized as Safe. **Electronic code of federal regulations 21 cfr 182.**

VÁZQUEZ, B.I. *et al.* Inhibitory effects of eugenol and thymol on *Penicillium citrinum* strains in culture media and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p.157–163,2001.Availablefrom:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501004299>>.Accessed: Oct 02, 2015. doi:10.1016/S0168-1605(01)00429-9.

ZHANG Y. *et al.* Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.**Food Control**, v. 59, p. 282–289, 2016.

Available from: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515300219>>

Accessed: Oct 06, 2015. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.05.032.

WAHBA, N.M ; AHMED. A.S. ; EBRAHEIM. Z. Z. Antimicrobial effects of pepper, parsley, and dill and their roles in the microbiological quality enhancement of traditional Egyptian Kareish cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, p. 411-418, 2010.

Available from :< <http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2009.0412>> .Accessed Oct 02, 2015.doi: 10.1089=fpd.2009.0412.

**Table 1** – Antimicrobial activity of aromatic plants and essential oils added to cheeses

<b>Cheese Type</b>	<b>Natural antimicrobial (Source and concentration)</b>	<b>Inhibitory activity (microorganisms, counts, and storage conditions)</b>	<b>Reference</b>
Feta	Oregano (0.1mL/100g) Thyme (0.1mL/100g)	Inhibition of <i>L. monocytogenes</i> and <i>E. coli</i> 0157: H7 population ( $10^4$ CFU/g) at 18 and 22 days, respectively, after storage under modified atmosphere packaging (50% de CO <sub>2</sub> e 50% de N <sub>2</sub> ) at 4°C.	Govaris <i>et al.</i> (2011)
Cheddar	Garlic (dipping 25 g of cheese in 100 ml of plant extract solution).	Inhibition of <i>L. Monocytogenes</i> (2 log CFU/mL) after storage at 23°C for 9 days.	Shan <i>et al.</i> (2011)
Kareich	Cayenne (3%) or Green Pepper (9%)	Inhibition of <i>S. Aureus</i> ( $1 \times 10^8$ CFU/g) to undetectable levels within 2 days of storage at 4°C±2°C.	Wahba <i>et al.</i> (2010)
Domiaty	Black cumin seed oil (0.1% e 0.2%)	Decreased in <i>Salmonella enteritides</i> and <i>Escherichia coli</i> counts from 3.95 log CFU/mL to 2.6 log CFU /g after storage at 4°C for 42 days.	Hassanien <i>et al.</i> (2014)
Sheep's cheese	Rosemary essential oil (215 mg/L)	Prevented the grown of <i>Clostridium</i> spp. counts 3 log CFU/g ripened for 5 months at 12°C	Moro <i>et al.</i> (2015)
Coalho Cheese mimicking models	Thymus essential oils (2.5 µl/mL)	Reduced 1.3 log CFU/mL counts ( from initial count) of <i>L. monocytogenes</i> incubated at 10°C for 24 hours	Carvalho <i>et al.</i> (2015)
Cheddar Based Media	Cinnamon (400 µg/mL) garlic (625 µg/mL), lemon grass (550 µg/mL), cress (475 µg/mL), rosemary (750 µg/mL), sage (825 µg/mL) and orégano extracts (950 µg/mL)	All extract concentrations individually inhibited the population of <i>L. monocytogenes</i> ( $4 \times 10^5$ CFU/mL) incubated at 37°C for 24 hours	Tayel <i>et al.</i> (2015)
Fior di Latte	Thyme and sage essential oil (1500 mg/Kg)	Inhibition of <i>Pseudomonas</i> spp and coliforms stored at 10°C for 6 days	Gammariello <i>et al.</i> (2008)
Whey and Requesón whey	Safranal (35µg/Kg)	Inhibited over 15% <i>Penicillium verrucosum</i> growth (population of $10^5$ CFU/mL of spore).	Librán <i>et al.</i> (2014)