

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**ALCIONE DOS SANTOS LIMA**

**Bioatividade de quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de  
coalho**

Vitória de Santo Antão

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

**ALCIONE DOS SANTOS LIMA**

**Bioatividade de quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição, sob orientação da Professora Dra Erilane de Castro Lima Machado e Coorientação da Mestranda Roselia Odete Justino da Silva.

Vitória de Santo Antão

2018

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB-4/2018

L732b Lima, Alcione dos Santos.

Bioatividade de quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho/ Alcione dos Santos Lima. - Vitória de Santo Antão, 2018.

43 folhas: il.

Orientadora: Erilane de Castro Lima Machado.

Coorientadora: Roselia Odete Justino da Silva.

TCC (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, bacharelado em Nutrição, 2018.

Inclui referências.

1. Queijo. 2. Processamento de alimentos. I. Machado, Erilane de Castro Lima (Orientadora). II. Silva, Roselia Odete Justino da (Coorientadora). III. Título.

637.3 CDD(23.ed)

BIBCAV/UFPE-021/2018

## Folha de aprovação

Alcione dos Santos Lima

Título: Bioatividade de quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Colegiado do Curso de Graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Nutrição

Data: 26 de janeiro de 2018

Banca Examinadora:

---

Profª Drª Michelle Galindo de Oliveira  
UFPE/ CAV

---

Ms. Priscilla Gregório de Oliveira Sousa  
Nutricionista

---

Mestranda Cristiane de Melo Vasconcelos  
Médica Veterinária

A meus pais,  
em retribuição a tudo que tenham feito e fazem por mim.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, em primeiro lugar. Por me propiciar uma vida cheia de oportunidades, por ter me concedido a força necessária para continuar, mesmo diante de tantas dificuldades enfrentadas durante toda trajetória na graduação. Por ser meu porto seguro, meu alicerce onde me amparou sem que me deixasse cair.

Aos meus pais e meus irmãos por toda força, apoio e confiança que em mim depositaram, os quais tiveram a paciência para me acalmar nos meus momentos mais frustrantes e principalmente por terem acreditado em mim mesmo quando eu não acreditava.

A todos meus familiares e amigos em especial a minha prima Janeide Lira e meus amigos Rosicleide Santos (Rosinha) e Klayton Carvalho os quais sempre acreditaram em mim e estimularam buscar tal posição.

As minhas grandes amigas Gesikelly Lopes (Kelly), Kennia Borges (Kiss) e Tafnes Oliveira (Tafe) conquistadas durante a graduação onde compartilhamos bons e maus momentos, que sempre tinham uma força para me dar e uma grande paciência para me suportar (risos) e que quero tê-las presentes por toda minha vida.

À doutora Erilane Machado por ter me propiciado a oportunidade de desfrutar um pouco de seu vasto conhecimento, por sua paciência e dedicação em me orientar em vários momentos da graduação e em especial neste trabalho.

À Rosélia Odete a qual tive o grande prazer de tê-la como minha co-orientadora com todo seu conhecimento e companheirismo e mais ainda por ter se tornando uma amiga muito especial que fortaleceu imensamente essa etapa da minha vida.

Aos meus eternos professores e amigos Geíza Azeredo e Fernando Oliveira, os quais podem não saber, mas contribuíram imensamente para minha atual formação, por meio de suas orientações que precederam a graduação, mas que perpetuaram até hoje e assim continuará.

A todos os professores do curso de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão - UFPE por sua colaboração na minha vida pessoal e profissional.

*...Um alimento dos deuses  
ele teria coalhado  
e, assim, em forma de queijo,  
o leite foi conservado...  
(Marcos Aurélio Chagas)*

## RESUMO

O queijo de coalho é considerado um produto de alto risco para os consumidores, considerando suas condições gerais de fabricação e comercialização. Diante do pressuposto, este trabalho teve como objetivo, estudar a bioatividade da quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho. Para atender ao objetivo a quitosana foi aplicada à massa do queijo nas concentrações de 1 mg/g (Q1), 2 mg/g (Q2) e 4 mg/g (Q4) e como cobertura das amostras de queijo nas concentrações de Q5(5 mg/mL), Q10(10mg/mL) e Q15(15mg/mL). O controle foi realizado pela utilização de produtos sem aplicação de quitosana (CTR) e outro contendo ácido acético a 1% (AC). A inibição bacteriana foi investigada por meio da contagem de células viáveis. As amostras dos produtos foram armazenadas sob refrigeração (6-8°C) e avaliadas nos intervalos de 0, 4, 8, 12 e 16 dias pela técnica "Pour plate" e incubadas entre 35-37°C até a contagem. Os resultados demonstraram que a quitosana aplicada à massa reduziu 0,09; 0,35; 0,9 log UFC/g para os tratamentos Q1, Q2 e Q4, respectivamente, quando comparado ao controle (CTR), demonstrando assim a maior efetividade no tratamento de maior concentração, onde se manteve reduzindo a carga microbiana durante todo o experimento. Nos produtos contendo quitosana na cobertura se verificou as respectivas reduções de 1,32; 1,46; 1,65 log UFC/g para o Q5, Q10 e Q15 quando comparado ao controle (CTR) estando o Q15 com maior efetividade mantendo a taxa de crescimento inferior ao controle ao longo dos 16 dias de incubação. Conclui-se que a quitosana exerceu efeito antimicrobiano sobre os microrganismos mesófilos presentes no queijo de coalho, mantendo-os com contagens inferiores quando comparado ao queijo convencional sem o conservante.

Palavras-chave: Contaminação. Queijo. Quitosana.

## ABSTRACT

Curd cheese is considered a product of potential high risk for consumers, considering their general conditions of manufacture and commercialization. The objective of this work was to study the bioactivity of chitosan in the inhibition of the mesophilic microbiota in rennet cheese. In order to reach the objective, chitosan was applied to the cheese mass at concentrations of 1 mg / g (Q1), 2 mg / g (Q2) and 4 mg / g (Q4) and as a cover for cheese samples at concentrations of Q5 ( 5 mg / mL), Q10 (10 mg / mL) and Q15 (15 mg / mL). The control was performed by the use of products without application of chitosan (CTR) and another containing 1% acetic acid (AC). Bacterial inhibition was investigated by counting viable cells. Samples of the products were stored under refrigeration (6-8 ° C) and evaluated at the 0, 4, 8, 12 and 16 day intervals by the "Pour plate" technique and incubated at 35-37 ° C until counting. The results showed that chitosan applied to the mass reduced 0.09; 0.35; 0.9 log CFU / g for the treatments Q1, Q2 and Q4, respectively, when compared to the control (CTR), thus demonstrating the greater effectiveness in the treatment of higher concentration, where it remained reducing the microbial load throughout the experiment. In the products containing chitosan in the coating the reductions of 1.32 were verified; 1.46; 1.65 log CFU / g for Q5, Q10 and Q15 when compared to the control (CTR), with Q15 being most effective, keeping the growth rate lower than the control over the 16 days of incubation. It was concluded that chitosan exerted an antimicrobial effect on the mesophilic microorganisms present in the rennet cheese, keeping them with lower counts when compared to the conventional cheese without the preservative.

