



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA

Priscilla Gregorio de Oliveira

**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA COMO COBERTURA
COMESTÍVEL EM QUEIJO DE COALHO NA INIBIÇÃO
DE *Listeria monocytogenes***

Vitória de Santo Antão

2015

Priscilla Gregorio de Oliveira

**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA COMO COBERTURA
COMESTÍVEL EM QUEIJO DE COALHO NA INIBIÇÃO
DE *Listeria monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eriane de Castro Lima Machado

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Roberta de Albuquerque Bento

Vitória de Santo Antão

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Ligia Feliciano dos Santos, CRB4: 2005

O48b Oliveira, Priscilla Gregorio de.
Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*/ Priscilla Gregorio de Oliveira. – Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.
106 folhas; il., graf., tab.

Orientadora: Eriane de Castro Lima Machado.
Coorientadora: Roberta de Albuquerque Bento.
Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Saúde Humana e Meio Ambiente, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Queijo de coalho. 2. Quitosana. 3. *Listeria monocytogenes*. I. Machado, Eriane de Castro Lima (Orientador). II. Bento, Roberta de Albuquerque. III. Título.

637.3 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-043/2015

Dissertação de Mestrado apresentada por **Priscilla Gregório de Oliveira** ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco, sob o título “**BIOATIVIDADE DE QUITOSANA COMO COBERTURA COMESTÍVEL DE QUEIJO DE COALHO NA INIBIÇÃO DE *LISTERIA MONOCYTOGENES***”, orientada pela Profa. Dra. Eriane de Castro Lima Machado e coorientada pela Profa. Dra. Roberta de Albuquerque Bento, aprovada no dia 20 de maio de 2015 pela Banca Examinadora composta pelos seguintes professores:

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Núcleo de Nutrição – CAV/UFPE

Dra. Celiane Gomes Maia da Silva
Departamento de Ciências Domésticas – UFRPE

Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Departamento de Nutrição – CCS/UFPE

Autora

Priscilla Gregório de Oliveira

À Deus, meu refúgio e Fortaleza
À Joel e Lorena, meu esposo e filha, família amada
À Iris e Natanael, meus pais, meu porto seguro
À Eriane e Roberta, minhas queridas mestres

AGRADECIMENTOS

Ao meu grandioso Deus, pela sua fidelidade dia após dia e pelas suas bênçãos imerecidas.

Ao meu esposo, Joel Sousa, por todo o companheirismo e motivação.

À minha filha, Lorena Gregorio, que foi minha maior motivação para alcançar esse sonho.

Aos meus queridos pais, Natanael Gregorio e Iris Gregorio, pela tamanha força, compreensão, amor e dedicação, sem eles certamente eu não teria conseguido essa conquista, em especial à minha mãe que foi a principal responsável pela realização deste sonho.

À minha prezada orientadora, Professora Erilane Machado, por todo o carinho, paciência, compreensão e orientação dada a mim durante este trabalho.

À minha estimada co-orientadora, Professora Roberta Bento, pela orientação e ensinamentos dados e pela colaboração na construção deste sonho.

À Professora Celiane Gomes, pelo apoio que me deu no decorrer desta caminhada.

À Silvio Assis, pela amizade, apoio e auxílio constante na construção desse sonho.

À Simone Ortiz, pelo apoio carinho e companheirismo nessa dura missão.

Aos técnicos do laboratório, Rafael Albuquerque e Michele Oliveira, pelos conhecimentos compartilhados, pela paciência e pelo grande apoio que me deram no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores do programa, pelo conhecimento transmitido, pelo apoio na caminhada, pelos ensinamentos direto e indiretos, quanto a arte da docência, que contribuiu de forma ímpar para minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus amigos e companheiros de turma, que participaram de toda a minha vida dentro e fora da academia, aos quais devo meu total afeto e carinho, em especial a minha querida amiga **Renata Meireles**, que abraçou a minha causa e me ajudou em todos os momentos.

À FACEPE, pelo apoio financeiro, através do fornecimento da bolsa de mestrado, que me capacitou a participar neste projeto.

A todos que contribuíram direta e/ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu profundo e sincero agradecimento!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo Geral.....	3
1.2.2. Objetivos Específicos.....	3
1.3 Revisão da Literatura	4
1.3.1 História do Queijo.....	4
1.3.2 Queijo de Coalho.....	4
1.3.3 Processo tecnológico de fabricação do queijo de coalho.....	6
1.3.4 Qualidade e segurança microbiológica do queijo de coalho.....	10
1.3.5 Contaminação por <i>Listeria monocytogenes</i>	13
1.3.6 Listeriose.....	19
1.3.7 Quitosana.....	23
CAPÍTULO 2	28
Queijo de coalho com cobertura de quitosana: Perfil físico-químico e aceitação sensorial	
2.1. Resumo	29
2.2 Introdução	30
2.3 Material e Métodos	31
2.4 Resultados e Discussão	33
2.5 Conclusões	38
2.6 Abstract	38
2.7 Referências	39

CAPÍTULO 3.....	44
Bioatividade de cobertura comestível de quitosana em queijo tipo coalho na inibição de <i>Listeria monocytogenes</i>	
3.1. Resumo.....	45
3.2 Abstract.....	46
3.3 Introdução.....	46
3.4 Material e Métodos.....	48
3.5 Resultados e Discussão.....	51
3.6 Conclusões.....	57
3.7 Referências.....	58
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO I.....	95
ANEXO II.....	96
ANEXO III.....	97
ANEXO IV.....	98
ANEXO V.....	99
ANEXO VI.....	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Fluxograma geral para a produção de queijo de coalho.....	07
Figura 1.2	Prensa utilizada na fabricação do queijo de coalho produzido na comunidade de Tiasol, em Tauá, CE.....	11
Figura 1.3	Produção artesanal de queijo coalho no município de Jucati- PE.....	11
Figura 1.4	Condições de maturação do queijo de coalho produzido por pequenos produtores no município de Jucati- PE.....	12
Figura 1.5	Local de exposição do queijo de coalho.....	12
Figura 1.6	Tipo de caixa utilizada para o transporte do queijo de coalho produzido na comunidade de Tiasol, em Tauá, CE.....	13
Figura 1.7	Exposição das peças de queijo de coalho no local de comercialização.....	13
Figura 1.8	Representação esquemática da estrutura química da quitosana.....	24
Figura 2.1	Fluxograma do processo de produção do queijo de coalho.....	31
Figura 2.2	Teste de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações.....	38
Figura 3.1	Curva de sobrevivência de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações.....	53
Figura 3.2	Teste de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Ocorrência de <i>L. monocytogenes</i> em queijos produzidos no Brasil	32
Tabela 1.2	Listeriose associado ao consumo de queijos.....	35
Tabela 2.1	Resultados médios das análises físico-químicas do queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana.....	49
Tabela 2.2	Resultados médios das notas atribuídas no teste de aceitação para queijos de coalho com e sem adição da cobertura comestível de quitosana.....	51
Tabela 2.3	Aceitabilidade dos queijos de coalho com e sem adição da cobertura comestível de quitosana, em diferentes concentrações, por atributo avaliado.....	51
Tabela 3.1	Contagem (Log UFC.ml ⁻¹) de <i>Listeria monocytogenes</i> em queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana com diferentes concentrações.....	67

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
GBS %	Percentual de gordura em base seca
EST	Extrato seco total
CD (%)	Percentual de capacidade de derretimento
Di ²	Diâmetro inicial ao quadrado
Df ²	Diâmetro final ao quadrado
UFC/g	Unidade formadora de colônia por grama
NMP/ml	Número mais provável por mililitro
h	Hora
ml/L	Mililitro por litro
cm ²	Centímetro cúbico
nm	Nanômetro
UFC.ml ⁻¹	Unidade formadora de colônia por mililitro
ml	Mililitro
v/v	Volume por volume
µL	Microlitro

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
AM	Amazonas
ATCC	American Type Culture Collection
Aa	Atividade de água
BA	Bahia
BHI	Brain Heart Infusion
BPF	Boas Práticas de Fabricação
C	Amostra controle
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CA	Amostra controle com ácido acético 1%
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ²	Cloreto de cálcio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CE	Ceará
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
EUA	Estados Unidos da América
GlcN	2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose
HCl	Ácido clorídrico
IN	Instrução normativa
LEAAL	Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos
Log	Logarítimo
MA	Maranhão
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Met	Metionina
mg	Miligrama
MG	Minas Gerais
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PAT	Pesquisa Agropecuária Tropical
PB	Paraíba
PE	Pernambuco

pH	Potencial de hidrogênio
Phe	Fenilalanina
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RJ	Rio de Janeiro
RS	Rio Grande do Sul
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SP	São Paulo
T1	Amostra Queijo de coalho + cobertura de quitosana 5mg/ml
T2	Amostra Queijo de coalho + cobertura de quitosana 10mg/ml
T3	Amostra Queijo de coalho + cobertura de quitosana 15mg/ml
TO	Tocantins
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

RESUMO

O queijo de coalho é um produto que apresenta insegurança microbiológica, sendo apontado como um importante veículo de *Listeria monocytogenes*. O objetivo dessa pesquisa foi verificar a bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*. Para isso foram elaborados produtos com coberturas de quitosana em diferentes concentrações: T1 (15mg/mL), T2 (10mg/mL) e T3 (5mg/mL). Como controle utilizou-se amostras de queijo de coalho sem tratamento (C) e com coberturas de ácido acético 1% (CA). A cinética de inibição bacteriana da cobertura de quitosana foi avaliada através da contagem de células viáveis (curva de sobrevivência bacteriana) de *Listeria monocytogenes* (ATCC 3533) durante os intervalos 0,1,2,4,8,12 e 16 dias de armazenamento, após aplicação da cobertura. Os produtos foram avaliados quanto as características físico-químicas, aos padrões microbiológicos sanitários e sensorialmente. Os resultados observados no teste de inibição bacteriana contra *Listeria monocytogenes* apontaram o tratamento T1 como o mais eficiente, por proporcionar menores contagens da carga microbiana, em comparação aos demais tratamentos, ao longo do período de armazenamento avaliado, favorecendo reduções logarítmicas de 2,50; 2,46; 2,84; 1,41; 1,09; 1,38 e 0,81, respectivamente. Quanto às características físico-químicas e aos padrões microbiológicos sanitários, os produtos avaliados (T1, T2, T3, C e CA) se enquadraram nos requisitos exigidos pela legislação para queijo de coalho. Verificou-se nos produtos variações de umidade entre $50,07 \pm 0,2$ e $50,86 \pm 0,5$ e de gordura entre $46,54 \pm 0,1$ e $47,77 \pm 0,2$. Quanto aos coliformes termotolerantes observou-se que as amostras sob tratamento T1, T2, T3, e controles C e CA apresentaram valores de: $1,51 \times 10^1$ NMP/mL, $1,83 \times 10^1$ NMP/mL, $1,95 \times 10^1$ NMP/mL, $2,40 \times 10^1$ NMP/mL e $1,99 \times 10^1$ NMP/mL, respectivamente. Na contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo as amostras apresentaram resultados < 10 UFC/g. Para *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* não foi encontrada a presença destes microrganismos em 25g dos produtos. Quanto as análises sensoriais, os resultados para a aceitação foram satisfatórios, e verificou-se que a amostra com maior concentração de quitosana (T1) obteve o maior índice de aceitabilidade para os atributos sabor (76,66%) e textura (78,33%), assim como melhores resultados nos testes de preferência e intenção de compra. Concluiu-se que a cobertura comestível de quitosana pode ser utilizada na conservação de queijo de coalho frente a contaminação de *Listeria monocytogenes*, e que o emprego dessa tecnologia não altera os parâmetros físico-químicos e aceitação sensorial do queijo de coalho.

Palavras-Chave: Antimicrobiano natural, conservação, revestimento, produto lácteo.

ABSTRACT

The coalho-type cheese is a product its food security is not recommended and it has been pointed out as an important vehicle for *Listeria monocytogenes*. The objective of this study was to assess the bioactivity of chitosan as edible coating in coalho-type cheese in inhibiting *Listeria monocytogenes*. For this purpose, treatments were realized with coating of chitosan in different concentrations: T1 (15 mg.mL⁻¹), T2 (10 mg.mL⁻¹) and T3 (5 mg.mL⁻¹). Untreated samples of cheese were used as a control (C) and coated samples, only, with acetic acid 1% (CA). Kinetic studies of bacterial inhibition from chitosan coating was assessed by viable cell counting (microbial survival curves) of *Listeria monocytogenes* (ATCC 3533) during storage intervals (0,1,2,4,8,12 e 16 days), after coating application. The products were also assessed for physical-chemical and sensory characteristics, as well as, sanitary-microbiological criteria. The results obtained from the test of inhibition against the *Listeria monocytogenes* showed T1 treatment as the most efficient, by providing a lower growth rate, compared to the other treatments, during the storage period, representing a log reduction of 2.50; 2.46; 2.84; 1.41; 1.09; 1.38 e 0.81. In relation to the physical-chemical characteristics and sanitary-microbiological criteria, the evaluated products (T1, T2, T3, C e CA) met the requirements by the legislation for coalho-type cheese and showed moisture variations between 50.07±0.2 and 50.86±0,5; and fat from 46.54±0.1 to 47.77±0.2. Thermotolerant Coliforms counts were detected in T1, T2, T3, C e CA samples that proved values: 1,51 x 10¹ MPN.mL⁻¹, 1.83 x 10¹ MPN.mL⁻¹, 1.95 x 10¹ MPN.mL⁻¹, 2.40 10¹ MPN.mL⁻¹ e 1.99 x 10¹ MPN.mL⁻¹, respectively. The counts of positive-coagulase staphylococci expressed results < 10 CFU.g⁻¹. There was no evidence of *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* in 25 grams of cheese. Application of sensory test revealed that the addition of coating was well appreciated by a taste panel and the sample with the highest concentration of chitosan (T1) was better accepted for taste (76.66%) and texture (78.33%) attributes, in addition to superior performance in preference test and intention to purchase. In summary that chitosan as edible coating can be used to preserve coalho-type cheese against *Listeria monocytogenes* and the appropriate use this technology cannot affect sensory properties and physical chemistry of the product.

Keywords: Natural Antimicrobial, conservation, coating, dairy product.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O Queijo de Coalho é um produto típico da Região Nordeste do Brasil e símbolo da sua cultura. Apresenta-se como um componente alimentar diário e como um produto gerador da renda familiar, sendo sua receita transmitida por gerações. Apesar de sua notoriedade é um produto que não apresenta segurança sanitária, sendo apontado como um veículo frequente de patógenos de procedência alimentar dentre os produtos lácteos.

A maior parte da produção de queijo de coalho é obtida em pequenas e médias queijarias, em propriedades rurais de pequeno porte ou da agricultura de base familiar, as quais movimentam, mensalmente, algo na ordem de milhões de reais, o que sinaliza a importância dessa atividade no âmbito social e econômico local (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006; MENEZES; SILVA; SAMUEL, 2012).

A identidade cultural juntamente ao isolamento das propriedades produtoras, fez com que o queijo de coalho, principalmente o fabricado artesanalmente (segundo métodos tradicionais, individuais e até mesmo rudimentares), sobrevivesse a modernização dos processos produtivos e resistisse as exigências especificadas pela legislação quanto a sua produção e se apresentasse como um produto sem padronização, apesar de ser típico, e inseguro para o consumo, do ponto de vista higiênico-sanitário (DUARTE *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2007; SEBRAE, 2008a; DANTAS, 2012).

A insegurança microbiológica do queijo de coalho devido à contaminação microbiana é de grande importância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, bem como para a saúde pública, pelo risco de causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) (FEITOSA *et al.*, 2003; RUWER; MOURA; GONÇALVES, 2011).

Dentre os microrganismos patogênicos causadores de DTA *Listeria monocytogenes* é considerada como um patógeno de grande importância para a área de alimentos (SILVA *et al.*, 2011). Este microrganismo tem sido encontrado em uma ampla variedade de produtos

alimentícios, seja frescos ou congelados, tais como: produtos vegetais, frutas, frutos do mar, frango, carnes, leite e em queijos (JAY, 2005).

Em queijos de coalho estudos apontam incidência de *L. monocytogenes* em percentuais consideráveis (SOUSA; LIMA; SOUSA, 2000; LEITE *et al.*, 2002; BRANCO *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003; SOUSA *et al.*, 2006).

A presença de *L. monocytogenes* nos queijos, de um modo geral, é preocupante, por se tratar de um produto que, também, é consumido cru, e pelo fato de que a refrigeração, condição no qual esse tipo de produto deve ser armazenado, não impede o crescimento e desenvolvimento desta bactéria (BARANCELLI *et al.*, 2011).

Assim, o emprego das Boas Práticas de Fabricação (BPF) (BEZERRA, 2008; FAEP, 2012) associado a novas tecnologias de conservação microbiológica tornam-se essenciais, com a finalidade de aprimorar a qualidade e estabilidade microbiológica de produtos processados como o queijo de coalho.

Dentre vários conservantes alimentares naturais estudados e utilizados com esta finalidade, a quitosana destaca-se por ser um polímero muito versátil, com ampla aplicabilidade na indústria alimentícia, sendo empregado, por exemplo: como base na elaboração de suplementos nutricionais, emulsificantes, fibra em biscoitos dietéticos, estabilizantes em alimentos em conserva, clarificantes de bebidas (SHAHIDI *et al.*, 1999; BORDERÍAS *et al.*, 2005; BORGOGNI *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007), como agente conservante em macarrão, molho de soja, sardinha (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002), bacalhau (SHAHIDI *et al.*, 2002), carne de cordeiro (KANATT *et al.*, 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI *et al.*, 2006), patê de carne (BENTO *et al.*, 2011); suco de acerola (ALBUQUERQUE; STAMFORD, 2011); como filme protetor em caju (OLIVEIRA, 2011), mamões (ALI *et al.*, 2011), e em maçãs (ASSIS; LEONI, 2003; JORGE *et al.*, 2011), dentre outras aplicabilidades.

As possibilidades de sua aplicação como conservante nos alimentos são ainda mais enriquecidas pelo fato da quitosana poder ser preparada em diferentes formas (CAMPANA *et al.*, 2007), por inibir uma ampla faixa de microrganismo (FAI, 2008a), por propiciar uma melhor qualidade ao produto, pela utilização de uma substância natural e atóxica e por ser biodegradável, não gerando agressão ao meio ambiente (DIAS *et al.*, 2013).

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Avaliar a bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *L. monocytogenes*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as características físico-químicas do queijo de coalho revestidos com cobertura comestível de quitosana;
- Avaliar o queijo de coalho revestidos com cobertura comestível de quitosana quanto aos padrões microbiológicos sanitários;
- Verificar a influência da aplicação da cobertura comestível de quitosana em queijo de coalho sobre os atributos sensoriais de aceitação e preferência dos produtos;
- Avaliar a eficácia da cobertura comestível de quitosana em queijo de coalho, com diferentes concentrações, na inibição microbiana de cepas de *L. monocytogenes*.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 História do Queijo

A arte de fabricação dos queijos é muito remota, sendo este alimento um dos mais antigos de que se tem registro. Embora não se tenha certeza na precisão da data de sua origem a história do queijo remonta algo em torno de 8.000 a.C. (BERESFORD *et al.*, 2001).

Na literatura são encontradas várias versões que explicam sua origem. Para os antigos gregos a descoberta do queijo é explicada por uma lenda mitológica que atribui o feito a Aristeu, filho do deus Apolo, rei da cidade de Arcádia. Outra lenda atribui a um nômade árabe a descoberta do queijo, ao observar que após armazenar um pouco de leite em um cantil feito de estômago seco de carneiro havia ocorrido a coagulação do leite. Independente de como ele foi descoberto, o que se sabe é que o queijo foi utilizado ao longo do tempo como uma forma de preservação do leite (PERRY, 2004).

Com o passar dos anos o processo tecnológico de produção do queijo foi evoluindo, afim de atender as demandas sociais e aos paladares mais diversos e exigentes. Variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criaram a imensa variedade de queijos hoje conhecida, incluindo os de nível nacional, sendo alguns de expressão regional (BORGES, 2003; DANTAS, 2012).

Dentre muitas variedades encontra-se o queijo de coalho, que devido a seus atributos apresenta grande aceitação comercial. Seu sabor e consistência peculiar o colocam hoje entre os principais tipos de queijos nacionais (SEBRAE, 2008a).

1.3.2 Queijo de Coalho

O queijo de Coalho é produzido há mais de 150 anos em vários estados da região Nordeste do Brasil. O início de sua fabricação ocorreu com a chegada do gado bovino trazido pelos Portugueses (SEBRAE, 2008a). Atualmente sua produção é tida como uma prática tradicional entre os produtores de laticínios, devido principalmente à simplicidade da tecnologia de fabricação, elevado rendimento do processo e grande popularidade do produto (LIMA, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012; MENEZES; SILVA; SAMUEL, 2012).

Nos Estados do Rio Grande do Norte, Ceará, Pernambuco, Paraíba e Alagoas, o queijo de coalho ganha destaque entre os principais tipos de queijos de fabricação e consumo, pois está comprovadamente incorporado à cultura regional (MORAIS, 1995; MUNCK, 2004; ARAÚJO *et al.*, 2012).

O Estado Alagoano dispõe de duas bacias leiteiras significativas, situadas na região do Agreste e do Sertão Alagoano onde a principal atividade desse arranjo produtivo refere-se ao seguimento de laticínios e a produção de queijo de coalho (SEBRAE, 2008b).

No Estado de Pernambuco o queijo de coalho é tido como uma representação genuína da tradição e cultura local, sendo sua produção de importante relevância econômica e social, especialmente para os pequenos produtores do Agreste e Sertão, onde esta atividade constitui um dos principais suportes econômicos para as microrregiões do Vale do Ipojuca, Vale do Ipanema e Garanhuns, além de apresentar uma importância relativa na Zona da Mata, Sertão do São Francisco, Sertão do Araripe e Sertão do Pajeú, de acordo com Almeida, Júnior Fernando e Guerra (2010).

A indústria queijeira no Estado do Ceará contribui com forte expressão de comércio, contando com várias unidades produtoras em diversos municípios do estado. Um diagnóstico realizado pelo SEBRAE/CE (1998) aponta um consumo diário de 26,4% de queijo de coalho pela população, consultada em Fortaleza, e 27,7% no interior do Estado do Ceará.

No Rio Grande do Norte, por uma condição histórica, o queijo de coalho possui uma grande importância, e a atividade de sua produção é uma das mais valorizadas culturalmente, elevando a região ao reconhecimento em outros estados brasileiros, pelo consumo e produção desse produto (NASSU, 2005).

De acordo com Soares *et al.* (2011), no Estado paraibano a produção e comercialização do queijo de coalho é um importante negócio. A maior parte (73,68%) das indústrias produtoras de queijos no estado da Paraíba produzem queijo de coalho, e este é o item mais representativo do mix de produtos destas empresas.

No Nordeste do Brasil, de modo geral, a produção do queijo de coalho é realizada principalmente por pequenos e médios laticínios, que utilizam essa prática para reforçar a continuidade e permanência em um território que é lugar de vida e trabalho, do qual representa uma atividade bastante significativa para a economia regional, visto que em determinadas localidades é a principal fonte de renda e sobrevivência da população (SEBRAE, 2008a; ALMEIDA; JÚNIOR FERNANDO; GUERRA, 2010; LIMA, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2012; MENEZES; SILVA; SAMUEL, 2012).

Em 2006 Nogueira Filho *et al.* classificaram as queijarias do Nordeste como empresas familiares (95%), societária (3%) e cooperativada (2 %), sendo a principal forma jurídica a

informal (71,6%), onde grande parte da produção ainda é feita de forma artesanal (CHALITA *et al.*, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2011). A fabricação de queijos artesanais utiliza tecnologias próprias e rudimentares pelos produtores de menor renda e pelos grupos influenciados pela identidade cultural (SOBRAL; PAULA; SILVA, 2007).

1.3.3 Processo tecnológico de fabricação do queijo de coalho

Atualmente no Brasil, a fabricação de queijo de coalho é regulamentada por meio da instrução normativa (IN) nº 30, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade do Queijo de coalho e estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir a fabricação do queijo de coalho destinado ao consumo humano, bem como pela Portaria nº146 de 7 de março de 1996, do Ministério da Agricultura do Abastecimento, que aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos Queijos (BRASIL, 1996; 2001).

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

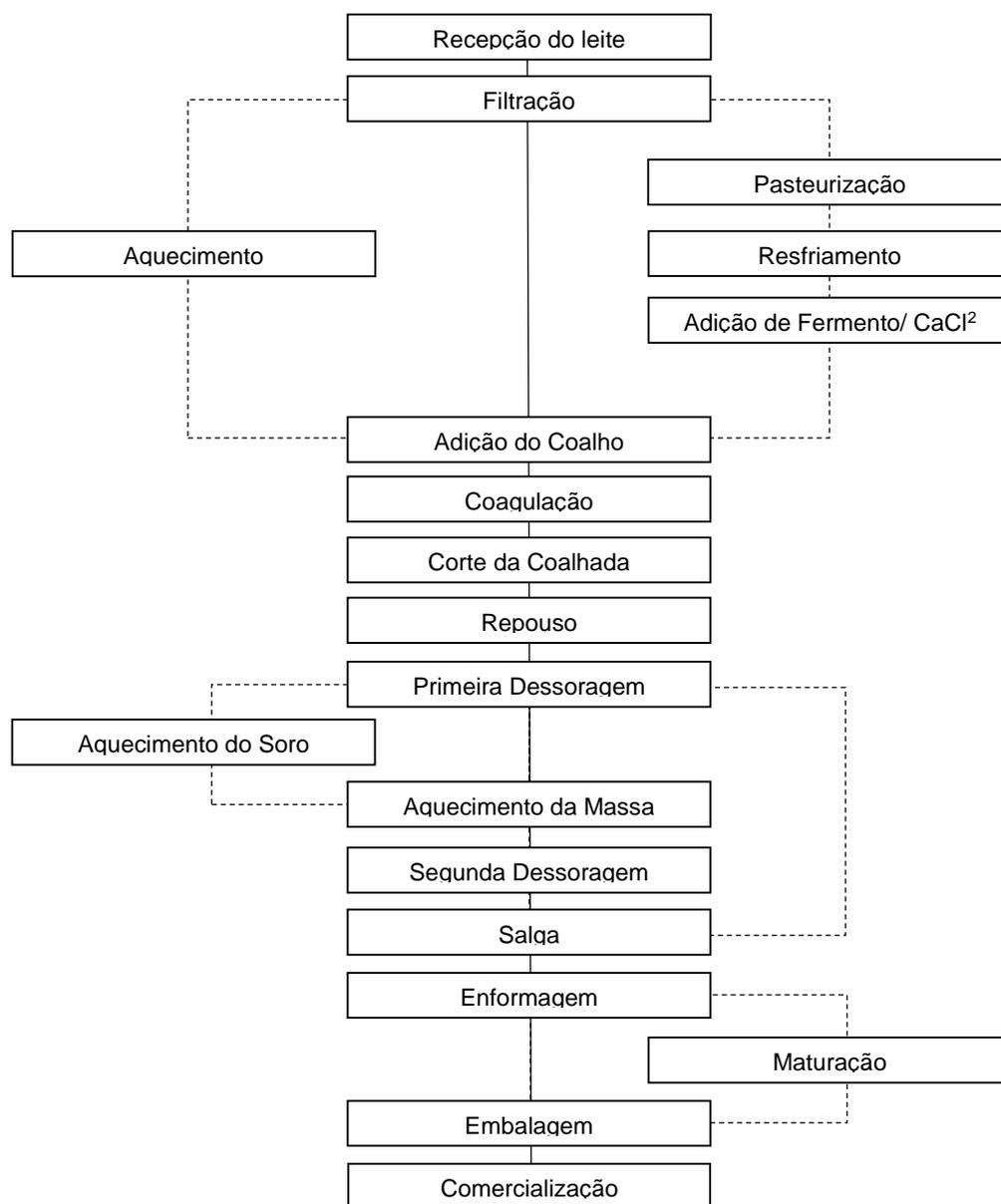
De modo generalista a produção dos queijos constitui basicamente um processo de concentração do leite no qual envolve etapas básicas, comum a todos os queijos, das quais são: coagulação, sinérese, corte da coalhada, enformagem/prensagem, salga e maturação (Figura 1.1) (PERRY, 2004; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

A seleção do leite é uma etapa primordialmente importante que antecede a fabricação dos queijos. A qualidade microbiológica e química do leite está estritamente ligada ao sucesso na fabricação do queijo. O leite utilizado deve respeitar os quesitos estipulados pela legislação. Para a produção do queijo de coalho a IN nº 30 (BRASIL, 2001) orienta que o leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, de modo que assegure a fosfatase alcalina residual negativa.

Diante dos diversos problemas ocasionados pelo consumo de leite e derivados oriundos de leite cru, o processo de pasteurização do leite tornou-se exigência de legislações específicas, as quais atualmente se encontram estabelecidas na Instrução Normativa 62

(BRASIL, 2011) que preconiza que a pasteurização do leite utilizado na fabricação dos queijos seja realizada à temperatura de 72°C a 75°C durante 15 a 20 segundos.

Figura 1.1 – Fluxograma geral para a produção de queijo de coalho



Fonte: DANTAS, 2012.

A Coagulação é a primeira etapa básica do processamento de queijos. Compreende a transformação do leite fluído para um estado em gel, também conhecido como coalhada (FOX *et al.*, 2000).

O mecanismo de formação da coalhada ou coágulo decorre por meio de modificações físico-químicas provocadas na estrutura das micelas de caseína, principal proteína do leite. Esta ação pode ser promovida por meio de acidificação ou por ação enzimática (ADAMS, 1997; PERRY, 2004).

A coagulação pelo modo enzimático é o processo mais utilizado e é obtido por atuação de enzimas específicas conhecidas como coalho ou coagulantes. A designação coalho é particular às enzimas obtidas de estômago de animais ruminantes já a denominação coagulante fica direcionada para todas as outras enzimas utilizadas para o processo de coagulação, como por exemplo, os coagulantes vegetais e microbianos (FOODS INGREDIENTS BRASIL, 2011).

A IN nº 30 (BRASIL, 2001) define que o queijo de coalho se obtém por coagulação do leite (por um período de 40 minutos) através da ação do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas.

Tradicionalmente no fabrico de queijos utilizam-se os coalhos de origem animal, principalmente de ascendência bovina e suína. Porém devido as necessidades especiais do mercado foram desenvolvidos coalhos de procedência microbiana e vegetal. Os coalhos vegetais apresentam em geral, bom desempenho, porém um inconveniente à sua aplicação é o sabor residual amargo que os queijos produzidos com ele costumam apresentar depois de algum tempo de armazenamento. Os coalhos de origem microbiana possuem atributos bastante análogos aos de procedência animal (PERRY, 2004).

No processo de coagulação por modo enzimático a enzima irá atuar hidrolisando as ligações peptídicas da kappa caseína, pela proteólise limitada (quebra da ligação peptídica Phe₁₀₅ – Met₁₀₆), transformando-a em para-caseína, que se agrega em presença de íons Ca⁺² formando, assim, o gel de coalhada, onde todos os componentes do leite (principalmente proteínas e gordura) são aprisionados na estrutura formada (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; FOODS INGREDIENTES BRASIL, 2011).

A adição de cloreto de cálcio (CaCl₂) durante a coagulação é comum, permitido por lei (BRASIL, 2001) e é utilizada com o intuito de aumentar o teor de íons Ca²⁺ no leite para acelerar a coagulação da caseína e ajudar a firmar o coágulo. É empregado, especialmente, quando o teor de proteína no leite não é o ideal (PERRY, 2004).

Após a formação da coalhada é realizado a etapa de corte seguido da mexedura da massa, para a liberação do lacto soro (processo chamado de sinérese ou dessoragem). O corte do coágulo deve ser efetivado no momento correspondente (ponto de corte); se realizado antes, devido à natureza delicada do coágulo, ocorrerá um menor rendimento, devido às perdas de proteína e gordura e, se realizado depois do ponto, o coágulo estará

muito rígido e dessa forma a dessoragem torna-se mais difícil, resultando em queijos com variações de umidade (BORZANI *et al.*, 2001).

O lactosoro, cujo teor varia com o tipo de queijo, retém cerca de 55% dos nutrientes do leite (proteínas, sais minerais e vitaminas). Aproximadamente 75% das proteínas do leite são aproveitadas em queijos obtidos por coagulação enzimática, o restante é retido no soro. Cerca de 85% a 90% do volume de leite utilizado na fabricação do queijo resulta em soro, sendo parte desse subproduto aproveitado como matéria-prima na produção de iogurtes, ricota e outros produtos lácteos (KOSIKOWSKI, 1982; FOX; MCSWEENEY, 1998; WALSTRA *et al.*, 1999; PERRY, 2004).

Alguns fatores favorecem o processo de dessoragem, tais como: menor espessura do corte, presença de íons de cálcio, baixo pH, aumento da temperatura de cozimento, mexedura da coalhada durante o cozimento, maior teor de proteínas e menor teor de gordura (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Após este processo a massa pode ser reaquecida com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semi cozida (até 45°C) ou cozida a uma temperatura entre 45° e 55°C. A legislação, IN nº 30 (MAPA), prediz que esse queijo também poderá ser elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento) (BRASIL, 2001).

Posteriormente a massa, aquecida ou não, é separada do soro e segue para as etapas de enformagem e salga. A salga (adição de cloreto de sódio) é uma etapa independente e pode ocorrer em distintos momentos da fase produtiva. Os métodos mais comuns de salga são: no leite, na massa, em salmoura e a seco. A adição de cloreto de sódio (NaCl) é de grande importância, uma vez que possui várias funções nos queijos, exercendo ampla influência na maturação, de modo que se não for bem conduzida, pode ser causa de diversos defeitos nos queijos (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). O teor de sal no queijo de coalho não é determinado por legislação, porém a IN nº30 (BRASIL, 2001) especifica que a adição de sal (cloreto de sódio) deve ser feita na massa. Cavalcante *et al.* (2007) afirmam que a quantidade de sal usada para o queijo Coalho comum é 0,8-1,0% e para o queijo Coalho no espeto ou palito é 1,2%, calculada sobre o volume de leite processado.

Na etapa de enformagem/prensagem a massa é depositada em formas, de tamanho e formatos específicos, para que ocorra a drenagem do soro entre os grãos e se forme uma massa contínua e homogênea (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

A maturação é a última etapa de processamento do queijo. Nessa fase o produto é mantido sob determinadas condições de temperatura e (10°C a 12°C) umidade relativa (75% a 80%), para desenvolver textura, aroma e sabor, devido as numerosas modificações microbiológicas, bioquímicas, físicas e químicas que ocorrem neste momento (NASSU;

MACEDO; LIMA, 2006; CAVALCANTE *et al.*, 2007; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). A IN nº 30 institui que o queijo de coalho deve ser maturado por um período entre 5 a 10 dias sob refrigeração (BRASIL, 2001).

Apesar das exigências legais estabelecidas, a fabricação do queijo de coalho, na grande maioria, não obedece o que é preconizado pela legislação (DANTAS, 2012).

Com isso, este produto apresenta uma grande probabilidade de encontrar-se contaminado, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, falta de higiene durante o processamento, armazenamento e transporte (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

1.3.4 Qualidade e segurança microbiológica do queijo de coalho

A pesar de sua notoriedade, principalmente para a região Nordeste do Brasil, o queijo de coalho ainda está associado a uma imagem de alimento pouco seguro, do ponto de vista higiênico-sanitário, para a saúde do consumidor, em função de problemas atrelados a sua produção, sobretudo no que tange ao modo artesanal de sua fabricação (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Grande parte da produção tem origem na fabricação artesanal, sendo oriunda de produção caseira, em propriedades rurais de pequeno porte ou da Agricultura de Base Familiar (GOMES *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; DANTAS, 2012).

Menezes, Silva e Samuel, (2012), ao conhecerem produtores/comerciantes de queijo de coalho, constataram que, mesmo diante dos avanços técnico-científicos a produção de queijos, exibem uma resistência as inovações e estes produtores/comerciantes dão continuidade em transmitir o saber-fazer.

O saber-fazer engloba os conhecimentos e técnicas utilizadas na elaboração do queijo de coalho herdado dos antepassados, bem como os instrumentos empregados no seu beneficiamento, que condizem com a realidade estrutural-financeira de cada produtor (Figura 1.2 e 1.3).

Por não necessitar de equipamentos caros no processo produtivo e pela simplicidade no processo tecnológico de fabricação o modo de processamento do queijo de coalho é realizado de maneira rudimentar e formas variáveis (Figura 1.3), resultando em produto com variações de processamento, sem padronização, apesar de ser tradicional, e com baixa qualidade (ANDRADE, 2006; GOMES *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2012; DANTAS, 2012).

Figura 1.2 – Prensa utilizada na fabricação do queijo de coalho produzido na comunidade de Tiasol, em Tauá, CE



Fonte: ARAÚJO, *et al.*, 2012.

Figura 1.3 - Produção artesanal de queijo coalho no município de Jucati- PE



Fonte: FREITAS FILHO, *et al.*, 2009.

A lacuna de cuidados quanto à qualidade da matéria prima e as condições de processamento introduzem no mercado produtos de pouca qualidade e insuficiente segurança higiênico-sanitário, por não atenderem aos requisitos mínimos de qualidade exigidos pela legislação quanto ao queijo de coalho fabricado para o consumo humano (DUARTE *et al.*, 2005; ANDRADE, 2006; LIMA, 2010; ALMEIDA; JÚNIOR FERNANDO; GUERRA, 2013).

O principal aspecto pertinente ao empenho da qualidade da matéria-prima relaciona-se ao uso de leite cru, sem pasteurização, obtido sem os devidos cuidados de higiene e sem beneficiamento térmico adequado (GOMES *et al.*, 2011; PACHECO, 2011; DANTAS, 2012; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013).

Apesar das exigências legais que institui a pasteurização do leite (ou submissão a tratamento térmico equivalente), como um dos requisitos mínimos a ser cumprido para destinação desse tipo de queijo ao comércio, e pelo discurso da segurança alimentar, criado para avigorar a seriedade da pasteurização do leite na fabricação de queijos sobre o entendimento de que a inocuidade dos produtos lácteos começa pela pasteurização do leite, uma vez que o leite cru pode aninhar microrganismos patogênicos, representando riscos à saúde, o uso de leite cru ainda é uma realidade persistente (BRASIL, 2001; DUARTE *et al.*, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2007; ARAÚJO, *et al.*, 2009; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013).

Se tratando das condições de processamento (técnicas e estruturas de fabrico), estas também ficam à margem dos padrões oficiais (Figuras 1.4 e 1.5), e o principal entrave quanto

a este quesito se reporta a não adoção ou deficiência nos procedimentos de BPF (SENA *et al.*, 2000; ESCOBAR *et al.*, 2001; FEITOSA *et al.* 2003; DUARTE *et al.*, 2005; LUZ, 2008).

Figura 1.4 – Condições de maturação do queijo de coalho produzido por pequenos produtores no município de Jucati- PE



Fonte: FREITAS FILHO, *et al.*, 2009.

Figura 1.5 – Local de exposição do queijo de coalho



Fonte: FREITAS FILHO, *et al.*, 2009.

É sabido que as condições de processamento são imprescindíveis para a obtenção de produtos de qualidade e para a proteção da saúde do consumidor, uma vez que a presença de certos microrganismo e suas toxinas constituem as causas mais frequentes de problemas sanitários relacionados aos produtos lácteos (FURTADO, 1990, 1991; FOX, 1993; ARAÚJO *et al.*, 2009; FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013).

A falta de cuidado higiênico-sanitário no ambiente de produção de queijo de coalho consiste em uma problemática séria por se tratar de produto altamente manipulado que viabiliza a presença de microrganismos indicadores e contaminação por bactérias patogênicas no produto final (RUWER; MOURA; GONÇALVES, 2011).

Esta problemática ainda se agrava devido às condições precárias nas etapas pós-processamento (transporte, armazenamento e comercialização) do queijo de coalho (Figura 1.6 e 1.7).

As áreas de venda apresentam infraestrutura inadequada, falta de acesso à água potável e a instalações sanitárias sem contar que, as vendas desses alimentos, na maioria das vezes, são realizadas por pessoas sem capacitação e conhecimento para a manipulação correta, sob condições de higiene insatisfatórias e armazenamento inadequado o que faz aumentar os riscos do produto servir como veículo de doenças (CATANOZI; MORELHÃO;

IURCIC, 1999; DALLARI *et al.*, 2000; HANASHIRO *et al.*, 2002; FURLANETO; KATOAKA, 2004).

Figura 1.6 – Tipo de caixa utilizada para o transporte do queijo de coalho produzido na comunidade de Tiasol, em Tauá, CE



Fonte: ARAÚJO, *et al.* 2012.

Figura 1.7 – Exposição das peças de queijo de coalho no local de comercialização



Fonte: ARAÚJO, *et al.* 2012.

Devido à precariedade com que este alimento é preparado e comercializado, o queijo de coalho torna-se um produto de vida de prateleira reduzido pela suscetibilidade a contaminações microbianas, em função das suas características nutritivas e da contaminação cruzada durante ou após o processamento, e um potente veículo de contaminantes, dentre os quais se pode citar a *L. monocytogenes*, que constitui um importante indicador do aspecto higiênico-sanitário, caracterizando condições higiênicas insatisfatórias além de representar um risco à saúde do consumidor devido a sua patogenicidade (BALBANI; BUTUGAN, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2001; PAGANI *et al.*, 2012).

1.3.5 Contaminação por *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, não produtora de esporos ou cápsulas, possui motilidade em determinadas condições (entre 20 e 25°C), e ainda apresenta natureza microaerófila (ROCOURT; BUCHRIESER, 2007). A temperatura ótima de crescimento deste microrganismo fica na faixa de 30 a 37°C (SILVA *et al.*, 2011), porém é capaz de multiplicar-se sob refrigeração e crescer a baixas temperaturas, inferiores ao ponto de congelamento, suportando repetidos congelamentos e descongelamentos, o que torna um

desafio o seu controle na cadeia de produção de alimentos (FARBER et al., 1991; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

Podem, ainda, crescer em pH variando entre 5 e 9, atividade de água (A_w) mínima de 0,9 e toleram altas concentrações de cloreto de sódio, superiores a 10% (SILVA et al., 2011).

O habitat natural de *L. monocytogenes* é o ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 2005a), isso explica o fato dessa bactéria ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, “in natura” ou processados. O leite e seus derivados estão entre os produtos alimentícios mais frequentes (BARANCELLI et al., 2011).

A natureza ubíqua de *L. monocytogenes* torna a sua transferência para dentro das unidades processadoras de alimentos uma ação simples, facilitando, assim, a contaminação dos alimentos nos ambientes de processamento e a formação dos biofilmes que, por vez, acaba provocando contaminações recorrentes no produto final devido a sua permanência no ambiente durante meses ou anos (WAAK et al., 2002; SILVA et al., 2003; KABUKI et al., 2004; KELLS; GILMOUR, 2004; CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2011).

A entrada deste microrganismo nas indústrias lácteas ocorre por distintas vias, iniciando pela qualidade do leite. Sua presença na matéria prima pode acontecer devido a eliminação de cepas por animais portadores, assintomáticos ou sintomáticos e/ou pela contaminação cruzada no momento da ordenha mal executada, quando se utiliza leite cru no beneficiamento, e pela pasteurização inadequada (SWAMINATHAN, 2001; IVANEK et al., 2006).

Um levantamento realizado por Silva et al. (2011) sobre a ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e derivados, entre 2000 e 2009, no Brasil, demonstra uma ocorrência de até 37,8% deste patógeno em leite cru e em leite pasteurizado este percentual chegou a ser de até 30%. Os autores afirmam que esses resultados são um indicativo de erros que ocorrem no processamento térmico de alguns produtos, uma vez que a pasteurização realizada em temperatura e tempo corretos elimina esse microrganismo.

A literatura também tem descrito intercorrências por contaminação cruzada subsequente ao processo de pasteurização, por meio de utensílios e equipamentos contaminados, sistema de ventilação, água, veiculação do agente por operários e/ou visitantes doentes ou por resíduos, carreando pelo seu fardamento, entre outros pontos críticos de controle. Este fato aliado, em especial, a não adoção das BPF perpetua o ciclo de transmissão desta bactéria na cadeia produtiva de laticínios (SWAMINATHAN, 2001; TOMPKIN, 2002).

Em Fortaleza, Figueiredo (2000) detectou a presença de *L. monocytogenes* em leite pasteurizado e em amostras de leite cru, fresco e refrigerado avaliadas em uma indústria

beneficiadora de leite. No mesmo estudo foi detectado a presença do patógeno em tanque de recepção do leite cru, caixas plásticas de transporte de leite, drenos e pisos.

Estudo realizado na Suécia constatou a presença de cepas de *L. monocytogenes*, sorotipo 3b, em silos de armazenamento de leite em uma planta de processamento de queijo blue veined (WAAK *et al.*, 2002).

Kells e Gilmour (2004) verificaram alta ocorrência de *L. monocytogenes* em amostras de leite cru, equipamentos e no ambiente de processamento em indústria de processamento de leite. O percentual de contaminação foi de 22%, 6% e 41%, respectivamente, e as principais fontes de contaminação apontadas foram os drenos e as escadas de aço inoxidável.

Ho, Lapp e Wiedmann (2007) associaram o ambiente de ordenha como vias de transmissão de *L. monocytogenes* na indústria de laticínios de leite de ovelha nos EUA.

Mais recentemente, Alessandria *et al.* (2010) observaram a presença de *L. monocytogenes* em superfícies de equipamentos e ambientes de indústria processadora de lácteos.

Frece *et al.* (2010) também constataram positividade para a presença do microrganismo, ao testarem diferentes métodos de detecção do patógeno em amostras de leite, queijo fresco e creme de leite.

Munoz *et al.* (2013) averiguaram que 10,4% dos manipuladores de alimentos de produtos lácteos e cárneos na Colômbia apresentaram resultado positivo para a presença do patógeno, sendo 56% destes portadores pertencendo a empresas produtoras de produtos lácteos.

Parisi *et al.* (2013) detectaram *L. monocytogenes* em 20,6% das fábricas de produtos lácteos avaliadas que apresentaram positividade para *Listeria* spp., sendo encontradas em amostras de alimentos (2,4%), superfícies (4,9%) e drenos (18,8%).

Rückerl *et al.* (2014) observaram um cenário de contaminação substancial ao encontrarem taxas de ocorrência global de 19,5%, para a presença de *L. monocytogenes* no ambiente de processamento de alimentos, matérias-primas e de produtos de uma unidade produtora de laticínios.

Nas indústrias processadoras de queijo, os mesmos pontos crítico de controle também têm sido evidenciados como fatores responsáveis pela contaminação cruzada deste produto. Silva *et al.* (2003) diagnosticaram a contaminação do queijo Minas frescal ao mesmo tempo que detectaram a presença deste patógeno no leite cru e no piso da sala de estocagem do leite.

L. monocytogenes, sorotipo 1/2a de mesmo perfil genético, foram identificados em queijos, equipamentos e utensílios em uma indústria processadora de queijo Minas em Minas

Gerais. O refrigerador do estoque foi apontado como a fonte de contaminação dos queijos por esta bactéria (BRITO *et al.*, 2008).

Kabuki *et al.* (2004) ao realizarem um diagnóstico da contaminação por *L. monocytogenes* em indústrias norte americana processadoras de queijos frescos averiguaram a presença em 6,3 % nas amostras de queijos e em 11% das amostras ambientais, que apontavam: superfícies de mesas, tubos de conexões de plástico, caixas vazadas, embalagem de leite, drenos e pisos como locais de permanência do microrganismo.

Makino *et al.* (2005) verificaram resultados semelhantes em várias amostras do ambiente de processamento em uma unidade produtora de queijos no Japão. A contaminação foi constatada pela presença de cepas do sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b no tanque de resfriamento do leite, na sala de produção e cura, dreno e fezes de trabalhadores.

Fox *et al.* (2011) ao avaliarem a presença de *L. monocytogenes* em instalações de fabrico de queijo observaram que grande parte das amostras avaliadas apresentaram positividade para a presença desta bactéria. Sendo observado um percentual de contaminação em 6,3% no leite, 13,1% no ambiente de processamento e 12.3% nas amostras externas ao ambiente de processamento.

Almeida *et al.* (2013) também encontraram a presença de *L. monocytogenes* dentro dos ambientes de fabricação de unidades produtoras de queijos de ovelha artesanal e industrial.

Barancelli *et al.* (2014) ao avaliarem a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijo e no ambiente de três fábricas de laticínios de pequena escala também encontraram positividade para a bactéria.

Os queijos são os produtos lácteos mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*, principalmente os de alta e média umidade (BARANCELLI *et al.* 2011). Isso faz com que os queijos sejam apontados como um importante veículo desse patógeno.

Borges *et al.* (2009), em sua pesquisa sobre a contaminação de leite e produtos lácteos causada por *L. monocytogenes*, afirmam que a prevalência desta bactéria tem sido relatada em diferentes tipos de queijos em diversos países e que a ocorrência chega a ser de até 46 %. No Brasil, Silva *et al.*, (2011) registraram resultados semelhantes, com uma ocorrência de até 48,3% do patógeno em diversos queijos produzidos entre o período de 2000 à 2009. Na Tabela 1.1 estão descritos estudos que apontam a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos produzidos no Brasil.