**Keywords:** Contamination. Cheese. Chitosan.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da quitina e da quitosana .....	25
Figura 2 – Fluxograma da elaboração do queijo com aplicação da quitosana na massa .....	28
Figura 3 – Ação antimicrobiana da quitosana em diferentes concentrações sob a viabilidade de mesófilos na massa de queijo de coalho.....	31
Figura 4 – Ação antimicrobiana da quitosana em diferentes concentrações sob a viabilidade de mesófilos em cobertura de queijo de coalho.....	32

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem dos microrganismos mesófilos sob a ação de quitosana em diferentes concentrações (1mg/g, 2mg/g; e 4mg/g) incorporada à massa do queijo de coalho por um período de 16 dia .....30

Tabela 2 - Contagem dos microrganismos mesófilos sob a ação de quitosana em diferentes concentrações (5mg/mL, 10mg/mL; e 15mg/m) utilizada como cobertura do queijo de coalho por um período de 16 dias .....32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
AC	Amostras controle de queijo contendo apenas ácido acético
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CAV	Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão
CTR	Amostras controle de queijo sem quitosana e ácido acético
DVA	Doenças Veiculadas por Alimentos
GD	Grau de desacetilação
IN	Instrução Normativa
Log	Logaritmo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
PE	Pernambuco
pH	Potencial de Hidrogênio
Q1	Amostras de queijo com quitosana na massa (1mg/g)
Q2	Amostras de queijo com quitosana na massa (2mg/g)
Q4	Amostras de queijo com quitosana na massa (4mg/g)
Q5	Amostras de queijo com cobertura de quitosana (5mL/g)
Q10	Amostras de queijo com cobertura de quitosana (10mL/g)
Q15	Amostras de queijo com cobertura de quitosana (15mL/g)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
UFC/g	Unidades Formadoras de Colônias por gramas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
g	Gramas
h	Hora
L	Litros
m	Massa
mg	Miligramas
mL	Mililitros
MW	Massa molar
v/v	Volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 Objetivo geral .....	16
2.2 Objetivos específicos .....	16
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>4 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
4.1 Queijo.....	18
4.1.1 Definição e contexto histórico do queijo .....	18
4.1.2 Produção de queijo no Brasil e no Mundo.....	20
4.1.3 Queijo de Coalho .....	21
4.2 Contaminantes mesófilos do queijo .....	22
4.3 Quitosana.....	24
4.3.1 Definição e origem .....	24
4.3.2 Aplicabilidade e formas de utilização da quitosana .....	25
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 Período e Local de estudo.....	27
5.2 Materiais.....	27
5.3 Elaboração dos géis de quitosana nas diferentes concentrações.....	27
5.5 Aplicação da cobertura de quitosana .....	29
5.6 Análise antimicrobiana.....	29
<b>6 RESULTADOS</b> .....	30
6.1 Análise antimicrobiana da quitosana na massa de queijo de coalho sob a viabilidade de mesófilos .....	30
6.2 Análise antimicrobiana da quitosana em cobertura de queijo de coalho sob a viabilidade de mesófilos .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

## 1 INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um dos produtos mais tradicionais comercializados no Nordeste brasileiro e devido a sua grande popularidade é vastamente consumido pela população regional. Este fato pode ser explicado principalmente pela diversidade de utilização e consumo que o queijo possui (AUSTREGÉSILO NETO, 2016). Este alimento é considerado um componente alimentar cultural com produção passada de geração em geração. Apesar do grande cunho cultural, o queijo de coalho dentro de sua esfera socioeconômica deixa de ser apenas um produto típico para a população nordestina (PORTO et al., 2016) passando assim a representar uma importante fonte de renda familiar para os produtores deste derivado lácteo como é o caso dos agricultores familiares (ARAÚJO et al., 2012).

A produção de queijo de coalho é principalmente realizada por médias e pequenas queijarias e propriedades rurais de menor porte. Seu valor comercial se dá principalmente pelo alto aproveitamento do processo de fabricação onde não são necessárias técnicas complexas (SILVA et al., 2010). Atribui-se valor substancial a esta atividade no que diz respeito à esfera local econômica, social e cultural (MENEZES; SILVA; SANTOS, 2012).

A maior parte da produção de queijo de coalho é realizada com leite cru, não obedecendo a um padrão de elaboração (FREITAS; TRAVASSOS; MACIEL, 2013). Descreve-se no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de queijo de coalho (BRASIL, 2001), que o leite deve ser submetido a processos mecânicos apropriados e tratamento térmico. Diante disso, observa-se que a matéria-prima utilizada para a produção do queijo não atende as normas de higienização vigentes (DANTAS, 2012). Salienta-se que, no estado de Pernambuco, designa-se como queijo de coalho tipo “A” aquele produzido com leite pasteurizado e tipo “B”, o que é produzido com leite cru (PERNAMBUCO, 1999).

Embora seja parte do cotidiano da população local, este produto é visto como de baixa qualidade sob o ponto de vista microbiológico, podendo oferecer riscos à saúde do consumidor (MENESES et al., 2012). Isso se deve a implicações relacionadas à ausência de critérios para a seleção da matéria-prima e à falta de

conformidades no que se refere às técnicas de fabricação do produto alimentício (NASSU; MACEDO; LIMA, 2006).

No que diz respeito às técnicas de processamento, o queijo de coalho apresenta-se como um produto de intensa manipulação, sem as devidas condições higiênicas necessárias, havendo também falhas no transporte e armazenamento. Para Nero et al., (2005) apud Freitas (2011), no queijo de coalho as deteriorações ocorrem em sua maioria pelos coliformes que causam alterações imediatas e por alguns microrganismos do gênero *Clostridium*, responsáveis pela ocorrência das alterações tardias como o estofamento. O queijo ainda está sujeito à contaminação por microrganismos que podem gerar danos a saúde dos consumidores como *Staphylococcus spp* e *Salmonella spp*. (SOUSA et al., 2014). Isso torna o queijo de coalho um potente veículo de contaminantes, expondo a sociedade a possíveis Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), e desta forma ocupa papel importante na saúde pública (OPAS, 2009; DANTAS et al., 2013).

O queijo de coalho se apresenta como sendo de baixa durabilidade fazendo necessária a atribuição de técnicas que promovam o aumento de sua vida útil (PAGANI et al., 2012). Neste sentido o emprego de tecnologias de conservação microbiológica, associadas às Boas Práticas de Fabricação (BPFs), é primordial e de grande relevância, visto que pode promover a manutenção da qualidade de produtos processados e melhorar a sua estabilidade de prateleira.

Entre as tecnologias atuais, destaca-se a quitosana que é um polissacarídeo derivado da quitina facilmente encontrada na natureza, podendo ser encontrada em fungos e na carapaça de crustáceos (KUNIYOSHI, 2012). Nos últimos anos tem sido referenciada com notoriedade por causa das suas características físico-químicas, antioxidantes e atuação contra vários grupos de microrganismos (levedura, bolores e bactérias), exercendo atividade antimicrobiana, o que propicia aos alimentos uma vida útil de longa duração e diminuição do uso de aditivos químicos (FAI; STAMFORD Thayza; STAMFORD Tânia, 2008; KUNIYOSHI, 2012). Além de não ser tóxica a humanos, tornando segura sua utilização, ser natural e biodegradável, e mostrar-se como um recurso de fácil aplicação (KUNIYOSHI, 2012).