Tabela 1.1- Ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos produzidos no Brasil

Produtos	% de amostras contaminadas por <i>L. monocytogenes</i>	Local	Referência
Minas frescal	10%	Campinas, SP	Destro <i>et al.</i> (1991)
Minas frescal	6,7%	São Paulo, SP	Furlanetto <i>et al.</i> (1996)
Minas frescal artesanal	41,2%	R. de Janeiro, RJ	Silva <i>et al.</i> (1998)
Minas frescal e ricota	3%	R. de Janeiro, RJ	Silva <i>et al.</i> (1998)
Brie, Gorgonzola, Roquefort	5,7%	Rio de Janeiro - RJ	Silva <i>et al.</i> (1998)
Queijo Minas frescal	25%	Campinas - SP	Vieira e Massaguer (2000)
Queijo tipo coalho	20%	João Pessoa - PB	Sousa <i>et al.</i> (2000)
Queijo Minas frescal	4,8%	Minas Gerais	Pereira <i>et al.</i> (2001)
Queijo Minas frescal	15%	Jaboticabal - SP	Schocken-Iturrino <i>et al.</i> (2001)
Queijo Minas frescal	8,0%	Araguaína - TO	Vieira <i>et al.</i> (2001)
Diversos tipos de queijo	3,1%	Várias cidades – MG	Ornelas <i>et al.</i> (2002)
Queijo de média umidade	8,0%	Rio Grande do Sul	Pompermayer <i>et al.</i> (2002)
Queijo curado	48,3%	Salvador – BA	Leite <i>et al.</i> (2002)
Queijo	6,9%	Paraná	Moscalski <i>et al.</i> (2003)
Queijo tipo coalho artesanal	1,7%	Manaus - AM	Ramos e Costa (2004)
Queijo Minas frescal	16%	Rio de Janeiro	Sá <i>et al.</i> (2003)
Queijo coalho	2,3%	Ceará	Borges <i>et al.</i> (2004)
Queijo coalho	16%	Fortaleza - CE	Castelo Branco <i>et al.</i> (2004)
Queijo Minas frescal artesanal	2,5%	Serra da Canastra – MG	Ornelas <i>et al.</i> (2005)

Produtos	% de amostras contaminadas por <i>L. monocytogenes</i>	Local	Referência
Ricota	6,8%	Campinas - SP	Esper e Kuaye (2005)
Queijo Minas artesanal	3,8%	Região litorânea – RS	Zaffari <i>et al.</i> (2005)
Queijos	6,0%	Paraná	Abrahão <i>et al.</i> (2005)
Diversos tipos de queijo	0,6%	Minas Gerais	Ornelas <i>et al.</i> (2007)
Diversos tipos de queijo	5,0%	São Luís - MA	Nascimento <i>et al.</i> (2007)
Queijo Minas frescal	11%	Juiz de Fora – MG	Brito <i>et al.</i> (2008)
Diversos tipos de queijo	6,7%	Paraná	Abrahão <i>et al.</i> (2008)
Queijo Minas	4,7%	Belo Horizonte – MG	Pereira <i>et al.</i> (2009)
Ricotas	6,7%	Campinas-SP	Esper <i>et al.</i> (2011)
Queijo	21,6%	São Paulo	Barancelli <i>et al.</i> (2014)
Queijos frescais e ricotas	4,7%	Paraná	Bernardi (2014)
Queijo Minas Frescal	17%	Rio de Janeiro	Penteado <i>et al.</i> (2012)

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* 2011.

Em queijos de coalho a incidência de *L. monocytogenes* varia entre os queijos de fabricação artesanal e os industrializados (BORGES *et al.*, 2009).

Na cidade de João Pessoa-PB foram analisadas 30 amostras de queijo de coalho, provenientes de diversos postos de venda do comércio objetivando-se verificar a ocorrência de *L. monocytogenes*. Os resultados demonstraram a presença do patógeno em 50% das amostras avaliadas (SOUSA; LIMA; SOUSA, 2000).

Leite *et al.* (2002) ao avaliarem queijo de coalho comercializado na cidade de Salvador (BA) – Brasil, com e sem o registro do Serviço de Inspeção Federal (SIF), observaram positividade para a presença de *L. monocytogenes* nas amostras avaliadas.

Borges *et al.* (2004) observou uma taxa de 19% de ocorrência do patógeno em queijo industrializado, armazenado sob refrigeração em Fortaleza (CE, Brasil).

Ramos e Costa (2003) encontraram presença de *L. monocytogenes* em uma amostra de queijo de coalho coletadas de mercados e feiras livres da cidade de Manaus – AM e a soro variedade apresentada foi a 1/2b sendo a mesma encontrada entre aquelas mais isoladas de infecções humanas.

Duarte *et al.* (2005), pesquisando *L. monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco observou um percentual de 5,5% de positividade.

Sousa *et al.* (2006) identificaram a presença de *L. monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializados em temperatura ambiente na cidade de Fortaleza, demonstrando que o produto pode ser um substrato para o crescimento dessa bactéria e veículo de listeriose para os consumidores.

1.3.6 Listeriose

A ingestão de produtos contaminados com organismos viáveis de *L. monocytogenes* pode desencadear a listeriose (PEARSON; MARTH, 1980; GANDHI; CHIKINDAS, 2007).

Listeriose é uma doença originada por uma infecção oportunista que acomete homens e animais (GOLDFINE; SHEN, 2007). Nos seres humanos as formas clínicas podem se manifestar na forma cutânea, não-invasiva ou invasiva (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

A forma cutânea apresenta-se como uma infecção eczematosa ocasionada pela exposição direta da pele a células de *L. monocytogenes*, geralmente ocorre no contato com animais doentes e com materiais infectados resultantes de aborto (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; GODSHAL *et al.*, 2013).

A listeriose não invasiva é caracterizada por um quadro de gastroenterite febril acompanhada de vômitos e diarreia (SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007; CRUZ *et al.*, 2008). A forma invasiva é a mais perigosa, acomete, principalmente, pessoas com sistemas com déficit no sistema imunológico (GOLDFINE; SHEN, 2007; SWAMINATHAN; GERNER-SMIDT, 2007).

A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados, ocorrendo isoladamente e/ou em surtos (SCHLECH *et al.*, 1983).

Na década de 80, casos de listeriose humana (esporádicos e/ou surtos) começaram a ser descritos na literatura. Muitos foram confirmados e relacionados ao consumo de alimentos, dos quais, em alguns casos os queijos encontravam-se envolvidos (BORGES *et al.*, 2009).

A literatura descreve vários casos de listeriose associados ao consumo de diversos tipos de queijos (Tabela 1.1).

Tabela 1.2 – Listeriose associado ao consumo de queijos

Ano	Local	Nº de casos (morte)	Tipo de queijo	Referências
1983 1987	Suíça	122 (31)	Queijo macio	Billeet <i>al.</i> (1990)
1985	EUA	142 (48)	Queijo fresco estilo mexicano	Anonymous, (1985) Linnanet <i>al.</i> (1988)
1989 1990	Dinamarca	26 (6)	Queijo de mofo azul	Jensenet <i>al.</i> (1994)
1995	França	37 (11)	Queijo macio com leite cru	Gouletet <i>al.</i> (1995) Rocourtet <i>al.</i> (1998) Lundénet <i>al.</i> (2004)
1997 2000	França	14	Queijo macio	Jacquetet <i>al.</i> (1999)
- 2001	EUA	13	Queijo fresco estilo mexicano	CDC (2001) MacDonald <i>et al.</i> (2005)
2001	Suécia	>120	Queijo fresco feito com leite cru	Carrique-Maset <i>al.</i> (2003) Danielsson-Thamet <i>al.</i> (2004)
2001	Japão	38	Queijo	Makinoet <i>al.</i> (2005)
2002	Canadá	47	Queijo	Pagottoet <i>al.</i> (2006)
2002	Canadá	17	Queijo macio feito com leite cru	Gaulinet <i>al.</i> (2003) Pagotto et al. (2006)
2002	Canadá	86	Queijo feito com leite pasteurizado	Pagottoet <i>al.</i> (2006)

Ano	Local	Nº de casos (morte)	Tipo de queijo	Referências
2003	EUA	13 (2)	Queijo fresco estilo mexicano	Carriedo (2003) Swaminathan e GernerSmidt (2007)
2005	Suíça	10 (3)	Queijo macio	Bille <i>et al.</i> (2005)
2008	Canadá	38 (2)	Queijo	MSSS (2009)
2009	Áustria, Alemanha e República Tcheca	34 (8)	Queijo "Quargel"	Fretzet <i>et al.</i> (2010)
2014	EUA	8 (1)	Queijo fresco estilo mexicano	CDC (2014)

Fonte: DIRECTORATE (2011) e CDC (2014) *apud* Bernardi (2014)

No Brasil a notificação dos surtos e dos casos de listeriose ainda são escassas, sendo muitas vezes sub diagnosticadas e subnotificadas. Além disso, nos estudos realizados no país, não se estabelece nenhum tipo de relação entre a prevalência do microrganismo e a via de transmissão do mesmo, embora diversos trabalhos mostrem a circulação de *L. monocytogenes* na espécie humana e sua ocorrência tenha sido relatada em vários tipos de alimentos (SILVA *et al.*, 1998; KABUKI *et al.*, 2004; BORGES *et al.*, 2009; BARANCELLI *et al.*, 2011).

Ainda que exista uma margem de risco para todos os consumidores, este patógeno é particularmente temido devido a sua forte associação com septicemia, encefalite, meningite e altos índices de mortalidade entre neonatos, idosos e imunocomprometidos e ainda, abortos em gestantes, que são considerados como grupos de risco (FERREIRA, 2006).

A gravidade da infecção provocada por *L. monocytogenes* depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe, carga microbiana presente no alimento contaminado, da quantidade de células bacterianas ingeridas, da composição do alimento, do sistema imune intestinal e integridade do epitélio intestinal (DELGADO, 2008).

A dose infecciosa para o desenvolvimento do quadro de listeriose, irá depender da vulnerabilidade do consumidor, ou seja, varia em acordo com sua idade e estado de saúde geral (FORSYTHE, 2010). Estima-se que uma quantidade de 10^2 UFC (unidades formadoras de colônias) até 10^9 UFC, seja suficiente, porém depende do estado imunitário do hospedeiro e da virulência da cepa.

Adaptações às mudanças ambientais induzem alterações fisiológicas nas cepas de *L. monocytogenes*, tornando-as mais capazes de expressar sua virulência e causar infecção (STEPHENS, 1991; JEMMI; STEPHAN, 2006).

L. monocytogenes possui 13 sorotipos (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab 4b, 4c, 4d, 4e e 7) que se distinguem em três linhagens genéticas: linhagem I composta pelos sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, linhagem II com os sorotipos 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e linha III com os sorotipos 4a e 4c (BROSCH *et al.*, 1994; LUDWIG *et al.*, 2009).

Os estudos de incidência desta bactéria têm apontado para os isolados pertencentes à linhagem I como sendo os que predominam em infecções humanas, os isolados da linhagem II provêm essencialmente de alimentos e do meio ambiente enquanto os isolados da linhagem III ocorrem frequentemente em animais (WESLEY, 2007).

Todas as cepas de *L. monocytogenes* são consideradas igualmente patogênicas em países com sistemas de vigilância atuantes (LARSEN *et al.*, 2002).

Este microrganismo tem a capacidade de evitar a resposta do sistema imune humoral por se multiplicar dentro da célula hospedeira e por disseminar-se através da passagem célula-célula (VAZQUEZ-BOLAND, 2001).

Seu ciclo celular, nas células eucarióticas, assemelha-se e é iniciado com a adesão da bactéria à superfície da célula eucariótica e posterior entrada por meio de fagocitose. Em células não-fagocíticas a invasão ocorre pela interação entre moléculas ligante presentes na superfície da membrana bacteriana e receptores da superfície da célula eucariótica. *L. monocytogenes* possui a capacidade de reconhecer diferentes receptores nas células eucarióticas, além de componentes da matriz extracelular, que interagem com proteínas ligantes da superfície da bactéria e atuam no processo de internalização da bactéria (GAILLARD, 1991; IRETON, 1998; BRAUN, 2000; COSSART 2000; PIZZARRO-CERDA; 2006).

A translocação do patógeno ocorre por um mecanismo conhecido como “zíper”, onde a bactéria progressivamente vai penetrando na célula até que seja totalmente internalizada. *L. monocytogenes* possui mecanismos que impedem a fusão do fagossomo com lisossomo, no citoplasma, evitando, desta maneira, a ação de enzimas que poderiam levar a sua destruição. Desta forma o ciclo de infecção é estabelecido e sua disseminação para outros tecidos mais profundos, pode ocorrer via corrente sanguínea ou linfonodos (FINLAY *et al.*, 1991; ISBERG; 1994; SWANSON; 1995; SHEEHAN; 1994; GAILLARD, 1991; IRETON, 1998; VAZQUEZ-BOLAND, 2001; RYSER; 2006).

Sua natureza psicrófila, grande capacidade de resistência as adversidades do meio e patogenicidade torna *L. monocytogenes* um dos patógenos de grande importância na

contaminação de alimentos. Devido a estes fatos é considerado pela organização mundial de saúde um dos cinco mais importantes microrganismos causadores de doenças transmitidas por alimentos. Sua elevada taxa de mortalidade, $\geq 30\%$, situa a listeriose entre as causas mais frequentes de morte originadas através de DTA (BRANCO *et al.*, 2003; DENNY; MCLAUHLIN, 2008).

A legislação brasileira (BRASIL, 1996) estabelece ausência desse patógeno em 25 g de amostra, para queijos com média, alta e muito alta umidade, em virtude da sua patogenicidade para a saúde humana. Ainda assim sua presença tem sido observada comumente em queijos, dentre eles o tipo “coalho” (SWAMINATHAN, 2001; BRANCO, *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003; KABUKI *et al.*, 2004; SOUSA *et al.*, 2006; JEMMI; STEPHAN, 2006; DENNY; MCLAUHLIN, 2008; PENTEADO *et al.*, 2012).

Portanto, diante dos fatos, observa-se a necessidade do emprego de processos de conservação que primem pela qualidade microbiológica dos queijos, em especial o queijo de coalho, por ser reconhecido como um importante vetor de transmissão dessa doença.

As novas tecnologias de preservação de alimentos (tecnologias não térmicas, diferentes sistemas de embalagens, biopreservação e produtos antimicrobianos naturais como sistema lactoperoxidase, bacteriocinas, lisozima, quitosana e os derivados vegetais) vem sendo cada vez mais valorizada pelo mercado por atenderem as crescentes mudanças no processamento industrial e exigência do consumidor por alimentos mais naturais, nutritivos, com uma vida útil prolongada, e que ao mesmo tempo mantenha a qualidade nutricional e sensorial (DEVLIEGHERE *et al.*, 2004; FAI *et al.*, 2008a).

O uso de substâncias antimicrobianas naturais, tem sido difundido desde os anos 80 por apresentarem uma ação sinérgica à dos conservantes químicos em produtos alimentícios e não representarem risco a saúde do consumidor, principalmente, em virtude da possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica (MELO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005).

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

1.3.7 Quitosana

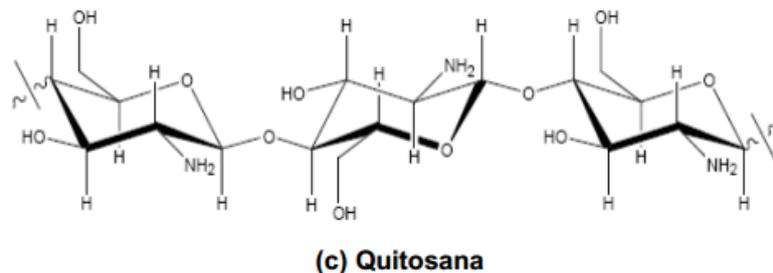
A quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídeo que possui uma estrutura molecular semelhante, quimicamente, a celulose e quitina, que se diferenciam somente nos grupos funcionais (DANCZUK, 2007).

A quitina é um polímero natural, precursor direto da quitosana. Constitui o principal elemento do exoesqueletos de invertebrados marinhos, participando também na estrutura de celenterados, anelídeos, moluscos, artrópodes, leveduras e da maioria dos fungos (RINAUDO, 2006; MATSUI, 2007; NITSCHKE, 2011). Alguns fungos apresentam como componente de suas paredes celulares a quitina e a quitosana simultaneamente, como aqueles pertencentes ao gênero *Zygomycetes*, que podem apresentar até 50% deste na sua estrutura exercendo a função de suporte e proteção para a unidade celular (ASSIS; LEONI, 2003; FRANCO *et al.*, 2005b; ZAMANI *et al.*, 2010).

A forma tradicional de obtenção da quitosana por meio da quitina geralmente se dá a partir de reações de desacetilação em soluções alcalinas. Neste processo, os grupamentos acetamido (-NHCOCH³) da quitina são modificados, em graus variados, em grupos amina (-NH²), dando origem a quitosana (Figura 1.8), que se apresenta como uma mistura de polímeros de tamanhos variados (OLIVEIRA, 2006; SILVA, 2007).

Os processos de obtenção de quitosana a partir de fungos permitem a extração simultânea do biopolímero juntamente com a quitina e apresenta-se como uma alternativa de obtenção do produto (DIAS *et al.* 2013). A quitosana, quimicamente se apresenta na forma de um copolímero formado por unidades estruturais de 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 \rightarrow 4) (STREIT, 2004; ALVES, 2008).

Figura 1.8–Representação esquemática da estrutura química da quitosana



Fonte: Antonino, 2007.

As suas cadeias estruturais ligam-se por meio do hidrogênio e podem diferenciar-se em três diferentes estruturas automórficas (α , β e γ), de acordo com a polaridade adquirida pelas cadeias (WINTEROWD, 1995; LIMA, 2005).

Dentre suas características biológicas e físicas, destaca-se por ser: pouco solúvel em água, sendo sua diluição em soluções aquosas realizada mediante a presença de ácidos orgânicos e inorgânicos; por exibir alta bioatividade; permeabilidade seletiva; ação polieletrólítica; atividade antimicrobiana; habilidade em formar gel e filme; habilidade de quelação; capacidade adsortiva; por ser biodegradável; biocompatível e apresentar baixa toxicidade ao ser humano e animais (D'AYALA *et al.*, 2008; SINGH; VESENTINI; SINGH, 2008; DASH *et al.*, 2011).

O uso de quitosana é seguro. Estudos com quitosana a apontam como sendo uma substância benéfica e segura para o consumo humano por apresentar uma toxicidade menor do que a glicose ou sacarose (YADAV; BHISE, 2004; KANMANI *et al.*, 2011). A ANVISA (BRASIL, 1999) a inclui na lista de "Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos".

O potencial de aplicação da quitosana é multidimensional, suas propriedades singulares fazem com que esta seja bastante versátil quanto à sua aplicabilidade, pois oferece um amplo espectro de aplicações (AZEVEDO *et al.*, 2007; BENTO *et al.*, 2009; MARICATO, 2010).

Na indústria alimentícia sua aplicabilidade tem sido cada vez mais explorada e ampliada, indo desde o uso na elaboração de suplementos nutricionais, até sua utilização como emulsificantes, fibras em biscoito dietéticos, estabilizantes para alimentos em conserva, clarificantes de bebidas (SHAHIDI *et al.*, 1999; BORDERÍAS *et al.*, 2005; BORGOGNI *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007); e como agente conservante em diversos produtos tais como: macarrão, molho de soja, sardinha (RODRÍGUEZ *et al.*, 2002), bacalhau (SHAHIDI *et al.*, 2002), carne de cordeiro (KANATT *et al.*, 2004), salsicha (DAMIAN, 2005), mortadela (CHI *et al.*, 2006), patê de carne (BENTO *et al.*, 2011); suco de acerola (ALBUQUERQUE; STAMFORD, 2011).

A atividade antimicrobiana é uma das características que distinguem a quitosana dos demais polissacarídeos. O mecanismo de ação antimicrobiano da quitosana ainda não está bem definido, de acordo com Azevedo *et al.* (2007), porém sabe-se que este mecanismo está intimamente relacionada às propriedades físico-químicas do polímero, que apode atuar através da ligação à membrana da célula do microrganismo, por meio dos seus grupos amínicos protonados que se ligam seletivamente à superfície celular por meio dos grupos aniônicos, resultando em perda de componentes intracelulares e consequente, inibição microbiana (SILVA *et al.*, 2006; FAI *et al.*, 2008a; KONG *et al.*, 2010).

Outras formas de atuação são atribuídas a ação quelante da quitosana, que se liga seletivamente a traços de elementos ou nutrientes essenciais e inibe o crescimento bacteriano

e por agir sequestrando água e inibindo várias enzimas, ativando diversos mecanismos de defesa nos hospedeiros (HELANDER *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2008).

A eficiência da quitosana como antimicrobiano é comprovada sob diversos microrganismos como *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* (CHUNG *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (LI *et al.*, 2007), *L. monocytogenes* (PORTER *et al.*, 2000; COMA *et al.*, 2002; CHI *et al.*, 2006), *Salmonella entérica*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* (YADAV; BHISE, 2004), *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (COSTA *et al.*, 2006), *Sacharomyces cerevisiae*, *S. ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* (RHOADES; ROLLER, 2000; SAGOO *et al.*, 2002).

As possibilidades de aplicações deste polímero como agente antimicrobiano são ainda mais enriquecidas pelo fato que a quitosana pode ser preparada em diferentes formas, tais como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes e membranas e por apresentar uma boa capacidade de formação de película. (CAMPANA *et al.*, 2007; MORTAZAVIAN *et al.*, 2008).

Com isso estudos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade no aumento da vida pós-colheita de frutas e hortaliças utilizando a quitosana para a formação de coberturas e filmes semipermeáveis com ação antifúngica e bactericida na indústria de alimentos, demonstrando ser uma técnica eficaz de preservação destes produtos, mantendo a aparência, frescor, firmeza e o brilho, e aumentando seu valor comercial (NO *et al.*, 2002; VILLADIEGO *et al.*, 2005; CAMILI, 2007).

Estudos vem demonstrando a eficiência da aplicação de quitosana como filme comestível na preservação de maçãs (ASSIS; LEONI, 2003; JORGE *et al.*, 2011), mamão (DOTTO *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2011), morango (MAZARO *et al.*, 2008; ASSIS, 2009), alho (BOTREL *et al.*, 2007), uvas (CAMILI *et al.*, 2007), pêssegos dourado (SANTOS, 2008) e como filme protetor em caju (OLIVEIRA, 2011).

Em uva "Itália" Camili *et al.*, 2007 avaliaram a ação antifúngica de filmes de quitosana e demonstraram que as soluções de quitosana suprimiu o crescimento micelial e retardou a germinação do bolor *Botrytis cinérea*, considerado o agente de maior incidência na deterioração desta fruta durante seu transporte e armazenamento.

Botrel *et al.* (2007) ao utilizarem revestimentos comestíveis antimicrobianos a base de amido de mandioca, quitosana e glicerol em alho minimamente processado observou que o tratamento composto pelos constituintes combinados, sendo o único a conter quitosana a 0,5%, foi o que apresentou menores contagens de psicotróficos e bolores e leveduras durante 20 dias de armazenamento a 10°C.

A utilização da tecnologia de cobertura e filmes com propriedade antimicrobiana para alimentos vem despertando o interesse de pesquisadores e da indústria por ser uma tecnologia de conservação rentável e promissora.

Além destas vantagens apresentadas a utilização de quitosana surge como uma forma de gerenciamento dos problemas decorrentes da poluição ambiental gerada pelos resíduos da indústria pesqueira promovendo destino adequado para seus resíduos, de modo que as agressões ao meio ambiente sejam cada vez mais reduzidas.

Nesta expectativa, diante da constatação de que no processo de fabricação de queijo de coalho a contaminação pode ocorrer em qualquer nível de processamento e que para a maioria dos alimentos sólidos e semissólido o crescimento microbiano ocorre na superfície o uso de revestimento comestível de quitosana torna-se uma ótima opção de conservação do produto e contribui para melhorar a qualidade microbiológica, aumentar o tempo de vida de prateleira deste tipo produto e melhorar a sua imagem (BENTO *et al.*, 2009; PAGANI *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2013).

Pois, apesar de sua popularidade e importância para o mercado lácteo, principalmente na Região Nordeste, o queijo coalho ainda recebe uma conotação de alimento inseguro e sem qualidade (DUARTE *et al.*, 2005, ANDRADE, 2006; LIMA, 2010; ALMEIDA; JUNIOR FERNANDO; GUERRA, 20013).