O desempenho da quitosana sobre a qualidade do produto final depende de alguns fatores como aplicação das BPF's (FAI; STAMFORD Thayza; STAMFORD Tânia, 2008), redução do pH do meio, o que pode potencializar seu efeito antimicrobiano, e ainda de características inerentes a própria quitosana como seu grau de desacetilação e peso molecular (PAGNO, 2016).

Diante da baixa qualidade microbiológica que o queijo de coalho expõe e consequente dos riscos aos consumidores, torna-se importante a utilização de tecnologias como a quitosana para que por meio de sua aplicação possam ser obtidos produtos alimentícios, em especial o queijo de coalho, com reduzida carga microbiana que por ventura poderiam deteriorar e alterar a qualidade final do produto bem como ofertar riscos a saúde do consumidor.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Estudar a bioatividade da quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a bioatividade da quitosana incorporada no queijo de coalho nas diferentes concentrações na inibição de mesófilos;
- Analisar a bioatividade da quitosana como cobertura de queijo de coalho (comercial) em diferentes concentrações na inibição de mesófilos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os queijos, em geral, são alimentos propícios à deterioração microbiológica devido a sua alta umidade, riqueza nutricional e muitas vezes técnicas de processamento que promovem contaminação. O queijo de coalho, por ser um produto majoritariamente de produção artesanal é submetido a condições que favorecem essa contaminação, tais como qualidade do preparo e higienização dos manipuladores, condições de manuseio inadequadas, transporte e armazenamento irregulares.

Tendo como base esse pressuposto, é primordial a utilização de recursos que visem promover a conservação do queijo de coalho, objetivando o aumento do tempo de prateleira e qualidade microbiológica do produto. Logo, a quitosana pode ser utilizada devido a suas várias aplicabilidades e por se apresentar como uma tecnologia emergente, permitindo sua utilização por parte dos produtores em virtude de seus inúmeros benefícios, tendo a capacidade conservante como destaque. Ainda, a quitosana é um composto natural obtido de produtos que por ventura podem ser considerados resíduos orgânicos, tornando assim mais significativo seu emprego além de ser um produto de baixo custo de obtenção permitindo assim sua utilização por parte de pequenos produtores de queijo.

Diante da demanda por alimentos mais seguros e saudáveis além de toda aplicabilidade da quitosana em especial no setor alimentício, sua utilização como conservante alimentar e em especial do queijo de coalho mostra-se promissor, por poder garantir a maior qualidade microbiológica e conseqüentemente maior segurança do produto final ao consumidor.

## 4 REVISÃO DA LITERATURA

### 4.1 Queijo

#### 4.1.1 Definição e contexto histórico do queijo

Queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite ou ao leite reconstituído - integral, parcial ou totalmente desnatado - ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas, produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, de especiarias, de condimentos ou de aditivos (BRASIL, 2017).

Destaca-se como um dos subprodutos alimentícios mais antigos, dando sentido assim a sua grande aceitação tanto em convívio familiar como em meio socioeconômico (DANTAS, 2012). A elaboração de queijo consiste na obtenção de coalhada por meio da aglomeração de proteína e gordura presentes no leite sendo descartado o soro e os demais componentes (DANTAS, et al., 2013). A prática é milenar havendo relatos históricos que apontam sua existência em momentos antes de Cristo. Os dados históricos giram em torno dos 8 mil anos atrás com a domesticação de plantas e animais em regiões entre os rios Tigre e Eufrates (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). Onde foi descoberto de forma acidental, quando leites transportados em recipiente de pele de animais sofreram alteração resultando em coalhadas que serviram como alimento e o soro utilizado como bebida. Inicialmente eram produzidos a partir de leite de cabra, ovelhas, éguas e jumentas utilizando-se enzimas coagulantes oriundas de estômagos de coelhos e cabritos ou até mesmo vinagre (CHALITA et al., 2009).

A utilização milenar dos derivados lácteos pode ser observada nos escritos bíblicos:

*“A seguir foi buscar coalhada, leite e bezerro assado e serviu tudo para eles.” (Gênesis 18, 8 – BIBLÍA SAGRADA, 2011a).*

*“E estes dez queijos, entrega-os ao chefe mil. Informa-te se teus irmãos vão bem e traz um sinal de que cumprisse tua missão.” (1 Samuel 17, 18 – BIBLÍA SAGRADA, 2011b).*

O cenário histórico e importância do queijo é retratado também em muitos textos poéticos como expõe o poema “O queijo” do poeta Marcos Aurélio Chagas (2015) :

*Da história da humanidade  
ele é um dos alimentos  
dos mais antigos que há  
bem vindo em todos os momentos.*

*Descoberto por acaso  
foi de fato um resultado  
ao guardar no saco um leite,  
acidente afortunado.*

*Um alimento dos deuses  
ele teria coalhado  
e, assim, em forma de queijo,  
o leite foi conservado.*

*Conhecido desde Homero,  
ganhou nova projeção,  
a técnica queijeira, em Roma,  
ampliando a produção.*

Os locais de produção do queijo são variados, bem como o processo de aquisição da matéria-prima: o leite, pode ser adquirido nos próprios locais onde serão processados como as pequenas propriedades rurais, caracterizando o queijo artesanal/caseiro; pode ser provindo diretamente de outras unidades rurais sendo produzidos assim nas pequenas fábricas e ainda podem ser adquiridos por meio do contato com terceiros, sendo conduzido até o estabelecimento onde será processado como é o caso das indústrias (MENEZES, 2015).

São inúmeros tipos de queijo existentes na atualidade onde Dantas (2012) afirma serem decorrente da incessante busca por atender aos mais variados paladares, o que permite atribuição de especiarias e aplicação de novas técnicas como menciona Chalita et al., (2009) que nos primórdios antes de Cristo já se produzia queijos defumados. Ainda para este autor as diversidades dos queijos também se dão devido à influência exercida nos animais devido às variações geográficas.

Diante da diversidade de queijo que muitas vezes decorre das influências locais o cenário produtor se apresenta entre os de maiores destaques no setor agropecuário.

#### 4.1.2 Produção de queijo no Brasil e no mundo

A produção de leite influencia diretamente a de seus derivados como o queijo o qual possui expressiva produção e consumo. Dentre os maiores produtores mundiais de leite destacam-se a União Europeia a qual expôs uma redução significativa decorrente de crises no setor entre 2016 e 2017, sendo destaque para o mesmo período a recuperação da produção da Nova Zelândia e o crescimento significativo dos Estados Unidos (ABIQ, 2017). A Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ (2017) esclarece que os países da América Latina apresentaram aumento na produção de leite até o início de 2017 com a exceção da Argentina que se mantinha em queda. A estabilidade na produção mundial de leite permite grandes projeções para os principais derivados lácteos, como o queijo o qual vem movimentando o mercado de exportações principalmente o norte-americano (CONAB, 2017).