CAPÍTULO 2

Artigo

Queijo de coalho com cobertura de quitosana: Perfil físico-químico e aceitação sensorial

Trabalho submetido para publicação ao periódico indexado **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (Online)**

QUEIJO DE COALHO COM COBERTURA DE QUITOSANA: PERFIL FÍSICO-QUÍMICO E ACEITAÇÃO SENSORIAL

Priscilla Gregorio de Oliveira*
Erilane de Castro Lima Machado**
Roberta Albuquerque Bento***

2.1 RESUMO: O emprego de coberturas comestíveis de ação antimicrobiana é uma tecnologia cada vez mais divulgada por preservar os alimentos. Por fazer parte do produto não deve promover alterações que o descaracterize quanto aos seus parâmetros físico-químicos e sensoriais. O presente estudo objetivou avaliar o perfil físico-químico e aceitação sensorial de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana. Para isso foram produzidos queijos de coalho com coberturas de quitosana nas concentrações de 15 mg/mL (T1), 10mg/mL (T2) e 5 mg/mL (T3). Como controle foram utilizadas amostras sem tratamento (C) e com cobertura de ácido acético 1% (CA). Os produtos foram avaliados quanto a umidade, atividade de água (Aa), cinzas, pH, acidez, lipídeos em extrato seco e proteínas e quanto aos padrões microbiológicos sanitários. Para as análises sensoriais empregou-se os testes de comparação pareada, aceitação e intenção de compra. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas demonstraram que as amostras atenderam aos requisitos estabelecidos pelas legislações vigentes. No teste de comparação pareada as amostras T1, T2 e T3 apresentaram um percentual de preferência de 51,7%, 45% e 46,7%, respectivamente, em relação a amostra controle C. A amostra com maior concentração de quitosana (T1) obteve o maior índice de aceitabilidade para os atributos sabor (76,66%) e textura (78,33%), e maior frequência de votos para os conceitos de “certamente compraria”. Concluiu-se que a aplicação de cobertura comestível de quitosana em queijo de coalho não influencia nos parâmetros de qualidade do produto.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobiano natural; conservação; características de qualidade; produto lácteo.

*Universidade Federal de Pernambuco –(UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: priscillagregorio.nutricionista@outlook.com).

**Professora Adjunta, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco –(UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: erilanevet@hotmail.com).

***Professora Adjunta, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco –(UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: robertabentonutricionista@hotmail.com).

2.2 INTRODUÇÃO

Dentre os produtos lácteos produzidos no Nordeste do Brasil o queijo de coalho é um dos mais tradicionais e de grande valor socioeconômico (LIMA 2010, MENEZES *et al.*, 2012). Sua representação cultural como um artefato simbólico da cultura nordestina somado as suas características sensoriais e nutricionais torna-o um produto de fácil aceitação comercial, e por consequência é amplamente consumido pela população regional, tendo sido observado um crescente consumo, nos últimos anos, nas demais regiões brasileiras (DANTAS 2012).

Apesar de sua notoriedade o queijo de coalho ainda possui uma imagem de alimento pouco seguro para a saúde do consumidor, pela baixa qualidade sanitária (ALMEIDA *et al.*, 2013). Com isso o desenvolvimento de métodos que proporcionem a conservação deste produto tornam-se essenciais com a finalidade de melhorar seu perfil higiênico-sanitário.

O emprego de filmes e coberturas comestíveis, utilizando substâncias antimicrobianas naturais, é uma tecnologia alternativa de conservação, que está sendo cada vez mais avaliada e divulgada como um procedimento viável para elevar o tempo de vida de prateleira dos alimentos, já sendo, inclusive, testada com sucesso em frutas e hortaliças (OLIVEIRA e OLIVEIRA, 2004; ASSIS e BRITO, 2014).

O uso de substâncias antimicrobianas naturais tem sido difundido desde os anos 80 por apresentarem uma ação sinérgica à dos conservantes químicos em produtos alimentícios e não representarem risco a saúde do consumidor, principalmente, em virtude da possibilidade de originarem compostos tóxicos de ação carcinogênica pelos conservantes químicos (MELO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2005).

A quitosana é um dos antimicrobianos naturais mais estudados, e vem sendo avaliado em queijos, uma vez que possuem um amplo espectro bactericida sob microrganismos patogênicos contaminantes deste produto (CHI *et al.*, 2006; FAI *et al.*, 2008; BENTO *et al.*, 2011). Seu uso como componente de coberturas e filmes antimicrobianos tem sido avaliados em vários tipos de queijos, demonstrando resultados promissores quanto a conservação microbiológica (Di PIERRO *et al.*, 2011; EL-DIASTY *et al.*, 2012; MEI *et al.*, 2013).

Atualmente o grande desafio da indústria alimentícia é atender as exigências do mercado consumidor, que estão cada vez mais rigorosos quanto a qualidade dos produtos alimentares adquiridos. E apresentam preferência de compra por produtos que sejam seguros microbiologicamente, tenha longa vida de prateleira e boas características sensoriais (NIELSEN e RIOS, 2000; MOREIRA *et al.*, 2005; VALERO e GINER, 2006).

Com isso, a avaliação das características de qualidade (físico-químicas e sensoriais) de produtos alimentares que empregam esse tipo de tecnologia de conservação microbiológica, torna-se essencial para que a utilização de revestimentos antimicrobianos naturais torne-se viável em alimentos.

Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil físico-químico e os parâmetros sensoriais de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana.

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

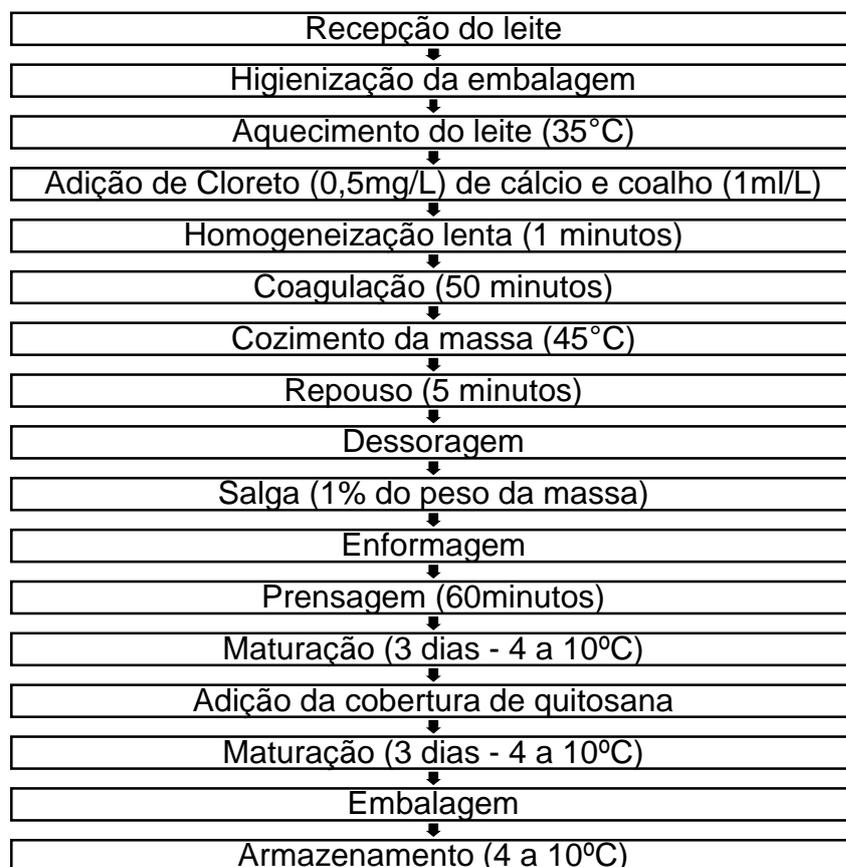
Elaboração do queijo de coalho com cobertura de quitosana

Os ensaios analíticos foram conduzidos nos laboratórios de Bromatologia e Técnica dietética da UFPE- CAV.

Inicialmente foi realizado o preparo do gel de quitosana a ser utilizado na formação da cobertura comestível aplicada ao queijo de coalho. Para isso o pó de quitosana (Sigma-Aldrich®, extraída da carapaça de crustáceo, de médio peso molecular e desacetilada entre 75 – 85%) foi diluído, totalmente, em ácido acético (1%) sob agitação magnética à temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente o pH ajustado para 5,8, usando NaOH ou HCl (Shigemasa e Minami, 1996).

Para o processamento do queijo de coalho foi utilizada a metodologia descrita por Nassu, Macedo e Lima (2006), com algumas modificações, sendo realizado conforme descrito no fluxograma da Figura 2.1. Foram utilizados leite bovino integral pasteurizado, padronizado com 3% de gordura (Betânia®), coagulante líquido HA-LA (Cristian Hansen®) e Cloreto de cálcio e cloreto de sódio (VETEC®) na elaboração dos produtos.

Figura 2.1 - Fluxograma do processo de produção do queijo de coalho. Adaptado de Nassu, Macedo e Lima, 2006.



Após a recepção do leite, as embalagens foram higienizadas, utilizando detergente neutro e álcool 70%, e o leite foi aquecido até atingir uma temperatura de 35°C, seguindo-se com as etapas posteriores (Figura 2.1).

A etapa de maturação foi adaptada, ocorrendo em dois momentos. A adição da cobertura de quitosana foi realizada, somente, ao terceiro dia de maturação, pois correspondia ao tempo em que a massa encontrava-se firme, sem que houvesse fragmentação ao realizar-se o corte. Para a adição do gel de quitosana na superfície dos produtos e formação da cobertura, os queijos de coalho foram cortados em cubos de aproximadamente 10g, com volume de 2cm³ e imersos individualmente nos géis de quitosana, preparados nas concentrações de 15 mg/ml (T1), 10 mg/ml (T2) e 5mg/ml (T3), por 3 minutos, com auxílio de uma pinça estéril, em seguida foram transferidos, assepticamente, para uma centrífuga de verduras (Plasutil®), onde retirou-se o excesso do gel com rotação manual, durante 30 segundos, seguindo posteriormente para a segunda etapa da maturação, por mais três dias. Após a etapa de maturação os produtos foram embalados em embalagem plástica de polietileno e armazenados sob refrigeração (10°C) para a realização das análises.

Para realização das análises físico-químicas e sensoriais foram utilizados como controles queijos de coalho sem adição de cobertura (C) e queijo de coalho com cobertura de ácido acético (1%) (CA).

Análises físico-químicas

Os produtos foram avaliados quanto aos parâmetros de: atividade de água (Aa), em temperatura de ± 25°C (±1°C) utilizando o equipamento AquaLAB, modelo CX-2 Water Activity System, seguindo as instruções do fabricante; Umidade (Adolfo Lutz 2008 - 012/IV); Resíduo mineral fixo (cinzas) (Adolfo Lutz 2008 - 018/IV); Proteínas (Adolfo Lutz 2008 - 036/IV), considerando o fator 6,38 para a conversão nitrogênio em proteína; Acidez (Adolfo Lutz 2008 - 463/IV); pH (Adolfo Lutz 2008 - 017/IV), utilizando medidor de pH Alpax, modelo PA 200; Determinação de gordura utilizando butirômetro para leite (Adolfo Lutz 2008 - 466/IV) e os resultados expressos como gordura em base seca (GBS %), calculada pela equação:

$$GBS = \frac{\% \text{ degordura} \times 100}{\text{Extrato seco total}}$$

Análises microbiológicas

Em cumprimento a legislação em vigor (Brasil, 2001a), as amostras foram avaliadas quanto a qualidade microbiológica, determinando-se a contagem de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus coagulase positiva/g*, presença de *Salmonella ssp./25g* e *Listeria monocytogenes/25g* utilizando a metodologia da Instrução Normativa nº 62 (Brasil, 2003) para análises microbiológicas para controle de alimentos.

Análise sensorial dos produtos

Foram realizados testes de comparação pareada (diferença e preferência) (Anexo I e Anexo II), teste de aceitação (com escala hedônica estruturada de 9 pontos, onde 9 representa “gostei extremamente” e 1 “desgostei extremamente”) (Anexo III) e teste de intenção de compra (com escala hedônica estruturada de 5 pontos, onde 5 representa “Certamente compraria” e 1 “Certamente não compraria”) (Anexo IV). Também foram avaliados o índice de aceitabilidade das notas atribuídas aos atributos sensoriais avaliados no teste de aceitação. O painel foi composto por 60 provadores, sendo painelistas não treinados, escolhidos conforme disponibilidade e critérios de inclusão (gostar de queijo de coalho). Foram excluídos do painel pessoas que possuíam intolerância a algum componente da fórmula, tivessem idade acima de 60 anos, tabagistas e pessoas com doenças que comprometam a funcionalidade do paladar e olfato. Antes de cada teste, os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo V) conforme o previsto no projeto de pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 34469914.5.0000.5208), seguindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Análise estatística e reprodutividade

Os dados experimentais obtidos das determinações analíticas, em triplicata, foram avaliados estatisticamente por testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e de estatística inferencial (teste t de Student e teste de Turkey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) entre os diferentes tratamentos aplicados, utilizando o programa STATSOFT (2004). Os índices de aceitabilidade foram calculados de acordo com Stone e Sidel (2004).

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises físico-químicas

Os resultados da composição físico-química dos queijos de coalho produzidos encontram-se descritos na Tabela 2.1. Na avaliação da composição centesimal, não se verificou diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de cinzas, proteínas, lipídeos e Aa entre as amostras com cobertura de quitosana e os controles, porém para os parâmetros de umidade, acidez e pH houve diferença ($p < 0,05$) entre as amostras. Os valores de umidade média das amostras T3 e CA inferiores aos demais ($p < 0,05$) podem ser consequência do aumento da concentração de íons de hidrogênio, menor valor de pH entre as amostras (Tabela 2.1), que contribui para uma menor umidade, uma vez que, segundo Souza e Saad (2009), quando esse fenômeno ocorre promove uma diminuição das forças repulsivas e as micelas de caseína começam a agregar-se, acentuando a liberação do soro.

Apesar das diferenças observadas, os valores de umidade variaram entre 50,07% e 50,86 % (Tabela 2.1), e as amostras apresentaram-se de acordo com o exigido pela legislação (Brasil 1996; Brasil 2001b), que classifica o queijo de coalho como um produto de média a alta umidade, devendo apresentar um conteúdo de umidade entre 46,0 e 54,9%.

Ainda, variações físico-químicas da matéria prima utilizada e resultantes do próprio processamento podem influenciar nos valores da composição físico-química dos produtos obtidos, de acordo Nassu *et al.*, (2001).

O teor médio de umidade encontrado para queijo de coalho na literatura é variável. Silva *et al.* (2010), observaram teores de umidade variando de 45,5 a 51,5%, podendo ser caracterizado como queijo de média (39% < umidade < 46%) a alta umidade (46% < umidade < 55%). Enquanto Silva *et al.* (2006) encontraram valores médios de 40,28%. Sousa *et al.* (2014) obtiveram variações de umidade entre 14,38 e 24,08% para os produtos com inspeção federal, e de 15 e 29,38% para os de fabricação artesanal, caracterizando, assim, queijo de umidade baixa (< 39%). A não conformidade no teor de umidade dessas amostras foi atribuída, pelos autores, possivelmente à falta de padronização na elaboração do queijo.

Tabela 2.1 –Resultados das análises físico-químicas de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana

Análises	C	T1	T2	T3	CA
Umidade	50,75±0,77a	50,86±0,58a	50,86±0,40a	50,16±0,24b	50,07±0,20b
Cinzas	3,01±0,17a	3,10±0,13a	3,00±0,10a	2,98±0,10a	3,03±0,13a
Proteínas	18,44±0,24a	18,47±0,17a	18,47±0,22a	18,56±0,18a	18,63±0,16a
Lipídeos	47,76±0,36a	46,54±0,17a	46,56±0,24a	47,77±0,20a	46,55±0,13a
Acidez	0,031±0,00b	0,031±0,00b	0,030±0,00c	0,030±0,00c	0,035±0,00a
pH	7,03±0,05a	6,98±0,006a	6,70±0,00b	6,76±0,12b	6,50±0,00c
Aa	0,98±0,00a	0,98±0,00a	0,98±0,00a	0,98±0,00a	0,98±0,00a

Médias seguidas de letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan. C: Controle; T1: cobertura (15 mg/ml Quitosana); T2: cobertura (10 mg/ml Quitosana); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana) e CA: Controle com ácido acético.

Quanto ao parâmetro de Aa verificou-se valores de 0,98 para todos os produtos sob os diferentes tratamentos e controles, sem diferenças significativas ($p>0,05$) entre eles. Dados semelhantes foram observados por Sousa *et al.* (2014) onde encontraram valores de Aa variando entre 0,911 a 0,963 para queijos de coalho com inspeção federal, e valores entre 0,892 e 0,96 para os queijos de coalho sem inspeção, comercializados em seis estados do nordeste brasileiro.

A legislação brasileira atual que regulamenta a identidade, qualidade e os padrões para queijos de coalho (Brasil 2001b) não institui valores de referência para os parâmetros de potencial hidrogeniônico (pH). Segundo Munk (2004) os queijos têm um pH elevado que varia entre 5,7 a 6,5 quando não se usa fermento. A literatura descreve resultados semelhantes para este parâmetro em queijos de coalho produzidos artesanal e industrialmente, variando entre 5 e 7,5 (MACHADO *et al.*, 2011, SOUSA *et al.*, 2014).

Os valores médios encontrados para pH apresentaram-se entre 6,50 e 7,03, sendo o maior valor atribuído a amostra controle C, sem cobertura, e o menor valor à amostra controle com ácido acético (CA). Entre as demais amostras sob tratamentos, verificou-se que T1, com cobertura de maior concentração de quitosana, foi a única

amostra que não diferiu significativamente ($p > 0,05$) de C,. Salienta-se que mesmo nas amostras com cobertura em menores concentrações de quitosana (Tabela 2.1), a faixa de pH encontra-se em valores aceitáveis para queijo de coalho verificados na literatura (MACHADO *et al.*, 2011, SOUSA *et al.*, 2014).

A acidez percentual expressa em ácido láctico variou de 0,03 a 0,035% de ácido láctico, Perez (2005), avaliando queijos de coalho industrializados obteve médias maiores para acidez, variando de 0,18 a 0,50%. Sousa *et al.* (2014) observaram variações de acidez em queijo de coalho entre 0,12 a 1,01%.

O teor de cinzas não diferiu entre as amostras, corroborando com os achados de Freitas *et al.* (2013) que constataram teores médios de 2,88% a 3,54% ao avaliarem os queijos de coalho produzidos na Paraíba e Silva *et al.* (2010) que encontraram valores entre 3,40% e 3,70%.

Quanto ao percentual de proteína, os produtos apresentaram valores médios similares e sem diferença significativa ($p > 0,05$), variando entre 18,44% e 18,63%. Freitas *et al.* (2013) também encontraram valores semelhantes ao deste estudo para proteínas em queijos de coalho, que variaram entre 18,98% e 22,64%. Freitas Filho *et al.* (2012) ao avaliar os parâmetros físico-químicos do queijo “Coalho” produzido artesanalmente na cidade de Calçado – PE observou valores de proteínas entre 19,35% e 25,88%. Para os níveis de lipídeos, as amostras não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si e apresentaram-se dentro do estabelecido pela legislação, a qual define como padrão valores de 45% a 60,0% de gordura em base seca.

Análises microbiológicas

As amostras T1, T2, T3, C e CA analisadas quanto aos parâmetros microbiológicos especificados para queijo de coalho apresentaram-se dentro dos limites exigidos pela legislação (Brasil 2001b). As contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras foram < 10 UFC/g enquanto para coliformes termotolerantes obteve-se contagens de $1,51 \times 10^1$ NMP/ml, $1,83 \times 10^1$ NMP/ml, $1,95 \times 10^1$ NMP/ml, $1,99 \times 10^1$ NMP/ml e $2,40 \times 10^1$ NMP/ml, respectivamente. Quanto a determinação de *Salmonella* ssp. e *Listeria monocytogenes* não foi detectado a presença destas bactérias em 25g do produto nas amostras avaliadas.

Sousa *et al.* (2014), quando avaliaram os parâmetros microbiológicos de queijos de coalho comercializados em alguns estados do nordeste do Brasil por estabelecimentos que possuíam e os que não possuíam o selo de inspeção federal (SIF) verificaram que 96,15% das amostras avaliadas estavam fora dos limites aceitos pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e 31% das amostras também não seguiam a padronização exigida para coliformes. Os autores atribuíram o nível de contaminação à qualidade da matéria prima ou às condições de processamento dos queijos.

Análise sensorial

Nos testes de comparação pareada entre os tratamentos T1 e C; T2 e C, e entre T3 e C, para detectar se havia diferença perceptível entre as amostras, foi verificado que dos 60 provadores, 57 sentiram diferença entre as amostras C e T1, 56 perceberam a diferença entre C e T2 e 54 painelistas entre C e T3. Assim, pelo teste monocaudal $60 < 57$, $60 < 56$ e $60 < 54$ foi comprovado que existe diferença sensorial

entre as duas amostras ao nível de 0,5% de significância, segundo a tabela de número mínimo de resposta corretas (FARIA e YOTSUYANAGI, 2002). No teste de aceitação, verificou-se que as amostras não diferiram significativamente ($p>0,05$) nos atributos de qualidade (aparência, cor, odor, sabor e textura) avaliados (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Resultados das notas atribuídas no teste de aceitação para queijos de coalho com e sem adição da cobertura comestível de quitosana

Produtos	Aparência	Cor	Odor	Sabor	Textura
C	6,51±2,09a	6,63±2,00a	5,63±2,31a	6,86±2,16a	7,00±1,97a
T1	6,33±2,40a	6,59±2,12 ^a	5,86±2,25a	6,88±2,33a	7,06±1,94a
T2	6,12±2,07a	6,37±2,06 ^a	5,86±2,46a	6,51±2,25a	6,86±2,20a
T3	6,08±2,07a	6,35±2,06 ^a	5,82±2,46a	6,53±2,25a	6,89±2,20a

Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan. C: Controle; T1: cobertura (15 mg/ml Quitosana); T2: cobertura (10 mg/ml Quitosana); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana).

No quesito aparência, as médias obtidas para este atributo compreenderam a nota 6 ± 2 , que reflete nos termos hedônicos entre “desgostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”, onde a amostra C obteve a maior média sobre as demais, assim como o índice de aceitabilidade (Tabela 2.3) neste parâmetro, no entanto sem diferença significativa ($p>0,05$) em relação aos produtos sob tratamento. Segundo Dutcosky (1996), índices acima de 70% de aceitação indicam que o produto possui potencial mercadológico.

Tabela 2.3 - Aceitabilidade dos queijos de coalho com e sem adição da cobertura comestível de quitosana, em diferentes concentrações, por atributo avaliado

Produtos	Aparência	Cor	Odor	Sabor	Textura
C	73,33%	73,66%	62,44%	76,22%	77,77%
T1	70,33%	73,22%	65,11%	76,66%	78,33%
T2	68,00%	70,77%	65,11%	72,22%	76,66%
T3	67,55%	71,66%	64,66%	72,55%	76,55%

C: Controle; T1: cobertura (15 mg/ml Quitosana); T2: cobertura (10 mg/ml Quitosana); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana).

Pereira (2013) comenta que a aparência é um atributo que reflete diretamente nas características globais, sendo muitas vezes responsável pela aceitação, rejeição, ou preferência de um produto. Em seu estudo, ao avaliar sensorialmente o emprego do gel de quitosana sob a superfície de queijo minas frescal, observou resultados semelhantes, onde a amostra C apresentou maior nota para aparência sobre os tratamentos que empregava quitosana com 5mg/ml e 20mg/ml.

A cor, também, é um atributo muito importante na aceitabilidade do produto bem como para a sua caracterização. Assim como no atributo aparência, no quesito coloração, a amostra C obteve maior nota (Tabela 2.2), bem como maior índice de aceitabilidade, seguido da amostra T1, T3 e T2 (Tabela 2.3). Foi observado que a adição das coberturas de quitosana promoveram uma coloração levemente amarelada as amostras, porém salienta-se que, embora em termos absolutos, a amostra C tenha apresentado maiores médias, os resultados não variaram

estatisticamente. Yu Zhong *et al.* (2014) e Mei *et al.* (2013) também observaram que a dição da quitosana em revestimentos aplicados à queijos proporcionaram uma coloração amarelada aos produtos.

El-Diasty *et al.* (2012) em seu estudo utilizando quitosana nas concentrações de 5mg/ml e 10mg/ml no controle fúngico de queijo Kariesh, relataram que os membros do painel sensorial não detectaram diferença entre os queijos tratados e não tratados com respeito a cor.