No Brasil, a produção de leite tem sido superada pela de queijo a qual é cada vez mais crescente, os do tipo artesanal são os mais tradicionais, mas que estão sendo aprimorados por meio da aplicação de técnicas que permitem maior garantia de segurança (SEBRAE, 2016).

A expressividade na produção nacional de queijo começou a regredir no ano de 2015 onde expos um aumento de 2,9% enquanto que em anos anteriores teria atingido cerca de 9% (ABIQ, 2015). A Associação Brasileira das Indústrias de Queijo – ABIQ (2015) apontam a escassez de leite no ano de 2015, somada a redução do consumo decorrente da crise financeira o qual o país enfrentou como razões para a regressão na produção nacional. O cenário apresentou mudanças no ano de 2017 onde a Organization for Economic Cooperation and Development e a Food and Agriculture Organization (OECD/FAO) destacaram o queijo como o derivado lácteo de maior produção no país podendo alcançar a marca de 795,98 mil toneladas, sendo estimado ainda um aumento de 19% entre 2017- 2025 (CONAB, 2017).

A produção de queijo no Brasil é numerosa e diversa tendo entre eles o queijo de coalho com produção e consumo principalmente na Região Nordeste (ALMEIDA;

JÚNIOR; GUERRA, 2013). O destaque para o queijo de coalho dentre as demais variedades de queijos se dá por muitas vezes devido suas indiscutíveis características sensoriais e alto valor sociocultural.

#### 4.1.3 Queijo de Coalho

Queijo de coalho é obtido por meio da coagulação do leite pela ação do coalho ou com outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas, com a obtenção de uma massa dessorada, semicozida ou cozida, submetida à prensagem e secagem (BRASIL, 2017) e que deve ser comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação (BRASIL, 2001). De acordo com Brasil (2001), apresenta-se como um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. Tendo o nordeste brasileiro como o lugar de sua origem, mas que na atualidade se difundiu em todo o país (LIMA et al., 2017).

Essa tradição era dirigida única e exclusivamente as mulheres, tendo em vista que cabia a elas a função de transformar a matéria-prima que os homens “adquiriam” em um produto propriamente dito, destinando-se a elas ainda a responsabilidade de assegurar a existência desses produtos no futuro (MENEZES, 2013).

Na região Nordeste, destacam-se os estados do Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte por produzir queijo de coalho com sabor marcante e característico de modo que se tornou um dos queijos mais expressivos do país (ALMEIDA; PAIVA JÚNIOR; GUERRA, 2013; DANTAS et al., 2013). É um produto consumido por pessoas de todas as classes sociais, hábito que segundo Menezes (2013) se disseminou na região devido a fatores como grande produção, dificuldade no transporte que impediam sua distribuição para outras regiões e a isso baixa adesão do mercado externo, cenário este que veio a mudar em meados da década de 80 com a sua inserção ao mercado. Assim como seu sabor marcante, o seu processo de fabricação que é relativamente simples contribui em parte para sua popularidade de forma que seu mercado seja significativo (DANTAS, 2012).

## 4.2 Contaminantes mesófilos do queijo

Por ser um produto de fabricado a partir de leite cru e procedência incerta além de serem comercializados em locais sem a devida fiscalização como feiras livres sem as condições higiênico-sanitárias necessárias assumem assim um papel de possíveis meios de transmissão de microrganismos patogênicos à população (DANTAS, 2012). As condições gerais de produção do queijo de coalho lhes conferem características significantes passíveis à contaminação.

O grupo de microrganismos mesófilos possui um alto destaque nos queijos, tendo em vista que estes são muitas vezes provenientes de matéria-prima com baixas condições higiênico-sanitárias, como ocorre frequentemente na produção do queijo de coalho. Soma-se a isso, as ocorrências provenientes do processamento desse subproduto do leite (PICOLI et al., 2006). A importância dos mesófilos se dá principalmente por indicar as condições higiênicas sanitária do produto (VIDAL-MARTINS; ROSSI JUNIOR; RESENDE-LAGO, 2005) além de se expressar no leite tanto como microrganismos deteriorantes quanto como patógenos.

Os microrganismos mesófilos são aqueles capazes de se proliferarem em temperaturas entre 20 e 45°C (GAVA; SILVA; FRIAS, 2009; EMBRAPA, 201-?) tendo maior taxa de multiplicação a partir dos 30°C (COSTA, 2016) sendo assim o ponto ótimo para o seu crescimento e desenvolvimento. Destaca-se neste sentido a importância da refrigeração a fim de se prevenir a proliferação do grupo (SAEKI; MATSUMOTO, 2010). Picoli et al., (2006) em seu estudo com queijo fresco caprino, o qual apresenta características semelhantes ao de coalho como sua umidade, evidenciou que a contaminação por mesófilos se dá muitas vezes por problemas com o leite pós-pasteurização e na refrigeração do produto pronto comprometendo sua vida de prateleira.

Os mesófilos que são provenientes do leite com indevida manipulação são representados pelos lactobacilos, estreptococos, lactococos e coliformes, os quais possuem rápido desenvolvimento no leite em especial em períodos quentes onde atuam produzindo ácido láctico por meio da fermentação (EMBRAPA, 201-?).

Estudos esclarecem que o grupo de mesófilos é amplo e se faz presente em alimentos refrigerados sem que haja crescimento, ocorrendo assim apenas quando

estes produtos são submetidos a condições adequadas aos mesmos (SILVEIRA, 2010). Dentre os microrganismos mesófilos podem ser citados: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp* (MASSAGUER, 2006 apud SILVEIRA, 2010). Para Guerra (2016), os mesófilos apresentam um subgrupo classificado como psicotrófilos. Estudos definem que estes microrganismos são capazes de se proliferarem mesmo que lentamente em condições de refrigeração apesar de considerarem a temperatura ótima para o seu desenvolvimento semelhante as dos mesófilos como é o caso da *Listeria Monocytogenes* (COSTA, 2016; GUERRA, 2016). Sendo conferida a estes microrganismos grande importância por parte da indústria (COSTA, 2016) em especial no queijo de coalho que é frequentemente submetido a tais condições.

Dantas et al., (2013) ao avaliar a qualidade microbiológica de queijo de coalho observou que 100% de suas amostras estavam contaminadas por coliformes, sendo confirmada presença de *E. coli*, não sendo identificada a presença de *Salmonella spp*. Evangelista-Barreto et al, (2016) em seu estudo com queijo de coalho evidenciou alta presença de microrganismos mesófilos sendo 86% de suas amostras contaminadas por *Staphylococcus spp* e *coliformes* presente em 70% os quais foram confirmados *E. coli em metade das amostras*.

A maior parte das amostras de queijo coalho estudada por Fonseca, Reis e Santos (2016) apresentaram-se com valores de coliformes superiores aos permitidos e presença de *E. coli* em pelo menos uma amostra, porém não foi identificada presença de *L.monocytogenes* e *Salmonella*.

Tendo em vista a intensa manipulação do queijo de coalho durante as etapas de processamento e armazenamento torna-se importante discutir a origem dos contaminantes *E.coli* e *Staphylococcus spp* por não haver clareza se são oriundos da matéria prima ou dos manipuladores (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016). Para Fonseca, Reis e Santos (2016) a identificação de *E.coli*, *L.monocytogenes* e *Salmonella* nos queijos são indicativos de falhas higiênicas durante e após o processamento.