Em frutas, por retardar o escurecimento enzimático, a aplicação da cobertura de quitosana apresenta resultados desejáveis à melhoria da coloração, conforme observado em mangas 'Tommy Atkins' (Souza *et al.* 2011) e goiabas 'Kumagai' (Cerqueira, 2007). Quanto a textura e sabor o T1 obteve maiores notas (Tabela 2.2) dentre as amostras avaliadas. Em queijo mussarela, Altieri *et al.* (2005) observaram que a quitosana não comprometeu a funcionalidade tecnológica nem promoveu modificações na textura do produto. Pereira (2013) verificou que a textura não sofreu influência do antimicrobiano pois as amostras não apresentaram diferença significativa. Porém em relação ao sabor, este mesmo autor relata que a amostra com cobertura de maior concentração (20mg/ml) obteve menor desempenho sobre as demais, e atribui esse fato à hipótese de que a adição de quitosana mais concentrada promove um sabor residual mais perceptível.

Neste estudo o odor foi a característica que obteve as menores notas dadas pelos painelistas (Tabela 2.2), sem diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$). As amostras obtiveram média entre 5,63 e 5,86 para este atributo, o que corresponde aos termos hedônicos entre "Não gostei/nem desgostei" e "Gostei ligeiramente", e um índice de aceitabilidade entre 62,44% e 64,11%.

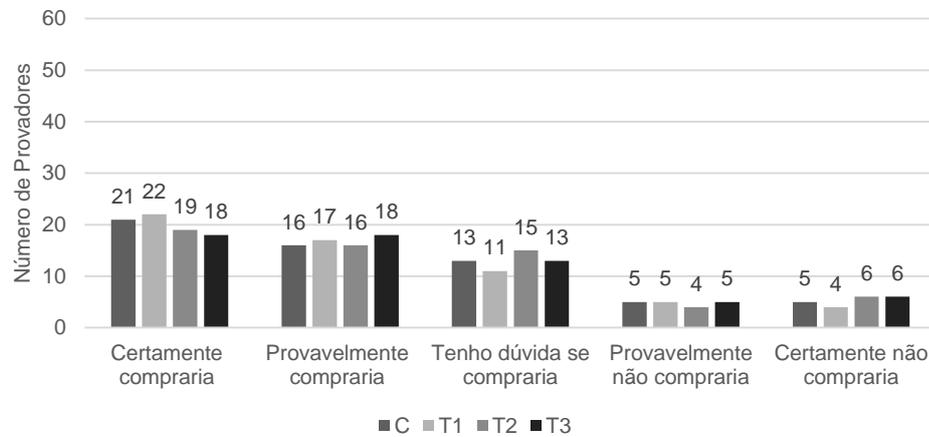
Acredita-se que a proximidade entre as amostras no momento da avaliação sensorial pode ter influenciado neste parâmetro, de forma que o odor dos produtos com a cobertura de quitosana, que segundo Brangel (2011) é uma substância que apresenta odor bem característico, tenham influenciado no odor das amostras controle.

Em contrapartida El-Diasty *et al.* (2012) não observaram diferença significativas entre as amostras de queijos com e sem tratamento com relação aos atributos de consistência, sabor e odor. Di Pierro *et al.* (2011) quando avaliaram a extensão da vida útil de queijo Ricotta utilizando filme contendo quitosana, observaram que o revestimento, melhorou manutenção da textura e não interferiram nas características sensoriais.

Nos testes de comparação pareada para preferência a amostra T1 obteve melhor resultado dentre os tratamentos por ser preferida por pouco mais da metade do painel provador (51,7%), enquanto que T2 foi preferida por 45% e T3 por 46,7%. Estes resultados podem ter sido influenciados pelos atributos de qualidade (Tabela 2.2) que também refletiu no índice de aceitabilidade (Tabela 2.3), principalmente na aparência, em que as amostras T2 e T3 apresentaram valores inferiores ao limite mínimo de aceitabilidade.

A preferência pela amostra T1 pôde ser confirmada no teste de intenção de compra, onde se destacou apresentando maiores frequências de notas em relação ao conceito "Certamente compraria", conforme ilustrado na Figura 2.2. Vale salientar que os conceitos "Certamente compraria, Provavelmente compraria e Tenho dúvida se compraria", foram mais repetidos pelos painelistas para as amostras avaliadas.

Figura 2.2 - Teste de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações



T1: queijo de coalho + cobertura (15mg/ml); T2: queijo de coalho + cobertura (10mg/ml); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana) e C: controle T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana).

2.5 CONCLUSÕES

A adição da cobertura de quitosana, independente da concentração utilizada, não alterou os requisitos físico-químicos estabelecidos pela legislação para queijo de coalho. Quanto as características sensoriais do produto a utilização do antimicrobiano, mesmo na concentração mais elevada, demonstrou não ser um fator contraproducente, uma vez que os produtos, com e sem quitosana, obtiveram resultados semelhantes. A adição da cobertura comestível de quitosana, ainda proporcionou contagens microbianas inferiores ao padrão sem cobertura, demonstrando ser uma método de conservação microbiológica viável para este produto. Portanto a aplicação de cobertura comestível de quitosana em queijo de coalho, possui um potencial promissor, por não proporcionar alterações nos aspectos de qualidade e agregar valor ao produto pela utilização de um composto antimicrobiano natural, atóxico e biodegradável.

COALHO-TYPE CHEESE WITH CHITOSAN EDIBLE COATING: PHYSICAL-CHEMICAL AND SENSORY PROFILES

2.6 ABSTRACT: Antimicrobial edible coatings have been used increasingly widespread for food preservation and as part of the product their physical-chemical and sensory parameters can not changed. The aim of this study was to evaluate the physical-chemical and sensory profiles in coalho-type cheese added to the chitosan edible coating. For this purpose were produced coalho-type cheese coated with chitosan at concentrations of 15 mg.mL⁻¹ (T1), 10 mg.mL⁻¹ (T2) e 5 mg.mL⁻¹ (T3). Untreated samples of cheese were used as a control (C) and coated samples, only, with acetic acid 1% (CA). Products were assessed for moisture, water activity (Aw), ashes, pH, acidity, proteins and fat in drymatter. Sensory analysis was performed by

paired comparison test, acceptance and intention to purchase, as well as, sanitary-microbiological criteria. The results obtained from physical-chemical and microbiological analysis showed that all samples met the requirements established by the Brazilian legislation. Samples T1, T2 e T3 proved a acceptance rates, 51.7%, 45% e 46.7%, respectively for paired comparison test. The sample with the highest concentration of chitosan (T1) was better accepted for taste (76.66%) and texture (78.33%) attributes and superior score to a "I would certainly buy" on purchase intention scale. In summary that chitosan as edible coating on coalho-type cheese cannot affect quality parameters of the product.

KEYWORDS: Natural Antimicrobial, conservation, quality parameters, dairy product.

2.7 REFERÊNCIAS

- 1- ALMEIDA, G. *et al.* *Foci of contamination of Listeria monocytogenes in different cheese processing plants.* **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 3, p. 303-309, 2013.
- 2- ALTIERI, C. *et al.* Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. *Journal of Dairy Science*, v. 88, n. 8, p. 2683-2688. 2005.
- 3- ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. *Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações.* **Brazilian Journal Food Technology Campinas**, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.
- 4- ASSIS, O.B.G.; BRITO, D.; FORATO, L.A. *O uso de biopolímeros como revestimentos comestíveis protetores para conservação de frutas in natura e minimamente processadas.* *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.* São Carlos, **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, 23 p. 2009.
- 5- BENTO, R. A. *et al.* *Sensory evaluation and inhibition of Listeria monocytogenes in bovine pâté added of chitosan from Mucorrouxii.* **Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 588-591, mar. 2011.
- 6- BRANGEL, L. M. **Desenvolvimento de hidrogéis a base de quitosana e ácido lactobiônico com adição de nanoelementos.** 2011. f 46. Monografia (Química industrial). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2011.
- 7- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1996.
- 8- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União. Brasília, 2 de janeiro de 2001a.

- 9- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Diário oficial da União. Brasília, 16 de julho de 2001a.
- 10- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União. Brasília, 18 de setembro de 2003.
- 11- CERQUEIRA, T. S. **Recobrimentos comestíveis em goiabas c.v. 'Kumagai'**, 2007. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.
- 12- CHI, S.; ZIVANOVIC, S; PENFIELD, M. P. Application of chitosan films with oregano essential oil on bologna- active compounds and sensory attributes. **Food Science and Technology International**, v. 12, n.2, p. 111-117, abr. 2006.
- 13- DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande, 2012.
- 14- DI PIERRO, P. et al. *Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life*. **Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.
- 15- DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 123p.
- 16- PIERRO, P. et al. *Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.
- 17- EL-DIASTY, E. M. et al. *Using of Chitosan as Antifungal Agent in Kariesh Cheese*. **New York Science Journal**, v. 5, p. 5-10, 2012.
- 18- FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.435-451, abr. 2008.
- 19- FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. *Técnicas de análise sensorial*. Campinas: ITAL/LAFISE, 2002. 116 p.
- 20- FREITAS FILHO, J. R. et al. *Avaliação dos parâmetros físico químicos do queijo coalho artesanal produzido em calçado-PE*. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, 2012.
- 21- FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; FERREIRA, J. *Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado*

da paraíba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

22- GUINEE, T. P. *et al.* *The compositional and functional properties of commercial Mozzarella, Cheddar and analogue pizza cheeses.* **International Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 2, p. 51-56, 2000.

23- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 2008. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4.ed. São Paulo: Instituto **Adolfo Lutz**, 1020p.

24- LIMA, C. P. **Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de queijos de coalho -no Ceará.** 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

25- MACHADO, G. M. **Viabilidade tecnológica do uso de ácido láctico na elaboração de queijo de coalho.** 2010. 81 f. Dissertação (mestrado em Tecnologia de leite e derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora. 2010.

26- MACHADO, G. M. *et al.* *Aspectos físico-químicos de queijo de coalho fabricado com o uso de ácido láctico.* **Alimentos e Nutrição**. Araraquara, v. 22, n. 3, p. 421-428, jul./set. 2011.

27- MEI, Jun *et al.* Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **International journal of biological macromolecules**, v. 57, p. 17-21, 2013.

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

29- MENESES, R. B. *et al.* *O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: trabalho infantil e segurança de alimentos.* **Revista de Nutrição**. Campinas, v. 25, n. 3, jun. 2012.

30- MENEZES, S. S. M.; SILVA, J. N. G.; SAMUEL, S. **QUEIJO DE COALHO CASEIRO: a tradição como ativo territorial no município de Porto da Folha.** **Ateliê Geográfico**, v. 6, n. 3, p. 52-71, 2012.

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

32- MUNCK, A.V. Queijo de coalho: princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.13-15,jul./ago. 2004.

- 33- NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. *Queijo de Coalho*. Coleção Agroindústria Familiar. **EMBRAPA**, Informação Tecnológica. Brasília, DF, v.1, p.40, 2006.
- 34- NASSU, R.T.; *et al.* *Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará*. *Higiene alimentar*, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, 2001.
- 35- PACHECO, M. S. ***Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: Caracterização da Qualidade e do Sistema de Produção***. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2011.
- 36- PEREIRA, R. B. M. ***Bioatividade de quitosana na inibição de cepas patogênicas em queijo tipo Minas frescal***. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2013.
- 37- ROIG, S. *et al.* ***Ciências e Tecnologia dos Alimentos***. v. 23, p.177-82. 2003.
- 38- SENA, M. J. ***Perfil epidemiológico, resistência à antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus ssp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE***. 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.
- 39- SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. *Applications of chitin and chitosan for biomaterials*. ***Biotechnology and Genetic Engineering Reviews***, v. 13, n. 1, p. 383-420, 1996.
- 40- SOUSA, A. Z. B. *et al.* ***Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil***. ***Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo***, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.
- 41- SOUZA, C. H. B.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La-5 added solely or in co-culture with a yoghurt starter culture and implications on physical-chemical and related properties of Minas fresh cheese during storage. *LWT*. V. 42:633–40. 2009.
- 42- SOUZA, M. L. *et al.* ***Pós-colheita de mangas ‘tommy atkins’ recobertas com quitosana***. ***Revista Brasileira de Fruticultura***, Jaboticabal, v. e., p. 337-343, 2011.
- 43- STATSOFT, Inc, ***Statistica for Windows 7.0***- Computer program manual, Tulsa-UK: StatSoft, 2004.
- 44- STONE, H.; SIDEL, J. L. ***Sensory evaluation practices***. 3ª ed. New York: Academic Press. 2004. 408 p.

45- OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. V. L. Revisão: Principais Agentes Antimicrobianos Utilizados em Embalagens Plásticas. **Brazilian Journal Foods Technology**. v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

46- ZHONG, Y.; CAVENDER, G.; ZHAO, Y. Investigação de diferentes métodos de aplicação de revestimento sobre o desempenho de revestimentos comestíveis sobre Mozzarella queijo. **Food Science and Technology**, v. 56, n. 1, p. 1-8, 2014.

CAPÍTULO 3

Artigo

Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*

Trabalho submetido para publicação ao periódico indexado **Pesquisa Agropecuária Tropical (PAT)**

BIOATIVIDADE DE QUITOSANA COMO COBERTURA COMESTÍVEL EM QUEIJO DE COALHO NA INIBIÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

Priscilla Gregorio de Oliveira¹, Erilane de Castro Lima Machado², Roberta Albuquerque

Bento³

3.1 RESUMO: A falta de cuidados quanto à qualidade da matéria prima utilizada e as condições de processamento tornam o queijo de coalho um alimento pouco seguro do ponto de vista sanitário. Objetivou-se com este trabalho estudar a bioatividade da cobertura comestível de quitosana em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes*. Para isso, a partir de três tratamentos (T1, T2, T3), correspondendo ao queijo de coalho adicionado de cobertura de quitosana com diferentes concentrações (15 mg/mL, 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectivamente), avaliou-se a cinética de inibição bacteriana através da contagem de células viáveis de *L. monocytogenes*, nos tempos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 dias de armazenamentos. Onde o intervalo 0 dia corresponde ao momento de aplicação da cobertura e inoculação do microrganismo, na superfície dos produtos com a cobertura. O queijo de coalho sob o tratamento que apresentou melhor resposta antimicrobiana foi avaliado quanto as suas características físico-químicas e intenção de compra. Observou-se que o tratamento T1 proporcionou uma menor contagem de células viáveis, durante todos os intervalos avaliados, em comparação aos demais tratamentos e controles, sendo portanto, considerado o tratamento mais eficaz. Os parâmetros físico-químicos avaliados apresentaram-se dentro do recomendado pela legislação em vigência. A amostra T1 obteve resultados satisfatórios por obter maior média para o termo hedônico de “certamente compraria” e “provavelmente compraria”. Conclui-se que o emprego de cobertura comestível de quitosana apresenta eficiência quanto à conservação microbiológica, não interferi nas características físico-químicas e sensorial, por gerar satisfação quanto a intenção de compra.

PALAVRAS CHAVES: Produto lácteo; contaminação bacteriana; antimicrobiano natural.

BIOACTIVITY OF CHITOSAN AS EDIBLE COATING IN COALHO-TYPE CHEESE IN INHIBITION OF *Listeria monocytogenes*

3.2 ABSTRACT: The absence of care on quality of raw materials used and processing conditions have made coalho-type cheese an unsafe food to the consumption. This study aimed to assess the bioactivity of chitosan as edible coating in coalho-type cheese in inhibition of *Listeria monocytogenes*. For this purpose were performed three treatments (T1, T2, T3) corresponding to the different chitosan concentrations of 15 mg/mL, 10 mg/mL e 5 mg/mL, respectively, and kinetics of inhibition by viable cell counts of *L. monocytogenes* was evaluated at 0, 1, 2, 4, 8, 12 and 16 days of storage. Time zero when applying bioactive coatings and microorganism inoculated on surface of the product coated. The cheese showed the best antimicrobial response was evaluated in relation to the physical-chemical characteristics and intention to purchase. Treatment T1, considered the most effective treatment, produced lower viable cell counts, during all intervals assessed, when compared to the control samples and other treatments. The results obtained from physical-chemical analysis showed that all samples met the requirements established by the Brazilian legislation. Sample T1 showed superior scores to the “I would certainly buy” and “I would probably buy”. In summary the use of chitosan edible coating for food preservation is efficient, can increase the purchase intent and does not interfere on the physical-chemical and sensory characteristics.

KEYWORDS: Dairy product, bacterial contamination, natural Antimicrobial.

3.3 INTRODUÇÃO

A insegurança sanitária pela contaminação microbianos nos alimentos é uma grande preocupação para a indústria alimentícia devido as perdas econômicas e pelo risco de causar Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) à população (Ruwer et al. 2011). Nas últimas décadas, dentre os microrganismo patogênicos veiculados através dos alimentos, que têm

ocasionado ampla preocupação, pode-se destacar a *Listeria monocytogenes* (Silva et al. 2011), devido, principalmente, às graves consequências à saúde humana que a presença deste microrganismo acarreta (Guahyba Bisneto, 2012).

Segundo Hofer et al. (2006) é provável que a maior parte dos casos de listeriose humana, doença causada por *Listeria monocytogenes*, tenha o alimento como veículo de transmissão, e vários tipos de produtos alimentícios, tanto de origem vegetal como animal, têm sido associados como vetor de transmissão desta bactéria.

Dentre os produtos lácteos os queijos são os mais comumente contaminados (Borges et al. 2009). A facilidade de contaminação dos produtos lácteos, se dá pela baixa qualidade da matéria-prima, falta de Boas práticas de fabricação nas etapas anterior e posterior ao processamento e pela natureza ubíqua do patógeno, que torna a transferência e permanência de cepas desta bactéria dentro das unidades processadoras de alimentos uma ação simples, facilitando assim, contaminações recorrentes no produto final (Kabuki 2004, Pacheco 2011).

Outra preocupação associada a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* é pela sua condição Psicrotrófica, sendo capaz de multiplicar-se sob refrigeração. O uso da cadeia de frio na estocagem de alimentos, representam nichos que favorece o seu crescimento e torna um desafio o seu controle na cadeia de produção de alimentos (Kozak et al. 1996).

Assim, o desenvolvimento de métodos de controle microbiano para queijos torna-se essenciais, afim de promover a qualidade sanitária destes produtos.

A quitosana é um dos antimicrobianos naturais que vêm sendo estudados em queijo de alta umidade, uma vez que possuem um amplo espectro bactericida frente a microrganismos patogênicos contaminantes do queijo (Fai et al. 2008, Bento et al. 2011).

Nesta perspectiva, o uso de cobertura comestível de quitosana torna-se uma alternativa promissora de conservação para o produto final e contribui para melhorar a qualidade microbiológica e aumentar o tempo de vida de prateleira, agregando, desta forma, mais valor

ao produto por deixá-lo mais natural e seguro, melhorando sua imagem (Pagani et al. 2012, Nunes et al. 2013). Portanto o objetivo deste trabalho foi avaliar a bioatividade da cobertura comestível de quitosana aplicada ao queijo de coalho na inibição de *L. monocytogenes*.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram conduzidos nos laboratórios de Bromatologia, Técnica dietética e Microbiologia dos Alimentos da UFPE- CAV.

Preparo da quitosana

A quitosana empregada nesse estudo foi obtida da empresa Sigma-Aldrich (Alto de Pinheiros, São Paulo, SP, Brasil), sendo, descrita como, de médio peso molecular, desacetilada entre 75 – 85%, procedente da purificação de quitina extraída da carapaça de crustáceo. O preparo do gel de quitosana foi realizado por dissolução em ácido acético a 1%, mantido sob agitação moderada em agitador magnético, durante 24h, em temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ($\pm 1^{\circ}\text{C}$), até a total dissolução do pó e obtenção do gel homogêneo, sendo posteriormente realizada a calibração do pH para 5,8, utilizando NaOH e HCl, conforme descrito por Shigemasa e Minami (1996). Foram preparadas coberturas com diferentes concentrações de quitosana, de 15mg/ml, 10mg/ml e 5mg/ml, denominadas de T1, T2 e T3 respectivamente.

Preparo do queijo de coalho com cobertura de quitosana

Para a produção de queijo de coalho foram utilizados leite bovino integral pasteurizado (Betânia[®]), padronizado com 3% de gordura, adquiridos de representantes comerciais locais, Cloreto de cálcio (VETEC[®]), coagulante líquido HA-LA (Christian hansen[®]) e cloreto de sódio (VETEC[®]).

A metodologia de elaboração do queijo de coalho foi adaptada de Nassu, Macedo e Lima (2006). Após a higienização (com solução clorada a 200ppm) dos utensílios de apoio, bancadas e embalagem do leite, o leite foi aquecido até atingir uma temperatura de 32°C.

Posteriormente foram adicionados lentamente, cloreto de cálcio (0,5ml/L) e o coagulante líquido (1ml/L) previamente diluído em água esterilizada, sendo homogeneizados durante um minuto e permanecendo em repouso por mais 50 minutos. Após o repouso, foi realizado o corte da coalhada (cubos com 1cm² de aresta), seguido de agitação lenta, durante cinco minutos, e aquecimento da massa (45°C). Em seguida a este procedimento foi realizado o segundo descanso (5 minutos) seguido da dessoragem, salga da massa (1% em relação ao peso da massa), enformagem e prensagem durante 60 minutos, sendo realizada uma viragem do queijo ao completar-se 30 minutos de prensagem.

Para desenvolver aroma e sabor, o queijo de coalho foi maturado em câmara refrigerada, à temperatura de 10°C, durante três dias, correspondendo ao tempo em que a massa não apresentava fragmentação ao realizar-se o corte. Após este período, foi realizado a etapa de adição da cobertura, através da imersão do queijo de coalho em gel de quitosana. O queijo foi cortado em cubos de aproximadamente 10g, com volume de 2cm³ e imersos individualmente nos géis de quitosana, por 3 minutos. Com auxílio de uma pinça estéril foram transferidos, assepticamente para uma centrífuga de verduras (Plasutil®), onde retirou-se o excesso do gel com rotação manual, durante 30 segundos. As amostras retornaram para a câmara refrigerada (8°C), onde permaneceram por mais três dias para que se completasse o tempo de maturação.

*Ação antimicrobiana da quitosana sob a viabilidade de *L. monocytogenes* em queijo de coalho*

O inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 3533 utilizado nos ensaios de atividade antimicrobiana foi obtido de culturas semeadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 18-24 horas, suspendendo as células bacterianas, com o auxílio de uma alça de platina estéril, em solução salina estéril para a padronização da densidade em espectrofotômetro sob um comprimento de onda de 625nm, obtendo-se um inóculo bacteriano de aproximadamente de 1×10^8 UFC.ml⁻¹ (CLSI, 2003).

A cinética de inibição bacteriana da cobertura de quitosana em amostras de queijo de coalho sob a viabilidade celular de *L. monocytogenes* foi acompanhada através da contagem de células viáveis (curva de sobrevivência bacteriana) frente às diferentes coberturas de quitosana produzidas (T1, T2 e T3). Amostras com cobertura de ácido acético 1% (CA) e amostras sem adição de cobertura (C) foram utilizadas como controles. No tempo 0, momento de incorporação das coberturas ao produto, foi adicionado 1ml do inóculo bacteriano na superfície das amostras, com o auxílio de um pipetador automático. Após este procedimento, as amostras foram mantidas sob refrigeração (10°C) e a contagem de *L. monocytogenes* foi realizada nos intervalos de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16 dias de armazenamento. Para isso, 10g das amostras (CA, C, T1, T2 e T3) foram assepticamente transferidas, com o auxílio de uma pinça estéril, para sacos estéreis de stomacher, adicionados de 90ml de solução salina, e macerados, com o auxílio de um pistilo, e em seguida, foram homogeneizados em stomacher durante 5 minutos em velocidade de 3.5 rpm. O produto foi diluído seriadamente (1:9 v/v) em água peptonada 0,1% (10^{-1} – 10^{-6}) estéril alíquotas de 100µL das diluições foram semeadas em placa de Petri contendo Listeria Selective Agar base + Listeria Selective Supplement II (Acriflavinhydrochloride (Trypaflavin) 15mg, Nalidixicacid 40mg, Cycloheximide 50mg), uniformemente distribuída com alças Drigalski e incubadas a 35°C por 48h. Após a contagem do número de células viáveis, os resultados foram expressos em Log de UFC/ml (SAGDIÇ, 2003). O percentual de redução de UFC/ml ao longo dos tempos analisados foi determinado com base no inóculo microbiano inicial e comparado ao grupo controle.

Análises físico-químicas e Sensorial

O produto com tratamento mais eficiente frente a inibição de *L. monocytogenes*, juntamente com a amostra C, foi avaliado quanto aos parâmetros físico-químicos para queijo de coalho exigido pela legislação em vigor, determinando-se o teor de Umidade (012/IV) e Lipídeos (466/IV) nas amostras, além do pH (017/IV) e atividade de água. As análises foram

executadas conforme descrito por Adolf Lutz (2008) e os resultados de lipídeos foram expresso como gordura em base seca (GBS %), através da equação:

$$GBS = \frac{\% \text{ de gordura} \times 100}{EST}$$

Na análise sensorial foi aplicado teste de intenção de compra (Anexo IV). Os painelistas foram escolhidos conforme disponibilidade e critérios de inclusão (gostar de queijo de coalho) e de exclusão (Pessoas que apresentassem intolerância a algum componente da fórmula, idade superior a 60 anos, tabagistas, pessoas com doenças que comprometessem a funcionalidade do paladar e olfato), sendo formado um painel de 60 provadores. Os testes sensoriais foram realizados após a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (CAAE 34469914.5.0000.5208), seguindo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, e após ciência e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo V). As análises físico-químicas foram realizadas no dia 0, referente ao momento de incorporação das coberturas, enquanto a análise sensorial foi realizada após completar-se os 6 dias de maturação.

Análise estatística e reprodutividade

Os dados das análises executadas em triplicata foram submetidas a análise estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste t de Student e teste de Turkey) para determinação de diferenças estatisticamente significantes ($p < 0.05$) entre os diferentes tratamentos aplicados através do programa STATSOFT (2004).

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*Viabilidade de *Listeria monocytogenes* frente a cobertura comestível de quitosana aplicada ao queijo de coalho*

Os resultados observados através da análise da curva de sobrevivência de *L. monocytogenes*, ao longo de 16 dias de armazenamento (Tabela 3.1), demonstraram efeito significativo e inversamente proporcional dos diferentes tratamentos (T1, T2 e T3) utilizados, ou seja, havendo aumento da concentração de quitosana verificou-se maior diminuição do crescimento microbiano, nos períodos avaliados.

Tabela 3.1 – Contagem (Log UFC.ml⁻¹) de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações

DIAS	C	T1	T2	T3	CA
0	6,06±0,01Ac	3,56±0,07Dd	3,54±0,04Dg	5,23±0,03Ce	5,91±0,02Bc
1	6,21±0,01Ab	3,75±0,08Dc	4,45±0,04Ce	5,61±0,03Bd	6,24±0,04Aa
2	6,26±0,05Aa	3,42±0,04De	4,63±0,03Cd	5,90±0,01Ba	6,26±0,01Aa
4	5,20±0,03Bf	3,79±0,02Ec	4,29±0,01Df	5,01±0,02Cf	5,35±0,02Af
8	5,46±0,02Be	4,37±0,04Da	4,74±0,02Cc	5,81±0,03Ab	5,44±0,03Be
12	5,76±0,01Ad	4,38±0,04Da	4,88±0,02Cb	5,70±0,01Bc	5,72±0,02Bd
16	5,05±0,03Dg	4,24±0,04Eb	5,14±0,03Ca	5,25±0,01Be	6,05±0,03Ab

^{abc}Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan. ^{ABC}Médias seguidas de letras iguais na horizontal não diferem significativamente ($p>0,05$) pelo teste de Duncan. C: Controle; T1: cobertura (15 mg/ml Quitosana); T2: cobertura (10 mg/ml Quitosana); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana) e AA: Controle com ácido acético.

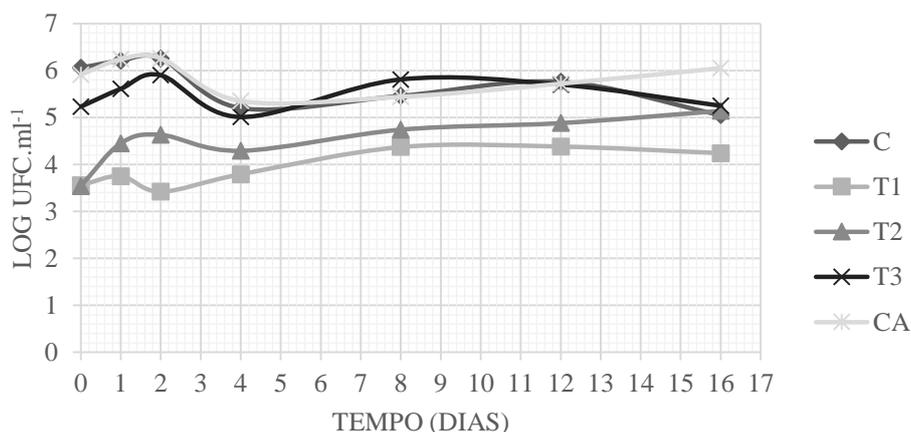
A curva de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* está melhor ilustrada na Figura 3.1, onde se observa que os tratamentos T1 (15 mg/ml Quitosana) e T2 (10 mg/ml Quitosana) proporcionaram os melhores resultados e que estes foram bastante próximos, exibindo reduções logarítmicas da carga microbiana variando de 2,84 a 0,81 e 2,52 a 0,88, respectivamente, em relação ao grupo controle C. Atribuiu-se o efeito antimicrobiano à quitosana uma vez que não se verificou efeito relacionado ao ácido acético, o qual proporcionou um curva de crescimento bacteriano semelhante ao grupo controle C, sem adição de cobertura.

O período de maior redução da carga microbiana apresentada pelos tratamentos T2 e T1 corresponderam aos intervalos de 0 e 2 dias de armazenamento. A amostra T2 só apresentou eficiência na inibição do crescimento microbiano até o 12º dia de armazenamento, onde após

esse período já é possível observar (Tabela 3.1 e Figura 3.1) que esta amostra apresenta carga microbiana superior a amostra C.

O tratamento T3, não apresentou resultados satisfatório, pois a partir do 8º dia já foi possível observar que o tratamento não apresenta nenhum efeito inibitório sobre o crescimento de *L. monocytogenes*, resultando em um produto com carga microbiana mais elevada que a amostra CA e C, neste intervalo, e contagens mais elevadas que as amostras T1 e T2 nos intervalos subsequentes.

Figura 3.1 - Curva de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho adicionado quitosana em diferentes concentrações.



C: Controle; T1: cobertura (15 mg/ml Quitosana); T2: cobertura (10 mg/ml Quitosana); T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana) e AA: Controle com ácido acético.

Botrel et al. (2007) constataram resultados semelhantes a estes, quando averiguaram que para o controle de bactérias psicotrópicas, bolores e leveduras em alho minimamente processado, é necessário o uso de revestimentos com concentrações de quitosana acima de 5mg/ml, pois revestimentos com essa concentração apresentaram resultados semelhantes aos revestimentos utilizando somente o ácido acético.

Pereira (2013), quando avaliou o comportamento de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal com cobertura de quitosana, extraída da carapaça de crustáceo, obteve melhor

resposta para o revestimento com concentração de 20mg/ml frente ao de 5mg/ml, constatando que, embora houvesse um crescimento contínuo da quantidade do microrganismos em todas as amostras, a amostra tratada com a cobertura de 20mg/ml de quitosana conseguiu manter menores contagens ($p < 0.05$) até o 10º dia de armazenamento, chegando a exibir reduções de 3,05 ciclos logarítmicos enquanto que o tratamento com 5mg/ml diminuiu em 1,79 ciclos logarítmicos, em comparação a amostra controle.

Di Pierro et al. (2011) quando aplicaram um filme de quitosana (8mg/ml) em ricota, sob atmosfera modificada, à 4°C, observaram-se que os números viáveis de microrganismos mesófilos e psicotróficos ultrapassou o limite de aceitabilidade para carga microbiana em alimentos, 7 log UFC/g (ICMSF, 1986), no 7º dia e 14º dia para os respectivos microrganismos.

Altieri et al. (2005) estudando a eficiência antibacteriana da quitosana em queijo mussarela mantido sob temperatura de refrigeração (4°C), concluíram que a quitosana utilizada na massa do queijo (0,75mg/ml, baixo peso molecular e 85% desacetilada) inibiu o crescimento de microrganismos do grupo coliforme e de *Pseudomonas* spp., porém menores contagens, apresentadas pelo antimicrobiano, só foram observado ao 3º e 5º dia de armazenamento, para os respectivos microrganismos.

Bento et al. (2009) ao avaliar o efeito antilisterial de quitosana, in vitro, com grau de desacetilação (85%), produzida por *Mucorrouxi* UCP 064, observaram que as reduções da carga microbiana (em 2 Log UFC/ml) obtidas para a concentração bactericida mínima (5,0 mg/ml) e para a concentração inibitória mínima (2,5 mg/ml) ocorreram em um período inicial, compreendido em 2 e 4 horas respectivamente e se mantiveram constante até 96h (4 dias).

Shekarforoush et al. (2015) ao avaliarem o efeito inibitório do uso de quitosana e óleo essencial de orégano em carne de frango curada frente a *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, observaram que a amostra com quitosana (10mg/ml) apresentou um redução significativa

(0,49, 0,42 e 0,45 Log) ($p < 0,05$) em relação a amostra controle, sem antimicrobiano, em um intervalo de 24, 48 e 72 horas respectivamente, quando armazenadas a temperatura de 8°C.

Mei et al. (2013) quando avaliaram um filme protetor, composto por quitosana, no armazenamento de queijo da Mongólia, utilizando uma concentração de 13mg/ml, obtiveram reduções da carga microbiana autóctone, mesófilos e fungos, nos tratamentos, em todos os intervalos de armazenamento (°C) avaliados (15 e 30 dias), quando compararam a amostra controle.

El-Diasty et al. (2012) utilizando quitosana nas concentrações de 5mg/ml e 10mg/ml no controle fúngico de queijo Kariesh, obteve reduções nas contagens de bolores e leveduras durante os 21 dias de armazenamento, variando em aproximadamente em 1 Log UFC/g.

O mecanismo de ação da quitosana está intimamente relacionado à diversas variáveis e que estes fatores atuam de forma ordenada e independente para cada tipo de microrganismo (Kong 2010, Badawy 2011, Nascimento 2013). No que se refere ao modo de ação, Garcia (2011) comenta que o efeito bactericida da quitosana sob bactérias do grupo Gram-positiva, se dá pela formação de uma película ao redor da célula bacteriana, inibindo a absorção de nutrientes e conseqüentemente levando à sua morte. Outro fator à ressaltar, é que ao entrar em contato com o alimento, os materiais utilizados nas coberturas formam interações complexas, que ocorrem simultaneamente e em intensidades variadas (Paria & Khilar 2004, Assis & Brito 2014).

Análises físico-químicas

Os resultados obtidos nos ensaios físico-químico da amostra com melhor desempenho na atividade antimicrobiana, T1 e da amostra C encontraram-se em acordo como exigido pela Portaria 146/ 96 (Brasil 1996) e IN 30 (Brasil 2001) para umidade e gordura, apresentando, respectivamente, um teor médio de $51,45\% \pm 0,54$ e $51,02\% \pm 0,77$, para umidade e $43,22\% \pm 0,15$ e $43,54 \pm 0,33$ de gordura nos sólidos totais (GST), sem diferença estatística ($p > 0,05$).

A legislação brasileira estabelece que o queijo de coalho deve conter entre 36% a 54,9% de umidade, sendo classificado como queijo de alta umidade. Esses resultados corroboram com os observado por Silva et al. (2010) que relatam valores de umidade entre 45,5 a 51,5% em queijo de coalho.

Segundo Freitas Filho et al. (2009), a umidade interfere na atividade de água (Aa) e nas ações metabólicas de microrganismos ao longo da maturação, por favorecer o seu desenvolvimento pela elevada quantidade de água não ligada disponível para a suas reações metabólicas. Segundo Franco & Landgraf (2008) a atividade de água ótima para o crescimento de *Listeria* é próxima a 0,97, contudo, esta bactéria tem a capacidade de se multiplicar em atividade de água considerada baixa para a multiplicação de patógenos – 0,92. O valor de atividade de água obtido pelas amostras foi de 0,97, sem diferença. Apesar deste resultado apresentar-se no valor de a atividade de água ótima para o crescimento do patógeno, essa variável não deve ter influenciado no desenvolvimento microbiano, já que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

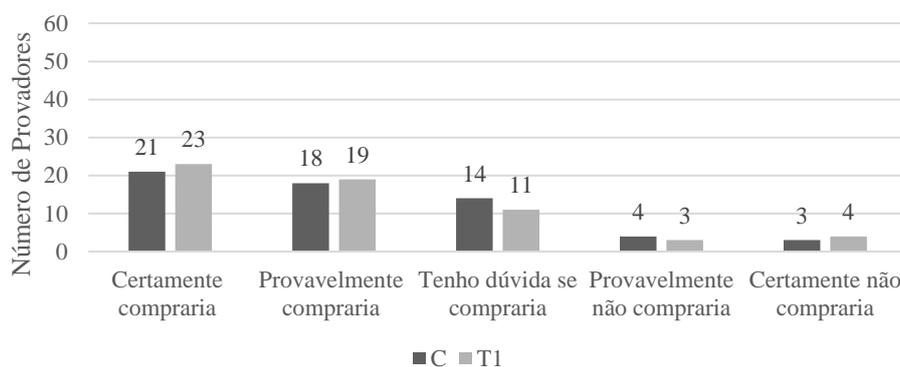
A amostra T1 apresentou pH mais ácido que a amostra C: 6,6 e 7,0 respectivamente, existindo diferença ($p < 0,05$) entre as amostras. Pereira (2013) e Hernandez-Muñoz et al (2008) também descreveram valores mais ácidos para as amostras adicionadas de cobertura de quitosana. Isso se deve a presença do ácido acético bem como o ajuste do pH da quitosana, para obtenção de um maior grau de protonação dos agrupamentos amina.

Análise Sensorial

No teste da intenção de compra verificou-se que a amostra T1 obteve resultados satisfatórios por apresentar maior média para o termo hedônico de “certamente compraria” e “provavelmente compraria” Respostas no nível 3 “tenho dúvida se compraria” apresentaram frequência bastante próximas entre as amostras T1 e C. Os conceitos “provavelmente não

compraria” e certamente não compraria” foram os menos votados pelos julgadores. Nascimento (2013) e Jorge (2010) também obtiveram resultados satisfatórios quando avaliaram a atitude de compra para goiabas minimamente processadas e maçãs revestidas de quitosana.

Figura 3.2–Teste de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de cobertura comestível de quitosana em diferentes concentrações.



T1: queijo de coalho + cobertura (15mg/ml) e C: controle T3: cobertura (5 mg/ml Quitosana).

3.6 CONCLUSÕES

O tratamento T1 foi o mais eficiente na inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* ATCC 3533 durante o período de 16 dias de armazenamento do queijo de coalho, por manter as menores contagens ao longo do tempo. No teste de intenção de compra, esta amostra foi bem votada, demonstrando possuir um potencial mercadológico. Portanto, tendo em vista a grande importância econômica e nutricional do queijo de coalho os resultados obtidos demonstram ser promissores no que se refere à conservação do queijo de coalho pelo emprego de coberturas naturais e comestíveis como a quitosana, por proporcionar qualidade microbiológica e a manutenção das características físico-químicas e sensoriais.

3.7 REFERÊNCIAS

ADOLF LUTZ. 2008. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020p.

ASSIS, O. B. G.; BRITTO, D. *Revisão: coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações*. **Brazilian Journal Food Technology Campinas**, v. 17, n. 2, p. 87-97, abr./jun. 2014.

ALTIERI, C. et al. *Utilização de quitosana para prolongar a vida de prateleira do queijo Mussarela*. **Journal of Dairy Science**. v. 88, 2005.

BADAWY, M. E. I.; RABEA, E. I. *A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection*. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, n. 6, p. 1457-1465. 2011.

BENTO, R.A. et al. *Sensory evaluation and inhibition of *Listeria monocytogenes* in bovine pâté added of chitosan from *Mucorrouxii**. **Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 588-591, mar. 2011.

BENTO, R. A.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M.; *Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.5, p. 260–274, set. 2009.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. D. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. *Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com Revestimento comestível antimicrobiano*. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, mar, 2007.

BORGES, M. F. et al. *Listeria monocytogenes em leite e produtos lácteos*. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, 31p. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96.

Regulamento Técnico Geral para Fixação de Requisitos Microbiológicos de Queijos.

Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO.

Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Diário oficial da União. Brasília, 16 de julho de 2001.

CAMILI, E. C. *et al.* Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinérea*. **Summa Phytopathologica**, v.33, p.3, p.215-221, 2007.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUT – CLSI. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: Norma aprovada** – 6º ed. MR-A6. V. 23, n. 2. Substitui a norma M7-A5, v20.n.2, 2003.

DI PIERRO, P. *et al.* Chitosan/whey protein film as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life. **LWT-Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 2324-2327, 2011.

EL-DIASTY, E. M. *et al.* Using of Chitosan as Antifungal Agent in Kariesh Cheese. **New York Science Journal**, v. 5, p. 5-10, 2012.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. *Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos*. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.435-451, abr. 2008.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2008. 182p.

FREITAS FILHO, J. R. *et al.* Avaliação dos parâmetros físico químicos do queijo coalho artesanal produzido em calçado-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 6, n. 1, 2012.

GUAHYBA BISNETO. J. P. **Listeria monocytogenes: um perigo presente nos alimento**. 2012. 53 f. (monografia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Medicina Veterinária. 2012.

- GARCIA, S. J. F.; *Avaliação do efeito cicatrizando do hidrogel de quitosana a 2% no tratamento de lesões cutâneas em camundongos*. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, 2011.
- HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; ALMENAR, E.; DEL VALLE, V.; VELEZ, D.; GAVARA, R. *Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (Fragaria x ananassa) quality during refrigerated storage*. **Food Chemistry**, London, v. 110, n. 2, p. 428–435, 2008.
- HOFER, E.; REIS, C.M.F.; HOFER, C.B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.32-37, 2006.
- JORGE, P. C. R. *Avaliação de maçã ‘royal gala’ revestida com filme de quitosana durante o período de pós-colheita*. 2010. 166 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Estadual Paulista. 2010.
- KABUKI, D. Y. *et al. Molecular subtyping and tracking of Listeria monocytogenes in latin-style fresh-cheese processing plants*. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Set. 2004.
- KONG, M. *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51–63, 2010.
- KOZAK, J.; BALMER, R.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. **FoodControl**, v.7, n.4/5, p.215-221, 1996.
- MEI, Jun *et al.* Characterization of edible starch–chitosan film and its application in the storage of Mongolian cheese. **Internationaljournalofbiologicalmacromolecules**, v. 57, p. 17-21, 2013.

- NASCIMENTO, J. I. G. *Atividade antifúngica da quitosana na expansão da vida de prateleira de goiaba minimamente processada*. 2013 73 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2013.
- NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. *Queijo de Coalho*. Coleção Agroindústria Familiar, v.1, DF, Embrapa, Informação Tecnológica. Brasília, 2006.
- NUNES, J. M. A. *et al. Aplicações da quitosana modificada: uma prospecção tecnológica chitosan modified applications: a technologic prospection*. In: **IV Simposio internacional de inovações tecnológicas**. SIMTEC, Aracaju/SE, 2013.
- PACHECO, M. S. *Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: Caracterização da Qualidade e do Sistema de Produção*. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2011.
- PAGANI, A. A. C. *et al. Aplicação de biopelículas pigmentadas em queijo de coalho*. **Revista GEINTEC**. São Cristóvão/SE, v. 3, n. 1, p. 41-47, 2012.
- PARIA, S.; KHILAR, K. C. A review on experimental studies of surfactant adsorption at the hydrophilic solid–water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 110, n. 3, p. 75-95, 2004.
- PEREIRA, R. B. M. *Bioatividade de quitosana na inibição de cepas patogênicas em queijo tipo Minas frescal*. 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2013.
- RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, n.2, p. 56-62, 2011.
- SAGDIÇ, O. *Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols*. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 36, n. 55, p. 467-473, 2003.

- SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. *Applications of chitin and chitosan for biomaterials*. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 13, n. 1, p. 383-420, 1996.
- SILVA, A. S. et al. *Listeria monocytogenes em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão*. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p.59-67, 2011.
- SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J.O. *Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de Coalho*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.69, n.2, p.214-221, 2010.
- SHEKARFOROUSH, S. S.et al. *Effect of chitosan on spoilage bacteria, Escherichia coli and Listeria monocytogenes in cured chicken meat*. **International journal of biological macromolecules**, v. 76, p. 303-309, 2015.
- STATSOFT, Inc, *Statistica for Windows 7.0*- Computer program manual, Tulsa-UK: StatSoft, 2004.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a utilização da cobertura comestível de quitosana, extraída da carapaça de crustáceos, de médio peso molecular, aplicada em queijo de coalho mostrou-se eficaz na inibição de cepa de *L. monocytogenes* ATCC 3533, uma vez que se verificou que a adição do antimicrobiano proporcionou menores contagens microbiana, com melhor desempenho para a amostra com cobertura de maior concentração (15 mg/ml) que, diante das demais, proporcionou menores cargas microbianas no período de 16 dias de armazenamento.

Também foi observado que a adição da cobertura comestível de quitosana, nas diferentes concentrações, proporcionaram melhores resultados quanto aos requisitos microbiológicos exigidos pela legislação, por possibilitar menores contagens para os microrganismos avaliados em relação a amostra controle.

Quanto aos parâmetros físico-químicos pôde-se observar que a adição da cobertura de quitosana, nas diferentes concentrações, não descaracterizou o produto quanto aos requisitos da composição de qualidade estabelecidos pela legislação para queijo de coalho, ao qual determina os parâmetros de umidade e gordura. Aos demais atributos físico-químicos avaliados, discretas alterações foram encontradas, porém não afetaram a qualidade do produto final, podendo ter influenciado, apenas, na seleção sensorial do melhor produto.

Sensorialmente, as amostras de queijo de coalho com cobertura de quitosana, nas diferentes concentrações, foram bem avaliadas quanto a aceitação, por apresentarem resultados nos mesmos termos hedônicos, para os atributos avaliados, das amostras sem cobertura. Em relação a preferência e intenção de compra dos produtos as amostras com cobertura comestível de quitosana de maior concentração (15mg/ml) se destacaram dentre os demais tratamentos.

Estes resultados são bastante promissores do ponto de vista da segurança alimentar, pois a adição de cobertura comestível de quitosana ao queijo de coalho apresenta-se como uma alternativa viável para sua conservação, uma vez que este produto, em sua maioria, apresenta deficiência quanto à padronização da qualidade, sendo apontado frequentemente como um importante canal de patógenos de procedência alimentar dentre os produtos lácteos, além de agregar valor ao produto.

Ressalta-se que a qualidade do produto é uma vantagem competitiva para as empresas e as impedem de ficarem às margens do mercado consumidor, uma vez que a segurança dos produtos alimentícios é a primeira e principal responsabilidade da indústria de alimentos.

Além disso, o uso de substâncias naturais para a preservação dos alimentos ganha força no sentido de que o mercado consumidor está cada vez mais exigente quanto a qualidade dos produtos agroalimentares, uma vez que estão cada vez mais a procura por produtos mais saudáveis, inócuos, nutritivos e que adotem métodos de produção de baixo impacto ambiental.

Entretanto, estudos adicionais são necessários para que se avalie a interferência da aplicação da cobertura comestível de quitosana sob a vida de prateleira do queijo de coalho, no intuito de garantir ao consumidor um alimento saudável e seguro.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, W. M.; ABRAHÃO, P. R. S.; MONTEIRO, C. L. B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 289, p. 96, 2008.

ABRAHÃO, W. M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, P. R. S.; MADEIRA, J. G. C.; SOUZA, G. C. A. Perfil genotípico através de RAPD de isolados de *Listeria monocytogenes* provenientes de amostras de queijos comercializadas no Estado do Paraná. In: **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Santos. 2005.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza (España): Editorial Acribia, S. A. 1997. p.258-264. 464p.

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

ALESSANDRIA, V.; RANTSIOU, K.; DOLCI, P.; COCOLIN, L. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International journal of food microbiology**, v. 141, p. S156-S162, 2010.

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

ALMEIDA, G.; MAGALHÃES, R.; CARNEIRO, L.; SANTOS, I.; SILVA, J.; FERREIRA, V.; HOGG, T.; TEIXEIRA, P. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. **International journal of food microbiology**, v. 167, n. 3, p. 303-309, 2013.

ALMEIDA, S. L.; JÚNIOR, FERNANDO. P.G.; GUERRA, J. R. F. Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista Interdisciplinar de Gestão Social**, v.2, n. 2, maio/ago. 2013.

ALMEIDA, S. L.; JÚNIOR, FERNANDO P. G.; GUERRA, J. R. F. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. **Revista Ibero-Americana de Estratégia**, v.9, n. 2, p.74-97, maio/ago. 2010.

ALVES, N. M.; MANO, J. F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. **International journal of biological macromolecules**, v. 43, n. 5, p. 401-414, 2008.