Diante do pressuposto torna-se importante estudar o efeito de substâncias com propriedades antimicrobiana e atóxica, como a quitosana na fabricação de queijo de coalho.

### **4.3 Quitosana**

#### **4.3.1 Definição e origem**

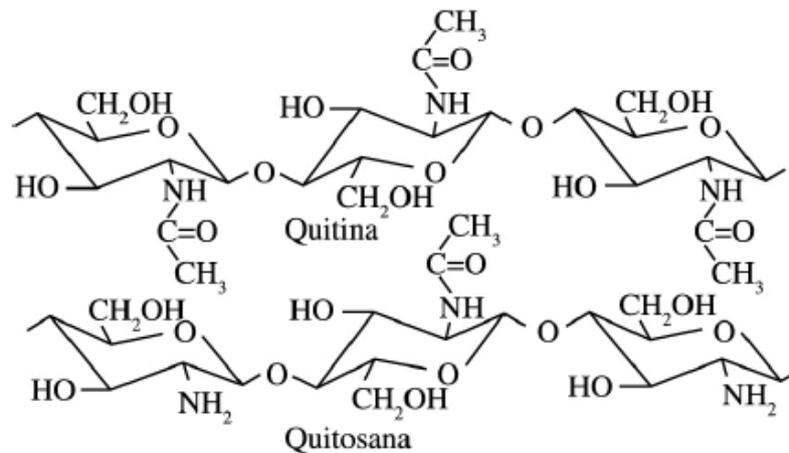
A quitosana é um polímero derivado do exoesqueleto de crustáceos e insetos sendo obtido por meio do processo de desacetilação da quitina, encontrando-se também em fungos (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011). O caranguejo se destaca dentre os crustáceos por ser uma fonte expressiva de quitina (ABREU et al., 2013).

A quitina a qual dá origem a quitosana possui semelhanças estruturais à celulose variando apenas com a substituição de um grupo hidroxilo por um acetamida (MARICATO, 2010). Possui composição variável com moléculas de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose onde seu grau de acetilação da massa molecular define a composição do polímero assim como suas propriedades (MARICATO, 2010; SINHA, et al., 2004 apud ABREU, et al., 2013). Por ser derivada da quitina a quitosana apresenta características semelhantes à mesma (DIAS et al., 2013) como evidenciado por meio da estrutura química expressa na figura 1.

A quitosana assim como a quitina não apresenta potenciais alergênicos e vem sendo bastante utilizada em diversos setores incluindo o alimentício (MARICATO, 2010). São inúmeras as funções apresentadas pela quitosana dentre elas está a ação antimicrobiana que pode estar relacionada à presença do grupo amino em sua estrutura (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Kuniyoshi (2012), também destaca a característica antimicrobiana e a atoxicidade da quitosana. Saliencia-se ainda o fato da quitosana ser biodegradável e biocompatível tendo em vista que é oriunda de fontes renováveis tornando-se importante biomaterial para a indústria (KUNYOSHI, 2012; DIAS et al., 2013) sendo ainda considerada um produto de baixo custo (MARICATO, 2010; DIAS et al., 2013; ALTARUGIO; PEREIRA, 2016).

**Figura 1:** Estrutura química da quitina e da quitosana.



Fonte: ABREU et al., 2013.

A solubilização da quitosana ocorre em meio aquoso levemente ácido, sendo insolúvel em meios neutros e alcalinos, característica que influencia na aplicação da mesma, tendo em vista que parte das enzimas atuam de maneira mais efetiva em condições neutras (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007).

A quitosana tem chamado à atenção de vários países e sua exploração é crescente, tendo o Japão e os Estados Unidos como principais produtores e consumidores do mundo (DIAS et al., 2013).

#### 4.3.2 Aplicabilidade e formas de utilização da quitosana

A quitosana apresenta características as quais permitem sua utilização em diversas áreas como agricultura, biotecnologia, conservação e processamento de alimentos, tratamento de águas e efluentes e principalmente nas áreas de farmácia e da medicina (CAMPANA FILHO; SIGNINI; CARDOSO, 2007).

No campo alimentício a quitosana tem sido utilizada para elaboração de fibras dietéticas (DIAS et al., 2013) sendo utilizada também nos alimentos sob a forma de aditivo orgânico e embalagens ativas por meio da formação de biofilmes, atuando assim na conservação (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008). Em especial por expor ação bactericida e fungicida (DIAS et al., 2013) enquadrando-a como conservantes. De acordo com Fai, Stamford Thayza e Stamford Tânia (2008), a quitosana classifica-se como conservante por se enquadrar plenamente dentro do que é estabelecido pela legislação ao que diz respeito aos

conservante. Sendo considerado como um substituto natural dos aditivos químicos (MELO, 2014), aos quais são frequentemente atribuídos a uma possível ação tóxica. Diferentemente da quitosana que apresenta toxicidade inferior a compostos bem mais comuns, como a glicose, atestando assim sua segurança (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008).

Para fins de conservação de alimentos a quitosana vem sendo utilizada principalmente como filmes e revestimentos de produtos, em especial por apresentar ação antimicrobiana e por ser biocompatível (BENEVIDES et al., 2017). Bessa-Junior e Gonçalves (2013) salientam que o filme de quitosana destaca-se por suas propriedades bacterianas tornando-se um promissor revestimento alimentício.

As coberturas de quitosana aplicadas nos produtos vegetais visam à conservação e conseqüentemente aumentar a vida de prateleira (KUNIYOSHI, 2012). Araújo e Shirai (2016) destacam a efetividade da cobertura de quitosana quando aplicada em brócolis minimamente processado aumentando sua vida de prateleira, podendo ainda ser utilizada incorporada à massa do produto como proposto por Martins (2016), o qual obteve resultados positivos ao adicionar a quitosana a massa de mortadela.

As diversas formas de utilização da quitosana em diferentes setores permite identificar sua importância enquanto produto natural, em especial por poder ser obtida de produtos que poderiam ser descartados. A vasta aplicabilidade da quitosana lhe confere um lugar de destaque no setor industrial.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Período e Local de estudo**

O estudo foi desenvolvido no período de janeiro a novembro de 2017. Sendo realizada a elaboração do queijo no Laboratório de Técnica e Dietética e as análises microbiológicas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pernambuco - UFPE no Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão – CAV.

### **5.2 Materiais**

A quitosana, massa molar (MW) = 340.000g/mol, GD= >75%, foi obtida da empresa Sigma Aldrich® (Alto de Pinheiros, São Paulo, SP, Brasil), extraída da carapaça de crustáceo, de médio peso molecular.

Foi adquirido o leite pasteurizado Betânia®, o cloreto de cálcio da VETEC®, e o coalho líquido enzimático Ha-La da Cristian Hansen® para elaboração do queijo de coalho.

Adquiriu-se um queijo de coalho tipo B em um estabelecimento comercial na cidade de Vitória de Santo Antão - PE para avaliação da eficiência antibacteriana da quitosana como cobertura.