ANDRADE, A. A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação do queijo de coalho produzido no estado do Ceará**. 2006. 127 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ANONYMOUS (1985). Epidemiologic notes and reports Listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese - California. CDC-MMWR, 34: 357-359. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00000562.htm>. Acesso em: 20 fev. 1999.

ANTONINO, N. A. **Otimização do processo de obtenção de quitina e quitosana de exoesqueletos de camarões oriundo da indústria pesqueira paraibana**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

ARAÚJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; PAIVA, F. F. A.; MARINHO, F. A.; PESSOA, P. F. A.P.; VASCONCELO, H. E. M. Pesquisa participativa e o novo modelo de produção de queijo coalho artesanal da Comunidade de Tiasol, em Tauá, CE. **Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília**, v. 29, n. 1, p. 213-241, jan./abr. 2012.

ARAÚJO, J. B. C.; PIMENTEL, J. C. M.; NETO, A.G.V.; MATTOS, A. L. A.; PESSOA, P. F. A. P. Adoção de tecnologia para melhoria do processo de produção de queijo de coalho artesanal de agricultores familiares dos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. In: **XXXI Encontro nacional de engenharia de produção Inovação Tecnológica e Propriedade Intelectual: Desafios da Engenharia de Produção na Consolidação do Brasil no Cenário Econômico Mundial**, Belo Horizonte, MG, Brasil, out, 2011.

ARAÚJO, M. C. G.; SANTOS, R. A.; SILVA, C. P. A.; CIRILO, R. L.; CIRILO, R. L.; MARQUES, R. C. P. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de Currais Novos. **Holos**, v. 4, n. 25, p. 20-25, 2009.

ASSIS, A. S. **Produção e caracterização do biofilme de quitosana como envoltório protetor em morangos**. 2009. 86 f. Tese (Doutorado em nutrição). Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2009.

ASSIS, O. B. G.; LEONI, A. M. Filmes comestíveis de quitosana: ação biofungicida sobre frutas fatiadas. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p.33-38, jan-jun. 2003.

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

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.

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. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 173, p. 21-29, 2014.

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BENTO, R. A.; SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, T. C. M.; Perspectiva e potencial aplicação de quitosana como inibidor de *Listeria monocytogenes* em produtos cárneos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.10, n.5, p. 260–274, set. 2009.

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

BERNARDI, G. **Avaliação de métodos de detecção e ocorrência de *Listeria monocytogenes* em ricotas e queijos frescos produzidos no Estado do Paraná**. 2014. 87 f. (Dissertação) – Mestrado em ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2014.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L. COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BEZERRA, J. R. M. V. **Tecnologia da fabricação de derivados de leite**. Ed. Unicentro. p. 43- 45; 2008.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. **Foodborne listeriosis**, p. 71-74, 1990.

BILLE, J., BLANC, D. S., SCHMID, H., BOUBAKER, K., BAUMGARTNER, A., SIEGRIST, H. H.; TRITTEN, M. L. L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J. M.; MALINVERNI, R.; GENNE, D.; WAESPI, U. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro surveillance: bulletin Europeensur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 11, n. 6, p. 91-93, 2005.

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

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C.R.; DE FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. In: **Anais do 19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Recife, 2004.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E. F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A. Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, p. 31, 2009.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F.; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Brasil. v.21, n.1, p.31-40, 2003.

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

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia industrial*. São Paulo, **E. Blücher**, v.4, 2001, 254 p.

BOTREL, D. A.; SOARES, N. D. F. F.; GERALDINE, R. M.; PEREIRA, R. M.; FONTES, E. A. F. Qualidade de alho (*Allium sativum*) minimamente processado envolvido com Revestimento comestível antimicrobiano. **Ciências e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, mar, 2007.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez. 2003.

BRASIL, Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 62 de 29/12/2011. **Instrução Normativa n.62, de 29 de dezembro de 2011**. Diário Oficial da União, Brasília, Distrito Federal, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Portaria nº. 146, de 7 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, p.3977, 11 de março 1996, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Instrução Normativa Nº 30, de 26 de junho de 2001**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, 16/07/2001, Seção 1, Página 1. Brasília: 2001.

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

BRAUN, LAURENCE; GHEBREHIWET, BERHANE; COSSART, PASCALE. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. **The EMBO journal**, v. 19, n. 7, p. 1458-1466, 2000.

BRITO, J. R.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n.15, p. 4954-4961, Ago. 2008.

BROSCH, R.; CHEN, J.; LUCHANSKY, J. B. Pulsed-field fingerprinting of *Listeria*: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. **Applied and Environmental Microbiology**.v. 60, p. 2584-2592, 1994.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. YALDIRAK, G.; BODUR, T.; SIMSEK, M.; BOZKIR, H.; EREN, N. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **FoodControl**, v. 22, n. 5, p. 762-766, 2011.

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

CAMPANA, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C., SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β - quitina. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CARRIEDO, G. (2003). **Mexican cheese may cause listeriosis. News release from the city of Laredo Health Department.** Disponível em:

<http://www.ci.laredo.tx.us/health/News/08-20-03MexicanCheese/Mexican%20Cheese.htm>.

Acesso em: 27 ago. 2010.

CARRIQUE-MAS, J. J.; HÖKEBERG, I.; ANDERSSON, Y.; ARNEBORN, M.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M-L; OSTERMAN, B.; LEFFLER, M.; STEEN, M.; ERIKSSON, E.; G.; HEDIN GIESECKE, J. Gastroenterite febril depois de comer na exploração fabricados queijo fresco, um surto de listeriose. **Epidemiology and infection**, v. 130, n. 01, p. 79-86, 2003.

CASTELO BRANCO, M. A. A.; DE FIGUEIREDO, M. F. B.; DA SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. In: **Anais do 19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Recife, 2004.

CATANOZI, M. P. L. M.; MORELHÃO, G. G.; IURCIC, K. M. Avaliação microbiológica de lanches vendidos em carrinhos de ambulantes na cidade de Araraquara, SP. **Higiene Alimentar**, Araraquara, SP, v. 13, n. 66/67, p. 116-120, 1999.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, Mar. 2007.

CDC. Disponível em: <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-02-14/> Acesso em: 25 abr. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese--North Carolina, October 2000-January 2001. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 50, n. 26, p. 560, 2001.

CHALITA, M. A. N.; SILVA, D. da; PETTI, R. H. V. e SILVA, R. de O. P. Análise sociocultural do consumo de queijos e sua relação com a alimentação: diálogos entre classes sociais, estilos de vida e mercados de qualidade. In: XLVIII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL (SOBER), Campo Grande/MS, julho. **Anais do XLVIII congresso da sociedade brasileira de economia, administração e sociologia rural**, 2010.

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

CHUNG, Y-C.; SU, Y-A.; CHEN, C-C.; JIA, G.; WANG, H-L.; WU, J. C. G.; LIN, J.G. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. **ActaPharmacologicaSinica**, v. 25, n. 7, p.932-936, jul. 2004.

COMA, V.; MARTIAL-GROS, A.; GARREAU, S.; COPINET, A.; SALIN, F.; DESCHAMPS, A. Edible antimicrobial films base on chitosan matrix. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 3, p. 1162-1169, abr. 2002.

COSSART, P. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. **Cellular microbiology**, v. 2, n. 3, p. 195-205, 2000.

COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes*: na infectious agentes carcely known in Brazil. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 195-206, abr./jun. 2008.

D'AYALA, G.G.; MALINCONICO, M.; LAURIENZO, P. Review: Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. **Molecules**, v. 13, p. 2069-2106, 2008.

DALLARI, S. G.; BRAVO, E. S.; RIBEIRO, I. A.; OLIVEIRA, J. C.; FERREIRA, J. A. Vigilância sanitária de alimentos de consumo imediato no município de São Paulo: a importância da informação para o planejamento. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 76, p. 24-26, 2000.

DAMIAN, C. 2005. 154 f. **Efeito da quitosana na digestibilidade aparente da gordura e na qualidade de salsichas Frankfurt**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

DANCZUK, M. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de quitosana**. Dissertação 2007. 126 f. (Mestrado em Ciência da área Físico-química) –Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos. São Carlos, 2007.

DANIELSSON-THAM, M. L.; ERIKSSON, E.; HELMERSSON, S.; LEFFLER, M.; LÜDTKE, L.; STEEN, M.; THAM, W.; SORGJERD, S. Causes behind a human cheese-borne outbreak of gastrointestinal listeriosis. **Food borne Pathogens & Disease**, v. 1, n. 3, p. 153-159, 2004.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R.M.; CHIELLINI, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande, 2012.

DELGADO, A. R. Listeriosis in pregnancy. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 53, n. 3, p. 255-259, 2008.

DENNY, J.; MCLAUCHLIN, J. Human *Listeria monocytogenes* infections in Europe – na opportunity for improved european surveillance. **Euro surveillance**, v. 13, Jan/Mar, 2008.

DESTRO, M. T.; MELO SERRANO, A.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v.2, n.2, p.110-112, 1991.

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

DIAS, K. B.; DIEGO, P.S.; LAYANE, A. F.; RODRIGO, R. F.; JEFFERSON, L. C.; SILVA, A. L. L.; SCHEIDT, G. N. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, n.3, p. 184-191, ago, 2013.

DIRECTORATE, F. Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. **Health Product and Food Branch**, Health Canada, Ottawa, Ontario, 2011.

DOTTO, G. L.; GRENVIELI, A.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. A. Uso de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaia. In: **XVII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA; X ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**. 2008. p. 35-38.

DUARTE, D. A. M.; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado do Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297-302, jul./set. 2005.

ESCOBAR, C. A. M.; LEUTHIER, S.; ANTUNES, G.; ALBUQUERQUE, R. C. L. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 248-256, jul./ago. 2001.

ESPER, L. M. R.; KUAYE, A.Y. Qualidade microbiológica de amostras de ricotas comercializadas na região de Campinas. In: **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Santos: SBM; 2005.

ESPER, L. M. R.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. Qualidade microbiológica de ricotas comerciais e os riscos associados à presença de *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 70, n. 4, p. 554-559, 2011.

FARBER, J. M.; SPEIRS, J. I.; PONTEFRACT, R.; CONNER, D. E. Characteristics of nonpathogenic strains of *Listeria monocytogenes*. **Canadian journal of microbiology**, v. 37, n. 8, p. 647-650, 1991.

FAEP. Disponível em:

<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/producao.php>. Acesso em: 13 jul. 2012.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v.9, n.5, p.435-451, abr. 2008a.

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

FEITOSA, T.; BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v,23, p.162- 165, 2003.

FERREIRA, M.A. ***Listeria monocytogenes*: ocorrência na carne bovina e em plantas de processamento**. (2006). Disponível em: <http://www.crmv-pr.org.br/?p=imprensa/artigo_detalhes&id=3>. Acessado em: 06/02/2015.

FIGUEIREDO, E. A. T. **Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA**

(RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C. 2000. 100 p. Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying Salmonella entry into epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 99, n. 2, p. 283-296, 1991.

FOODS INGREDIENTES BRASIL, 2011. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/164.pdf>>. Acessado em: 12/04/2015.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 496p. 2010.

FOX, E.; HUNT, K.; O'BRIEN, M.; JORDAN, K. *Listeria monocytogenes* in Irish Farmhouse cheese processing environments. **International journal of food microbiology**, v. 145, p. S39-S45, 2011.

FOX, P. F. Cheese: Chemistry, physics and microbiology, **Chapman & Hall**, London, 1993. v. 1, p. 577.

FOX, P. F., GUINEE, T. P., COGAN, T. M., & MCSWEENEY, P. L. H. Pathogens and food-poisoning bacteria in cheese. **Fundamentals of Cheese Science**, 2000. p.503.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry**. Ed. Blackie Academic & Professional, London. 1 ed. 1998. 478 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2005.a

FRANCO, L. O.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.

Cunningha mellaelegans (IFM 46109) como fonte de quitina e quitosana. **Revista Analytica**. n. 54, p. 52-56, 2005.b

FRECE, J.; MARKOV, K.; ČVEK, D.; KOLAREC, K.; DELAŠ, F. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of dairy research**, v. 77, n. 01, p. 112-116, 2010.

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzida no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

FRETZ, R., SAGEL, U., RUPPITSCH, W., PIETZKA, A. T., STÖGER, A., HUHULESCU, S.; HEUBERGER, S.; PICHLER, J.; GRANDE, P.; PFAFF, G.; STARK, K.; PRAGER R.; FLIEGER, A.; FEENSTRA, O.; ALLERBERGER, F. **Listeriosis outbreak caused by acid coalho cheese 'Quargel', Austria and Germany 2009**. 2010.

FURLANETO, L.; KATOAKA, A. F. A. Análise microbiológica de lanches comercializados em carrinhos de ambulantes. **Lecta**, v. 22, n. 1/2, p. 49-52, 2004.

FURLANETTO, S. M. P.; SANTOS, M. A. A.; HARA, C. *Listeria* spp: Avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, v.10, n.46, p.30-34, 1996.

FURTADO, M. M. A qualidade do leite. In: **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 1991. p. 21-33.

FURTADO, M. M. **Isolamento de bactérias lácticas de leite cru e de soro de queijo da Região do Serro, Minas Gerais**. 1990. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 1990.

GAILLARD, J. L.; BERCHE, P.; FREHEL, C.; GOULN, E.; E COSSART, P. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v.65, n.7, p.1127-1141, Jun, 1991.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria* a food borne pathogen that knows to survive. **International Journal of Food microbiology**, v. 113, p. 1-15, 2007.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada communicable disease report= Relevé des maladies transmissibles au Canada**, v. 29, n. 21, p. 181, 2003.

GODSHALL, C. E.; SUH, G.; LORBER, B. Cutaneous Listeriosis. **Journal Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3591-3596, 2013.

GOLDFINE, H.; SHEN, H. *Listeria monocytogenes*: pathogenic and hot. **Springer**, New York, 2007. p. 197–223.

GOMES, F. C. O; MOREIRA, V. G.; ROSA, C. A.; SILVA, C. L. C; WALTER, M. E. Avaliação microbiológica, físico-química e sensorial de amostras de queijo minas artesanal, comercializadas em mercado público de Belo Horizonte, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.25, n. 192/193, p. 97-101, jan.-fev. 2011.

GOULET, V.; JACQUET, C.; VAILLANT, V.; REBIERE, I.; MOURET, E.; LORENTE, C.; ROCOURT, J. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. **The Lancet**, v. 345, n. 8964, p. 1581-2, 1995.

HANASHIRO, A.; Morita, M.; Torres, E. A. F. S.; Matté, M. H. **Qualidade Higiênico-Sanitária de Alimentos de Rua Populares Versus Orientais-Comercializados em São Paulo**. 2002. Disponível em: http://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/revp02_vol2n6.pdf . Acesso em: 02 janeiro 2015.

HELANDER, I.M.; NURMIAHO-LASSILA, E-L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International journal of food microbiology**, v. 71, n. 2, p. 235-244, 2001.

HO, A. J.; LAPPI, V. R.; WIEDMANN, M. Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 5, p. 2517-2524, 2007.

IRETON, K.; COSSART, P. Pascale. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 2, p. 276-283, abr,1998.

ISBERG, Ralph R.; VAN NHIEU, Guy Tran. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. **Trends in microbiology**, v. 2, n. 1, p. 10-14, 1994.

IVANEK, R.; GRÖHN, Y.T.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in multiple habitats and host populations: review of available data for mathematical modeling. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.4, p.319-336, 2006.

JACQUET, C.; DOUMITH, M.; BORDON, J. I.; MARTIN, P. M.; COSSART, P.; JACQUET, C.; JACQUET, C.; SAINT-CLOMENT, C.; BROUILLE, F.; CATIMEL, B.; ROCOURT, J. La listériose humaine en France en 1997 données du Centre national de référence des *Listeria*. **Journal de Pédiatrie et de Puériculture**, v. 12, n. 2, p. 116-118, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, editora Artmed, p.517-542, Porto Alegre, 2005.

JEMMI, T. & STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Revue Scientifi queet Technique**, v 25, n.2, p. 571- 580, 2006.

JENSEN, A.; FREDERIKSEN, W.; GERNER-SMIDT, P. Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 171-178, 1994.

JORGE, P.C.S.; NUCCI, M.; JANZANTTI, N.S.; RIZZO, J. S.; ASSIS, O. B. G.; MONTEIRO, M. Maçã “Royal Gala” revestida com quitosana estocada à temperatura ambiente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 253 – 264, jul./dez. 2011.

FREITAS FILHO, J. R.; SOUZA FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J H. B.; BEZERRA, J. D. C. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO QUEIJO “COALHO” ARTESANAL FABRICADO EM JUCATI - PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, p. 35-49, dez. 2009.

NOGUEIRA FILHO, A.; EVANGELISTA, F. R.; PIMENTEL, J. C. M.; CARVALHO, J. M. M. de; RODRIGUES, M. T. **Sistema agroindustrial do leite no Nordeste**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 159 p.

KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58, p. 140-147, 2011.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, set. 2004.

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

KELLS, J.; GILMOUR, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood ágar for isolation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 2 p. 167-174, Mar., 2004.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, n.144, v.1, p. 51-63. 2010.

KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. 2 ed. Printing-with revisions. Brooktondale, 1982. 711p.

LARSEN, C. N.; NORRUNG, B.; SOMMER, H. M.; JAKOBSEN, M. IN vitro and in vivo invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.11, p.5698-5703, nov. 2002.

LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; RIBEIRO, N. S.; SILVA, M. D. S; ASSIS, P. N. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em queijo do tipo "coalho" comercializado em Salvador (BA): importância para a saúde pública. **Revista Analytica**, n.2, p.38-41, 2002.

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

LIMA, C. P. **Resistência de bactérias lácticas a bacteriófagos isolados na produção de queijos de coalho -no Ceará**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2010.

LIMA, I. S. **Quitosanas e quitosanas químicas e morfologicamente modificadas com anidrido succinico: propriedades, adsorção e termoquímica**. 2005. 119 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **The New England Journal of Medicine**. v. 319, p. 823-828, 1988.

LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. & WHITMAN, W. B. (2009). FAMILY III. LISTERIACEAE. IN VOS, P., GARRITY, G. M., JONES, D., KRIEG, N. R., LUDWIG, W., RAINEY, F. A., SCHLEIFER, K. & WHITMAN, W. B. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. Georgia: Springer. 2009.

LUNDÉN, J.; TOLVANEN, R.; KORKEALA, H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. E6-E12, 2004.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 43 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Mestrado em Saúde Pública. Recife. 2008.

MACDONALD, P. D., WHITWAM, R. E., BOGGS, J. D., MACCORMACK, J. N., ANDERSON, K. L., REARDON, J. W., ROYDEN S. A. H, J.; GRAVES, M. L.; HUNTER, S. B.; SOBEL, J. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 677-682, 2005.

MAKINO, S. I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S.; IGIMI, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International journal of food microbiology**, v. 104, n. 2, p. 189-196, 2005.

MARICATO, É.S.O., **Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com actividade antioxidante**. 2010. 62 f. (Mestrado em bioquímica) - Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2010.

MATSUI, M. **Correlações entre estrutura química, superestrutura macromolecular e morfologia das blendas e redes poliméricas à base de quitina e poliuretano.** 2007. 116 f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Paraná, Pós-graduação em engenharia. Curitiba, 2007.

MAZARO, S. M.; DESCHAMPS, C.; MIO, L. L. M.; BIASI, L. A.; GOUVEA, A.; SAUTTER, C. K. Comportamento pós-colheita de frutos de morangueiro após aplicação pré-colheita de quitosana e acilbenzolar-s-metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

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

MENEZES, S. S. M.; SILVA, J. N. G.; SAMUEL, S. QUEIJO DE COALHO CASEIRO: a tradição como ativo territorial no município de Porto da Folha. **Ateliê Geográfico**, v. 6, n. 3, p. 52-71, 2012.

MINISTÈRE DE LA SANTÉ ET DES SERVICES SOCIAUX DU QUÉBEC (MSSS).

Listériose. (2009). Disponível em:

<<http://www.msss.gouv.qc.ca/sujets/santepub/listeriose.php#situation>>. Acesso em: 14 março 2015.

MORAIS, C. M. M. **Processamento artesanal do queijo de coalho de Pernambuco: uma análise de perigos.** 1995. 91 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1995.

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

MOSCALEWSKI, W. S.; ABRAHÃO, W. M.; LEONE, M. A.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, P. R. S. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados no Estado do Paraná. In: **Anais o 22º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, 2003

MORTAZAVIAN, A. M. et al. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1-18, 2007.

MUNOZ, Á. B.; CHAVES, J. A.; RODRIGUEZ, E. C.; REALPE, M. E. *Listeria monocytogenes* em manipuladores de alimentos: um novo enfoque para o controle dos riscos de segurança na indústria alimentícia. **Biomédica**, Bogotá, v. 33, n. 2, Jun. 2013.

MUNCK, A.V. Queijo de coalho: princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.13-15, jul./ago. 2004.

NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK-FILHO, J. E. M.; SILVA, W. A. S.; EVERTON, P. C.; OLIVEIRA, F. D. C. C. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados na cidade de São Luiz/Maranhão. In: **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Brasília: SBM; 2007.

NASCIMENTO, M. G. F.; NASCIMENTO, R. E.; CUNHA, C. P.; CORBIA, G. C. A. Estudo transversal sobre alguns fatores de risco na contaminação natural de coliformes fecais em queijo minas frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 15, n. 86, p. 55-59, 2001.

NASSU, R. T. **Análise sensorial do queijo artesanal: sabor e identidade**. Segurança e qualidade de Alimentos. EMBRAPA, 2005. (Comunicado Técnico 69). Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br/070publicacoesseg/seguranca>>. Acesso em: 08 ago. 2009.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. **Queijo de Coalho**. Coleção Agroindústria Familiar. Embrapa, Informação Tecnológica. Brasília, DF, v.1, p.40, 2006.

NITSCHKE, J.; ALTENBACH H.J.; MALOLEPSZY, T.; MÖLLEKEN, H. A new method for the quantification of chitin and chitosan in edible mushrooms. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 11, p. 1307-1310, 2011.

NO, H.K.; PARK, N. Y.; LEE, S. H.; MEYERS, S. P. **International Journal of Food Microbiology**, 74, p. 65, 2002.

NOGUEIRA FILHO, A.; EVANGELISTA, F. R.; PIMENTEL, J. C. M.; CARVALHO, J. M. M. de; RODRIGUES, M. T. **Sistema agroindustrial do leite no Nordeste**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil; Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 159 p.

NUNES, J. M. A.; MARQUES, L. G. A.; SILVA FILHO E. C.; SANTOS, M. R. C.; PESSOA, C. O. **Aplicações da quitosana modificada: uma prospecção tecnológica chitosan modified applications: a technologic prospection**. IV Simposio internacional de inovações tecnológicas. Anais SIMTEC . Aracaju/SE , v. 1, n. 1, p. 150-158. 2013.

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

OLIVEIRA, J. L. **Fotodegradação de corantes têxteis e aplicação da quitosana como tratamento terciário destes efluentes**. Dissertação (Mestrado em Química).2006. 70 f. Centro de Ciências Exatas. Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2006.

OLIVEIRA, K.A.; NETO, EVÊNCIO, J.; PAIVA, J.E.; MELO, L.E.H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do cabo de santo agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set., 2010.

ORNELAS, E. A.; FERNANDES, T. M.; ASSIS, F. L. A.; SILVA, M. C. C. S.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Perfil microbiológico de amostras de queijo minas artesanal produzidos na Serra da Canastra-MG. In: **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Santos: SBM; 2005.

ORNELAS, E. A.; ROSA, A. A.; SILVA, M. C.; FERNANDES, T. M. G.; VASCONCELOS-NETO, M. C. V.; SILVA, M. C. C. et al. Perfil microbiológico de amostras de queijo comercializadas em Minas Gerais no ano de 2006. In: **Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Brasília: SBM; 2007.

ORNELAS, E. A.; SILVA, K. Q.; RANGEL, F. F.; PENA, E. C.; SILVA, M. C. C. Perfil microbiológico de amostras de queijo comercializadas em algumas cidades de Minas Gerais. In: **Anais do 28º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre, 2002.

PACHECO, M. S. **Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: Caracterização da Qualidade e do Sistema de Produção**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife, 2011.

PAGANI, A. A. C.; SANTANA, M. M.; ALEXANDRE, A. P. S.; SILVA, E. A.; SILVA, G. F. Aplicação de biopelículas pigmentadas em queijo de coalho. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão/SE, v. 3, n. 1, p. 41-47, 2012.

PAGOTTO, F.; N. G, L. K.; CLARK, C.; FARBER, J. Canadian listeriosis reference service. **Food bourne Pathogens & Disease**, v. 3, n. 1, p. 132-137, 2006.