### **5.3 Elaboração dos géis de quitosana nas diferentes concentrações**

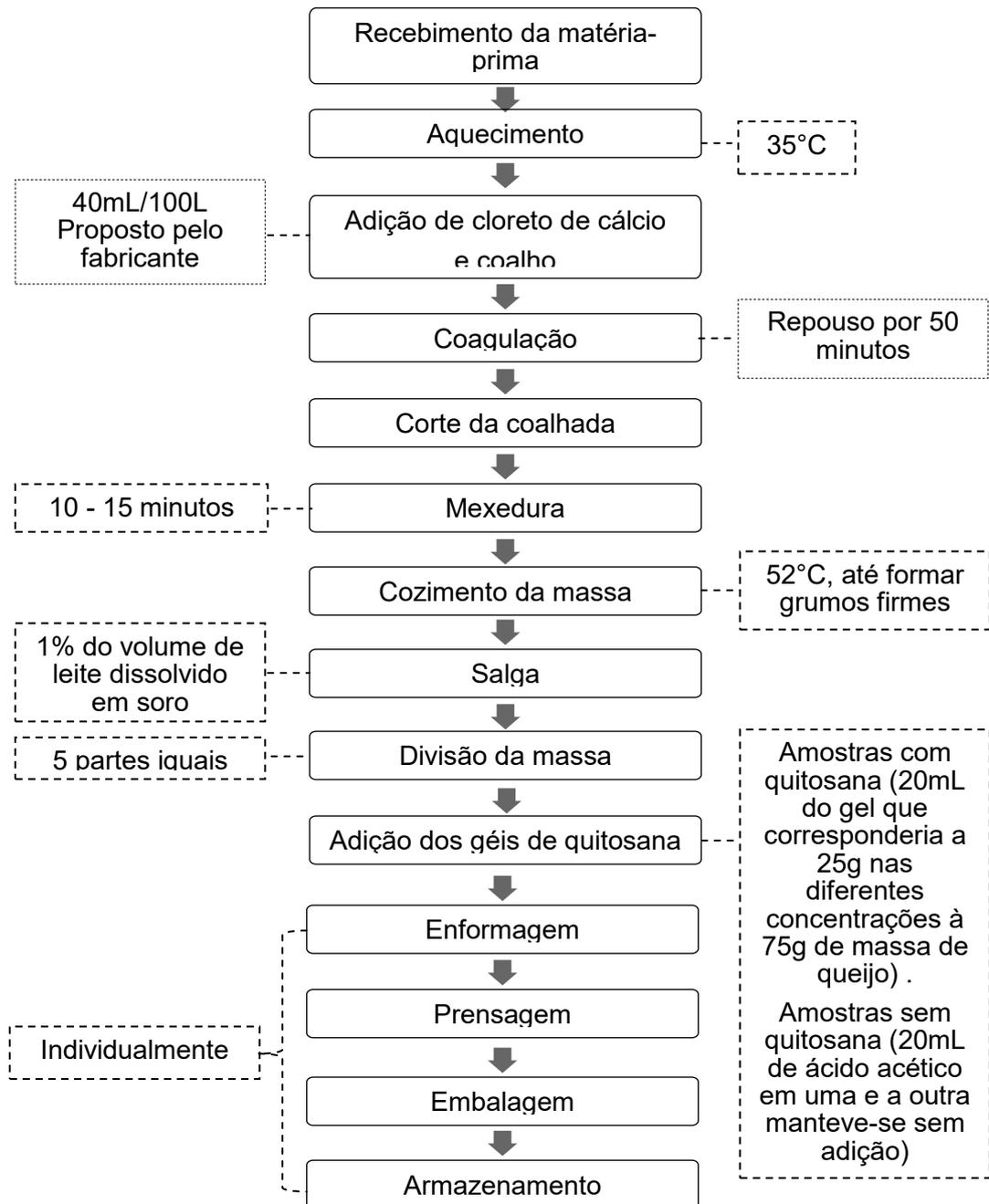
Os géis de quitosana foram preparados por dissolução do pó de quitosana em ácido acético a 1%, nas concentrações de 5 mg/mL, 10 mg/mL e 20 mg/mL para aplicação na massa do queijo na quantidade de 20 mL visando atingir as concentrações de 1 mg/g, 2 mg/g e 4 mg/g de quitosana no produto final e nas concentrações de 5 mg/mL, 10 e 15 mg/mL para aplicação como cobertura. Após dissolução parcial do pó os géis foram mantidos sob agitação moderada em agitador magnético durante 24 a 48 horas em temperatura ambiente, até a total dissolução do pó e obtenção do gel homogêneo.

A definição das concentrações e volume de quitosana a serem utilizadas no presente estudo, foi determinada tendo como base o descrito na literatura como sendo quantidades capazes de não ocasionar alterações ao produto oferecendo suas características antimicrobianas.

#### 5.4 Preparo do queijo de coalho com quitosana

O queijo de coalho foi elaborado de acordo com Nassu, Macedo e Lima (2006), com modificação por acrescentar a etapa de aplicação da quitosana (FIGURA 2). A opção pela elaboração do produto em laboratório decorreu da impossibilidade de aquisição de um produto comercial com tais aplicações.

**Figura 2:** Fluxograma da elaboração do queijo com aplicação da quitosana na massa e na cobertura.



Fonte: Adaptado de Nassu Macedo e Lima (2006) para aplicação da quitosana.

## 5.5 Aplicação da cobertura de quitosana

A aplicação da quitosana como cobertura foi realizada utilizando queijo comercial do tipo B, a fim de se garantir condições mais próximas da realidade, o qual foi aplicado os géis nas diferentes concentrações,

Para as amostras tratadas com cobertura de quitosana o queijo de coalho comercial foi cortado em cubos, com tamanho entre 1,5 a 2 cm de aresta e 25g. Os cubos de queijo foram individualmente imersos nos géis de quitosana de diferentes concentrações com o auxílio de pinça estéril e de um suporte metálico. Após escoamento do excesso as amostras foram transferidas assepticamente para recipientes de vidros estéreis com tampa plástica, e armazenadas em condições de refrigeração a 6-8°C.

## 5.6 Análise antimicrobiana

A inibição bacteriana da quitosana em amostras de queijo de coalho foi acompanhada através de contagem de células viáveis (curva de sobrevivência bacteriana) de mesófilos. Nestes ensaios foi observado o comportamento dos microrganismos frente à quitosana adicionada em massa e à cobertura comestível de quitosana nas concentrações a serem estudadas.

Amostras de queijo de coalho contendo quitosana (Q1, Q2, Q4, Q5, Q10 e Q15) e amostras controle sem quitosana (CTR e AC), foram mantidas sob refrigeração (6 a 8°C) até a realização dos testes microbiológicos realizados nos intervalos de 0, 4, 8, 12 e 16 dias pós-incubação. Para os testes o produto foi diluído seriadamente (1:9 v/v) em água peptonada 0,1% ( $10^{-1}$  –  $10^{-9}$ ) estéril e alíquotas de 100 µL das diluições semeadas pela técnica "Pour plate" em placa de Petri contendo meio PCA (Plate Count Ágar), as quais foram incubadas sob 35-37 C° por 24-48h. Amostras sem adição de quitosana na massa ou como cobertura e as que continham apenas ácido acético foram usadas como controle. Após a contagem do número de células viáveis, os resultados foram expressos em log de UFC/g, conforme IN nº 62/MAPA (Brasil, 2003).

## 6 RESULTADOS

Os resultados aqui apresentados são referentes à atuação da quitosana frente à inibição do crescimento de microrganismos mesófilos em amostras de queijo de coalho armazenadas por 16 dias. Os queijos utilizados para realização dos testes apresentaram diferentes concentrações de quitosana na massa (Q1=1mg/g; Q2= 2mg/g e Q4= 4mg/g) e na cobertura (Q5= 5mg/mL; Q10= 10mg/mL e Q15= 15mg/mL) havendo ainda o tratamento controle sem quitosana e contendo ácido acético (AC) e o controle sem quitosana e sem ácido acético (CTR).

### 6.1 Análise antimicrobiana da quitosana na massa de queijo de coalho sob a viabilidade de mesófilos

Os tratamentos Q1, Q2 e Q4 apresentaram maior redução na carga microbiana no 4º, 8º e 16º dia respectivamente (TABELA 1 e FIGURA 3). Sendo o Q4 o único tratamento que se manteve reduzindo a carga microbiana do início ao fim do período de incubação como pode ser observado nos valores expressos na tabela 1.

**Tabela 1:** Contagem dos microrganismos mesófilos sob a ação de quitosana em diferentes concentrações (1mg/g, 2mg/g; e 4mg/g) incorporada à massa do queijo de coalho por um período de 16 dias.

Tratamentos	Período de armazenamento (Dias)				
	0	4	8	12	16
<b>Q1</b>	$8,51 \times 10^5$	$2,29 \times 10^5$	$5,24 \times 10^5$	$3,38 \times 10^5$	$3,38 \times 10^5$
<b>Q2</b>	$1,07 \times 10^5$	$8,70 \times 10^4$	$7,58 \times 10^4$	$1,14 \times 10^5$	$1,86 \times 10^5$
<b>Q4</b>	$1,86 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$	$9,12 \times 10^4$	$9,33 \times 10^4$	$5,24 \times 10^4$
<b>AC</b>	$6,16 \times 10^5$	$6,91 \times 10^5$	$4,89 \times 10^5$	$3,54 \times 10^5$	$4,36 \times 10^5$
<b>CTR</b>	$1,23 \times 10^6$	$5,12 \times 10^5$	$3,23 \times 10^5$	$2,18 \times 10^5$	$4,16 \times 10^5$

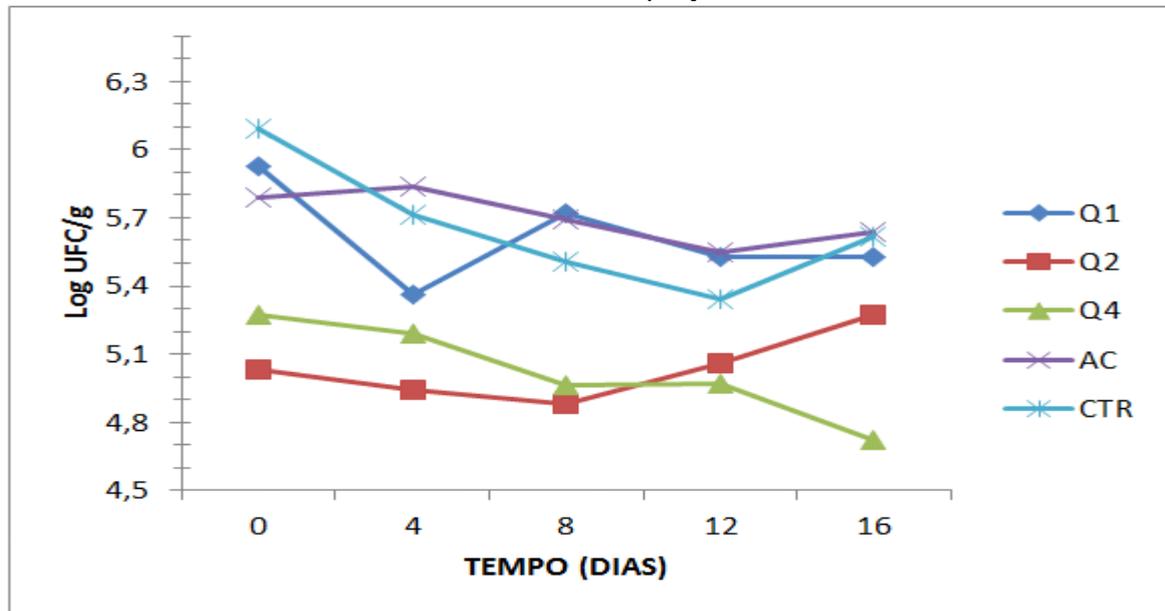
Fonte: LIMA, A.S., 2018.

Nota: Tabela elaborada com dados obtidos no estudo.

Q1= quitosana 1mg/g; Q2= quitosana 2mg/g; Q4= quitosana 4mg/g; AC= Ácido Acético; CTR= Controle. Resultados expressos em UFC/g.

Os tratamentos contendo quitosana (Q1, Q2 e Q4) exibiram comportamentos diferentes entre si durante todo período de incubação. Observou-se atenuações da carga microbiana nos tratamentos Q1 e Q4 com diferença entre os testes iniciais e finais (16 dias) de 0,4 e 0,55 log UFC/g, respectivamente. Ao que diz respeito ao tratamento Q2 não foi observada eficácia na redução da carga microbiana ao fim dos 16 dias de incubação (FIGURA 3).

**Figura 3:** Ação antimicrobiana da quitosana em diferentes concentrações sob a viabilidade de mesófilos na massa de queijo de coalho.



Fonte: LIMA, A.S., 2018.

Nota: Gráfico elaborado com dados obtidos no estudo.

Q1= quitosana 1mg/g; Q2= quitosana 2mg/g; Q4= quitosana 4mg/g; AC= Ácido Acético; CTR= Controle.

A quitosana incorporada à massa favoreceu diminuição do número de células viáveis já no momento inicial em relação ao controle, havendo reduções de 0,16; 1,06 e 0,82 log UFC/g para os tratamentos Q1, Q2 e Q4 respectivamente em relação ao CTR. Ao término do período de incubação (16 dias) os tratamentos Q1, Q2 e Q4 proporcionaram reduções de 0,09; 0,35; 0,9 log UFC/g respectivamente quando comparado ao CTR (FIGURA 3).

Ao que se refere ao tratamento AC o mesmo apresentou redução da taxa de crescimento microbiano apenas no momento inicial onde expos 0,3 log UFC/g de diferença em relação ao CTR, sendo a taxa restabelecida logo após, mantendo-se superior ao CTR até o tempo 16 onde se igualou (FIGURA 3).

## 6.2 Análise antimicrobiana da quitosana em cobertura de queijo de coalho sob a viabilidade de mesófilos

A quitosana mostrou efetividade já no momento inicial ao apresentar a redução de 0,69; 0,94 e 1,8 log UFC/g para os tratamentos Q5, Q10 e Q15 respectivamente em relação ao CTR. No 16º dia os tratamentos Q5, Q10 e Q15 reduziram 1,32; 1,46; 1,65 log UFC/g respectivamente quando comparado ao CTR (FIGURA 4).