PARISI, A.; LATORRE, L.; FRACCALVIERI, R.; MICCOLUPO, A.; NORMANNO, G.; CARUSO, M.; SANTAGADA, G. Occurrence of *Listeria* spp. in dairy plants in Southern Italy and molecular subtyping of isolates using AFLP. **Food Control**, v. 29, n. 1, p. 91-97, 2013.

PAULA, J. C. J.; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 367/368, p. 19-25, Mar/Jun, 2009.

PEARSON, L. J.; MARTH, E. H. *Listeria monocytogenes*: threat safe a food supply. **Journal Science Dairy**, v.73, p. 912-928, 1980.

PENTEADO, A. L.; COSTA, S. D. O.; CASTRO, M. F. M. F. P. M. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Higiene Alimentar**, n. 26, v. 206/207, p. 156-159, mar./abr. 2012.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, p.427-31, 2001.

PEREIRA, M. L.; RODRIGUES, P. R.; FORTES-DIAS, C. L. *Listeria monocytogenes*: prevalência em queijo tipo Minas e recuperação nos produtos artificialmente contaminados e mantidos a -18 o C por 20 meses. **Higiene Alimentar**, v. 23, p. 102-109, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PIZZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v.24, n.4, p.715-727, 2006.

POMPERMAYER, D. M. C. *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* incidence in low moisture cheese produced in Rio Grande do Sul - Brasil. In: **Anais do 7º Congresso Latino americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**. Santiago, 2002.

PORTER, W. L.; CONCA, K. R.; LACHICA, R. V.; MAYER, J. M.; PARISER, E. R. Chitin and Chitosan as Novel Protective Food Ingredients .In: U.S Army Natick RD&E Center, Natick, MA, **Marine Polymer Technologies**, Danvers, MA. 2000.

RAMOS, S. N. M.; COSTA, C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 33, n. 4, p. 613-618, Dez. 2003.

RHOADES, J.; ROLLER, S. Antimicrobial Actions of Degraded and Native Chitosan against Spoilage Organisms in Laboratory Media and Foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.1, p. 80-86, jan. 2000.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in polymer science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; BROUILLE, F.; SAINT-CLOMENT, C.; CATIMEL, B. La listériose humaine en France en 1995 et 1996: Données du Centre National de Référence des *Listeria*. **Feuillets de biologie**, v. 39, n. 224, p. 11-13, 1998.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. (Ed.). 3.ed. **Listeria, listeriosis and food safety**. Boca Raton: CRC Press, 2007. Cap. 1, p.1-20.

RODRÍGUEZ, M. S., CENTURIÓN, M. E., AGULLÓ, E. Chitosan-yeast interaction in cooked food: influence of the Maillard reaction. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 2576-2578. 2002.

RÜCKERL, I.; MUHTEREM-UYAR, M.; MURI-KLINGER, S.; WAGNER, K. H.; WAGNER, M.; STESSL, B.L. *monocytogenes* in a cheese processing facility: Learning from contamination scenarios over three years of sampling. **International journal of food microbiology**, v. 189, p. 98-105, 2014.

RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, n.2, p. 56-62, 2011.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. Eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. 3ed. Florida, 2006.

SAGOO, S. K.; BOARD, R.; ROLLER, S. Chitosan potentiates the antimicrobial action of sodium benzoate on spoilage yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, p.168-172, dez. 2002.

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

SCHLECH, W.F., LAVIGNE, P.M.; BORTOLUSSI, R.A., ALLEN, A.C., HALDANE, E.V., WORT, A.J., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLLS, E.S. E BROOME, C.V., Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. **New England Journal of Medicine**. v. 308, p. 203-208, 1983.

SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; POIATTI, M. L.; VIEIRA, S.D.; SESANA, J. C.,; SESANA, R. C. Microbiological quality of handmade produced type "Minas frescal" cheese, comercialized in the region of Jaboticabal-SP. In: **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu, 2001.

SEBRAE. Queijos Nacionais- Leite e Derivados. Estudo de Mercado Sebrae\ESPM, p.34 2008a.

SEBRAE/AL. **APL- laticínios sertão** (T3-ano 2007). Maceió: Instituto Compasso; 2008b.

SEBRAE/CE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no Ceará**. Fortaleza, p. 208. 1998.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência à antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp. isolados de queijos coalho**

comercializados em Recife-PE. 2000. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

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

SHAHIDI, F.; KAMIL, J.; JEON, Y. J.; KIM, S.K. Antioxidant role of chitosan in a cooked cod (*GadusMorhua*) model system. **Journal of Food Lipids**, v.9, p.57-65. 2002.

SHEEHAN, B.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; GOUIN, E.; KLARSFELD, A. D.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. In: **Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals**. Springer Berlin Heidelberg, 1994. p. 187-216.

SILVA, A. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; COSTA, M.R.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em Leite e Produtos Lácteos no Brasil: Uma Revisão. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p.59-67, 2011.

SILVA, A. C. **Produção de quitina e quitosana em culturas submersas de *Rhizopusarrhizus* nos meios milhocina e sintéticos para moleculares.** 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica de Pernambuco, 2007.

SILVA, H. S. R. C; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, Jul. 2006.

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, mar. 2003.

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, mar. 1998.

SINGH, T.; VESENTINI, D.; SINGH, A.P.; DANIE, L. G. Effect of chitosan on physiological, morphological, and ultra structural characteristics of wood-degrading fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 2, p. 116-124, 2008.

SOARES. A. K. C.; BRASIL. L. M.; NUNES, E. D.; MACIEL, S. M. S.; SÁ, L. M. B. Mapeamento dos queijos produzidos no estado da paraíba. V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienista de Alimentos. 2011.

SOBRAL, D.; PAULA, J. C. J.; SILVA, P. H. F. Queijo de coalho: características e tecnologia. **Inf. Agropec. Agroindústria: leite e derivados**, Belo Horizonte, v. 28, n. 238, p. 57-62, maio/jun. 2007.

SOUSA, S.; LIMA, A. W. O.; SOUSA, C.P. Isolamento de espécies de *Listeria* em queijo de massa crua tipo coalho comercializado na cidade de João Pessoa – PB. In: **Anais do 17º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Fortaleza, 2000.

SÁ, D. B.; SILVA, B. J. A.; LOUREIRO, L. F.; AMÊNDOLA, N.; CRUZ, E. C. S. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos tipo Minas frescal comercializados no estado do Rio de Janeiro. In: **Anais do 22º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Florianópolis, 2003.

SOUSA, R. A.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MAIA, G. A.; FRIZZO, S. E. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho artesanal, comercializado à temperatura ambiente, em Fortaleza, CE. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 138, p. 66-69, jan./fev. 2006.

STEPHENS, J.C.; ROBERTS, I.S.; JONES, D.; ANDREW, P.W. Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. **Journal of Applied Microbiology**, v.70, n.3, p.239-244, 1991.

STREIT, F. **Estudo do aproveitamento do bagaço de maçã para produção de quitosana fúngica**. 2004. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2004.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, p.383-409, 2001.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

SWANSON, Joel A.; BAER, Stephen C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in cell biology**, v. 5, n. 3, p. 89-93, 1995.

TOMPKIN, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 4, p. 709-725, Nov., 2002.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUES-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, Jul. 2001.

VIEIRA, S. D.; POIATTI, M. L.; SCHOCKEN-ITURRINO, R. P.; VIEIRA, H.; ANDRADE, T. M. *Listeria monocytogenes* in type "Minas frescal" craft cheese, marketed in the area of Araguaiana-TO. In: **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Foz do Iguaçu, 2001.

VIEIRA, M.A.S.; MASSAGUER, P.R. Incidência de *Listeria* ssp. em queijos minas frescal comercializados em Campinas/SP. **Revista Indústria de Laticínios**, v.23, n.4, p.62-65, 2000.

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

WAAK, E.; THAM, W.; DANIELSSON-THAM, M. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3366-3370, July, 2002.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELEMA, A. VAN BOEKEL, M. A. J. S.; Dairy technology: principles of milk properties and processes. **Food science and technology**, New York, p. 727, 1999.

WESLEY, I. V. Listeriosis in animals. In E. T. Ryser & E. H. Marth, **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. (283-304). New York: CRC Press. 2007.

WINTEROWD, J. G.; SANDFORD, P. A. "Chitin and Chitosan". **Food Polysaccharides and Their Applications**, Stephen, A M, Ed. Marcel Dekker. Nueva York, 1995.

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

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; DA COSTA, M. Quantificação de coliformes fecais e isolamento de *E. coli* e *Listeria* sp. Em queijos produzidos artesanalmente e comercializados na região litorânea no Rio Grande do Sul. In: **Anais do 23º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Santos: SBM; 2005.

ZAMANI, A.; EDEBO, L.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Temperature shifts for extraction and purification of zygomycetes chitosan with dilute sulfuric acid. **International journal of molecular sciences**, v. 11, n. 8, p. 2976-2987, 2010.

ANEXO I



Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana
e Meio Ambiente



Nome

Data

E-mail

Celular/ Whatsapp

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL I

1. TESTE DE COMPARAÇÃO PAREADA (DIFERENÇA)

INSTRUÇÕES: Você está recebendo 2 amostras, para serem avaliadas. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras e responda se existe diferença entre elas.

SENTIU DIFERENÇA

Sim ()

Não ()

Comentários: _____

ANEXO II



Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana
e Meio Ambiente



Nome _____ Data _____
E-mail _____ Celular/ Whatsapp _____

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL I

1. TESTE DE COMPARAÇÃO PAREADA (PREFERÊNCIA)

INSTRUÇÕES: Você está recebendo 2 amostras, para serem avaliadas. Deguste cuidadosamente cada uma das amostras e escreva o código da amostra preferida.

CÓDIGO DA AMOSTRA PREFERIDA

Comentários: _____

ANEXO III



Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e
Meio Ambiente



Nome _____ Data _____
 E-mail _____ Celular/ Whatsap _____

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL III

TESTE DE ACEITAÇÃO

INSTRUÇÕES: Você está recebendo um par de amostra. Avalie cada um dos atributos sensoriais (aparência, cor, odor, sabor e textura), e atribua uma nota (de acordo com as descrições da primeira coluna)

	ATRIBUTO	CÓDIGO DA AMOSTRA	CÓDIGO DA AMOSTRA
1- Desgostei extremamente	Aparência	_____	_____
2- Desgostei moderadamente		_____	_____
3- Desgostei regularmente	Cor	_____	_____
4- Desgostei ligeiramente		_____	_____
5- Não gostei/nem desgostei	Odor	_____	_____
6- Gostei ligeiramente		_____	_____
7- Gostei regularmente	Sabor	_____	_____
8- Gostei moderadamente		_____	_____
9- Gostei extremamente	Textura	_____	_____

Comentários: _____

ANEXO IV



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro Acadêmico de Vitória
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana
e Meio Ambiente**



Nome _____ Data _____
E-mail _____ Celular/ Whatsapp _____

FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL IV

TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

INSTRUÇÕES: Após a avaliação das amostras atribua uma nota (de acordo com as descrições da primeira coluna) quanto a intenção de compra de cada produto.

	CÓDIGO	CÓDIGO	CÓDIGO
5- Certamente compraria	_____	_____	_____
4- Provavelmente compraria	_____	_____	_____
3- Tenho dúvida se compraria	_____	_____	_____
2- Provavelmente não compraria	NOTA	NOTA	NOTA
1- Certamente não compraria	_____	_____	_____

Comentários: _____

ANEXO V

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **“Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de cepas de *Listeria monocytogenes*”**, no caso de você concordar em participar, favor assinar ao final do documento. Sua participação não é obrigatória, e, a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador(a) ou com a instituição.

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e endereço do pesquisador(a) principal, podendo tirar dúvidas do projeto e de sua participação.

NOME DA PESQUISA: “Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de cepas de *Listeria monocytogenes*”

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Erilane de Castro Lima da

ENDEREÇO: R. da Chesf, nº 113, Timbi, Camaragibe/PE. CEP: 54765-270.

TELEFONE: (81) 8834 4067

CONTATO COM O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA: Av. da Engenharia s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: 2126 8568/21268500. Email: cepccsaude@ufpe.br

PESQUISADORES PARTICIPANTES: Roberta Bento de Albuquerque (Prof^a) e Priscilla Gregorio de Oliveira (Aluna).

OBJETIVOS: Verificar a bioatividade antimicrobiana da quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho frente a *Listeria monocytogenes* objetivando fornecerão mercado novas tecnologias de conservação do produto. Afim de aumentar sua vida de prateleira e oferecer ao consumidor um produto seguro e saudável. Uma vez que a quitosana é um antimicrobiano natural que não gera risco à saúde.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO: Os participantes não treinados receberão as amostras, e deverão avaliar o produto quanto aos atributos sensoriais cor, aroma, sabor, sabor residual, textura e qualidade global, através de fichas sensoriais. Amostras dos produtos elaborados serão servidas, aos provadores, em cabines individuais iluminadas com luz branca, à temperatura de 8 °C, em copos descartáveis, aleatoriamente codificados.

RISCOS: Pequeno risco, quanto ao desconforto sensorial. Após a análise, o participante receberá água mineral para aliviar o desconforto, caso haja. Pessoas que apresentam alergia a produtos lácteos não serão selecionados, sendo portanto a apresentação de alergia aos produtos lácteos um critério de exclusão. A quitosana é um produto natural que possui propriedades medicinais para a saúde humana, trazendo assim benefícios para os componentes do painel sensorial. A ANVISA considera a quitosana como um alimento funcional, Isto é, alimento que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde.

CUSTO/REEMBOLSO PARA O PARTICIPANTE: Os participantes de pesquisa não arcarão com nenhum gasto decorrente da sua participação. Além disso, os participantes da pesquisa não receberão qualquer espécie de gratificação devido à participação na pesquisa.

CONFIDENCIALIDADE DA PESQUISA: Garantimos que somente serão divulgados dados diretamente relacionados aos objetivos da pesquisa; e a privacidade dos sujeitos, quanto aos dados pessoais, serão confidenciais.

Assinatura do Pesquisador Responsável:

TERMO DE CONSENTIMENTO DO VOLUNTÁRIO

Eu, _____ - NOME DO ENTREVISTADO(A), _____ - RG/CPF, declaro que li as informações contidas nesse documento, fui devidamente informado(a) pelo pesquisador(a) Eriane de Castro Lima Machado dos procedimentos que serão utilizados, riscos e desconfortos, benefícios, custo/reembolso dos participantes, confidencialidade da pesquisa, concordando ainda em participar da pesquisa. Foi-me garantido que posso retirar o consentimento a qualquer momento, sem que isso leve a qualquer penalidade. Declaro ainda que recebi uma cópia desse Termo de Consentimento.

Vitória de Santo Antão, _____ de _____ de 2014.

NOME E ASSINATURA DO SUJEITO

(Nome por extenso)

(Assinatura)

TESTEMUNHAS

(Nome por extenso)

(RG ou CPF)

(Nome por extenso)

(RG ou CPF)

ANEXO VI

DIRETRIZES PARA AUTORES

Periódico: Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos

As colaborações devem ser enviadas pelo Sistema Eletrônico de Revistas da UFPR, digitadas em Word for windows, usando fonte Arial, tamanho 12, espaçamento simples e organizadas da seguinte forma:

- título breve e descritivo do conteúdo do artigo;
- nome do autor (titulação, instituição a que pertence e endereço eletrônico em nota de rodapé);
- resumo em português (250 palavras ou 5% do texto - NBR-6028/03);
- palavras-chave (de 3 a 6 – recomenda-se consulta aos tesouros da área);
- introdução;
- material e métodos;
- resultados e discussão;
- conclusão;
- título em inglês, abstract (resumo em inglês) e palavras-chave em inglês;
- referências (em sua maioria publicada após 2000).

Tabelas e ilustrações

As tabelas e ilustrações devem ser numeradas distinta e consecutivamente, inseridas o mais próximo possível do local em que são mencionadas no texto e apresentar títulos explicativos. Enviar figuras e gráficos em arquivos separados com extensão *.jpeg.

Para assegurar nitidez, os desenhos, mapas e fotografias devem ser apresentados no original em preto-e-branco.

Conjugação verbal

Recomenda-se a expressão impessoal evitando o uso da primeira pessoa do singular ou plural. Os dados referentes aos resultados de experiências e observações devem ser expressos no passado. Generalidades, verdades imutáveis, fatos e situações estáveis exigem formas verbais indicativas de seu valor constante (presente).

Referências

As referências efetivamente citadas no artigo pelo sistema autor/data devem constituir lista única (em ordem alfabética) no final do trabalho e serem apresentadas de acordo com a NBR - 6023/02 (reeditada em agosto de 2002) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Modelos

Livros

Ex.: WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. Yeast: the practical guide to beer fermentation. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010. 304 p.

Capítulos de livro

Ex.: WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. Biology, enzymes and esters. In: WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. Yeast: the practical guide to beer fermentation. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010. p.17-40

Publicações periódicas

Ex.: MARTINS, M.; PACHECO, A.M.; LUCAS, A.C.; ANDRELLO, A.C.; APPOLONI, C.R.; XAVIER, J.J.M. Brazil nuts: determination of natural elements and aflatoxin. Acta Amazonica, v.42, n.1, p. 157-164, mar. 2003.

Dissertações e teses

Ex.: SANTANA, A.A. Influência de características físicas de plastificantes na confecção e no comportamento estrutural e higroscópico de filmes de alginato de cálcio. 2010. 155 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

Legislação

Ex.: BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 12 de 4 de setembro de 2003. Regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 9 de setembro de 2003. Seção 1, p. 2.

Anais de Congressos, Simpósios, Seminários e Conferências

Ex: PIMENTEL, T.C.; GARCIA, S.; GARCIA, S.; PRUDÊNCIO, S.H. Efeito do grau de polimerização de frutanos tipo inulina sobre os atributos de qualidade de iogurtes probióticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 10., 2010, Curitiba. Anais... Curitiba: SBCTA, 2010. p. 1-10.

Documentos eletrônicos

Ex.: TUNGLAND, C. Inulin: a comprehensivescientificreview. 2000. Disponível em: <http://members.shaw.ca./duncancrow/inulin_review.html>. Acesso em: 07/02/2011.

Periódico: Pesquisa Agropecuária Tropical

Pesquisa Agropecuária Tropical (PAT) é o periódico científico trimestral editado pela Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, em versão eletrônica (e-ISSN 1983-4063). Destina-se à publicação de Artigos Científicos cuja temática tenha aplicação direta na agricultura tropical. Logo, a vinculação indireta do objeto de estudo com essa temática não é razão suficiente para que uma submissão seja aprovada para seguir no processo editorial deste periódico. Notas Técnicas, Comunicações Científicas e Artigos de Revisão somente são publicados a convite do Conselho Editorial.

A submissão de trabalhos é gratuita e deve ser feita exclusivamente via sistema eletrônico, acessível por meio do endereço www.agro.ufg.br/pat ou www.revistas.ufg.br/index.php/pat. Os autores devem cadastrar-se no sistema e manifestar, por meio de documento (**ver sugestão de modelo**) assinado por todos, escaneado e inserido no sistema como documento suplementar, anuência acerca da submissão e do conhecimento da política editorial e diretrizes para publicação na revista PAT (caso os autores morem em cidades diferentes, mais de um documento suplementar pode ser inserido no sistema, pelo autor correspondente).

A revista PAT recomenda a submissão de artigos com, no máximo, 5 (cinco) autores. A partir deste número, uma descrição detalhada da contribuição de cada autor deve ser encaminhada ao Conselho Editorial (lembre-se de que, às vezes, a seção “Agradecimentos” é mais apropriada que a autoria).

Durante a submissão *on-line*, o autor correspondente deve atestar, ainda, em nome de todos os autores, a originalidade e ineditismo do trabalho (trabalhos já disponibilizados em anais de congresso ou repositórios institucionais não são considerados inéditos, por tratarem-se de uma forma de publicação e ampla divulgação dos resultados), a sua não submissão a outro periódico, a conformidade com as características de formatação requeridas para os arquivos de dados, bem como a concordância com os termos da Declaração de Direito Autoral, que se

aplicará em caso de publicação do trabalho. Por fim, deve-se incluir os chamados metadados (informações sobre os autores e sobre o trabalho, tais como título, resumo, palavras-chave – em Português e Inglês) e transferir os arquivos com o manuscrito e documento suplementar (anuência dos autores).

Se o trabalho envolveu diretamente animais ou seres humanos como sujeitos da pesquisa, deve-se comprovar a sua aprovação prévia por um comitê de ética em pesquisa. Experimentos conduzidos em condições de campo devem apresentar dados oriundos de, pelo menos, dois ciclos de produção, ou dois anos de avaliação.

Os trabalhos devem ser escritos em **Português** ou **Inglês**. A possibilidade de submissão e publicação de trabalhos em outros idiomas deve ser submetida à análise do Conselho Editorial.

Os manuscritos devem ser apresentados em até 18 páginas, com linhas numeradas. O texto deve ser editado em *Word for Windows* (tamanho máximo de 2MB, versão .doc) e digitado em página tamanho A-4 (210 mm x 297 mm), com margens de 2,5 cm, em coluna única e espaçamento duplo entre as linhas. A fonte tipográfica deve ser *Times New Roman*, corpo 12. O uso de destaques como negrito e sublinhado deve ser evitado. Todas as páginas devem ser numeradas. Os manuscritos submetidos à revista PAT devem, ainda, obedecer às seguintes especificações:

1. Os Artigos Científicos devem ser estruturados na ordem: *título* (máximo de 20 palavras); *resumo* (máximo de 250 palavras); *palavras-chave* (no mínimo, três palavras, e, no máximo, cinco, separadas por ponto-e-vírgula); *título em Inglês*; *abstract*; *key-words*; *Introdução*; *Material e Métodos*; *Resultados e Discussão*; *Conclusões*; *Agradecimentos* (se necessário, em parágrafo único) e *Referências*. Chamadas relativas ao título do trabalho e os nomes dos autores, com suas afiliações e endereços (incluindo e-mail) em notas de rodapé, bem como agradecimentos, somente devem ser inseridos na versão final corrigida do manuscrito, após sua aceitação definitiva para publicação.

2. As citações devem ser feitas no sistema “autor-data”. Apenas a inicial do sobrenome do autor deve ser maiúscula e a separação entre autor e ano é feita somente com um espaço em branco. Ex.: (Gravena 1984, Zucchi 1985). O símbolo “&” deve ser usado no caso de dois autores e, em casos de três ou mais, “et al.”. Ex.: (Gravena&Zucchi 1987, Zucchi et al. 1988). Caso o(s) autor(es) seja(m) mencionado(s) diretamente na frase do texto, utiliza-se somente

o ano entre parênteses. Citações de citação (citações secundárias) devem ser evitadas, assim como as seguintes fontes de informação: artigo em versão preliminar (no prelo ou *preprint*) ou de publicação seriada sem sistema de arbitragem; resumo de trabalho ou painel apresentado em evento científico; comunicação oral; informações pessoais; comunicação particular de documentos não publicados, de correios eletrônicos, ou de *sites* particulares na Internet.

3. As referências devem ser organizadas em ordem alfabética, pelos sobrenomes dos autores, de acordo com a norma NBR 6023:2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Os destaques para títulos devem ser apresentados em itálico e os títulos de periódicos não devem ser abreviados.

4. As tabelas e figuras (dispostas no decorrer do texto) devem ser identificadas numericamente, com algarismos arábicos, e receber chamadas no texto. As tabelas devem ser editadas em preto e branco, com traços simples e de espessura 0,5 ponto (padrão *Word for Windows*). Quando aplicável, os títulos de tabelas e figuras devem conter local e data. As figuras devem ser apresentadas com resolução mínima de 300 dpi.

5. A consulta a trabalhos recentemente publicados na revista PAT (www.agro.ufg.br/pat ou www.revistas.ufg.br/index.php/pat) é uma recomendação do corpo de editores, para dirimir dúvidas sobre estas instruções e, conseqüentemente, agilizar a publicação.

6. Os autores não serão remunerados pela publicação de trabalhos na revista PAT, pois devem abrir mão de seus direitos autorais em favor deste periódico. Os conteúdos publicados, contudo, são de inteira e exclusiva responsabilidade de seus autores, ainda que reservado aos editores o direito de proceder a ajustes textuais e de adequação às normas da publicação. Por outro lado, os autores ficam autorizados a publicar seus artigos, simultaneamente, em repositórios da instituição de sua origem, desde que citada a fonte da publicação original na revista PAT.

7. Endereço e contatos:

Pesquisa Agropecuária Tropical (PAT)

Escola de Agronomia

Universidade Federal de Goiás

Caixa Postal 131 - Campus II (Samambaia)

CEP 74.001-970 - Goiânia, GO - Brasil

E-mail: gilsonrevistaufg@gmail.com

Telefone: (62) 3521-1552

Homepage: <http://www.agro.ufg.br/pat> ou www.revistas.ufg.br/index.php/pat