Assim como na figura 4 os dados presentes na tabela 2 mostram que no intervalo entre os tempos 0 e 4 de incubação houve um aumento da taxa de crescimento microbiano em todos os tratamentos, sendo seguido por uma atenuação até o 8º dia onde voltou a aumentar lentamente. A taxa de crescimento do CRT se manteve superior a todos os demais durante os 16 dias (TABELA 2 e FIGURA 4).

**Tabela 2:** Contagem dos microrganismos mesófilos sob a ação de quitosana em diferentes concentrações (5mg/mL, 10mg/mL; e 15mg/m) utilizada como cobertura do queijo de coalho por um período de 16 dias.

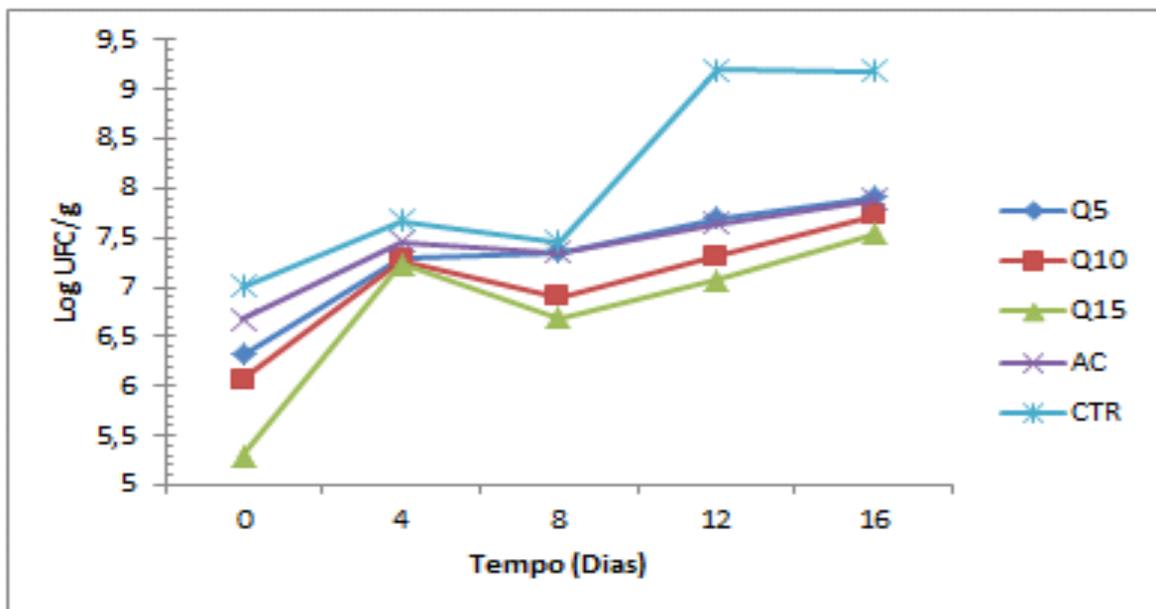
Tratamentos	Período de armazenamento (Dias)				
	0	4	8	12	16
<b>Q5</b>	$2,08 \times 10^6$	$1,99 \times 10^7$	$2,29 \times 10^7$	$5,01 \times 10^7$	$8,12 \times 10^7$
<b>Q10</b>	$1,17 \times 10^6$	$1,86 \times 10^7$	$7,94 \times 10^6$	$2,08 \times 10^7$	$5,37 \times 10^7$
<b>Q15</b>	$1,99 \times 10^5$	$1,69 \times 10^7$	$4,89 \times 10^6$	$1,17 \times 10^7$	$3,46 \times 10^7$
<b>AC</b>	$4,78 \times 10^6$	$2,88 \times 10^7$	$2,29 \times 10^7$	$4,46 \times 10^7$	$7,76 \times 10^7$
<b>CTR</b>	$1,02 \times 10^7$	$4,67 \times 10^7$	$2,88 \times 10^7$	$1,58 \times 10^9$	$1,54 \times 10^9$

Fonte: LIMA, A.S., 2018.

Nota: Tabela elaborada com dados obtidos no estudo.

Q5= quitosana 5mg/mL; Q10= quitosana 10mg/mL; Q15= quitosana 15mg/mL; AC= Ácido Acético; CTR= Controle. Resultados expressos em UFC/g.

**Figura 4:** Ação antimicrobiana da quitosana em diferentes concentrações sob a viabilidade de mesófilos em cobertura de queijo de coalho.



Fonte: LIMA, A.S., 2018.

Nota: Gráfico elaborado com dados obtidos no estudo.

Q5= quitosana 5mg/ml; Q10= quitosana 10mg/ml; Q15= quitosana 15mg/ml; AC= Ácido Acético; CTR= Controle.

No que diz respeito ao AC, o mesmo apresentou uma carga microbiana inferior ao CTR, sendo uma diferença de 0,33 log UFC/g no momento inicial e 1,3 log UFC/g ao fim dos 16 dias. Quanto ao comportamento do AC em relação aos tratamentos contendo quitosana (Q5, Q10 e Q15) este se manteve com taxa de crescimento superior do início ao fim do estudo (FIGURA 4).

No decorrer do experimento a presença da quitosana nas diferentes concentrações na cobertura do produto retardou o desenvolvimento microbiano mesmo estes expressando atividade, mantendo-os com taxas de crescimento inferior aos produtos utilizados como controle (AC e CTR).

## 7 DISCUSSÃO

Salienta-se que a escolha pelo estudo do grupo de mesófilos decorreu a partir da facilidade de contaminação dos queijos por tais microrganismos, o que se deve em especial as condições de processamento e comercialização. Alves et al., (2009) afirma que a comercialização dos queijos ocorre muitas vezes sem que haja refrigeração adequada, aumentando o risco de contaminação e diminuindo a qualidade do produto.

As contagens iniciais de mesófilos do queijo de coalho contendo quitosana em sua composição podem ter sido influenciadas pelas condições controladas de elaboração, onde se buscou aplicar as boas práticas de fabricação. Silva, Furtado e Vargas (2017), em seu estudo com queijo coalho pasteurizado destacou a importância da aplicação das BPFs mesmo quando a matéria-prima apresenta boa qualidade. A qualidade da matéria-prima quando se utilizou leite pasteurizado no processamento também pode ter influenciado as contagens iniciais. De acordo com Freitas, Travassos e Maciel (2013), o procedimento contribui para elaboração de um queijo com carga microbiana reduzida.

Do mesmo modo, a aquisição do queijo de coalho comercial pode ter influenciado as contagens iniciais mais elevadas para os testes com quitosana em cobertura, visto que não é possível garantir a existência das BPFs. A baixa qualidade do queijo de coalho comercializado em mercado público de Manaus encontrada por Silva, Furtado e Vargas (2017), apontou a existência de possíveis falhas em seu processamento. Salienta-se que, o queijo adquirido foi do tipo B, o que o torna mais susceptível a contaminação por considerar que a matéria-prima utilizada para este tipo de produto é o leite cru, o qual não é submetido a processamento térmico. Embora Evangelista-Barreto et al. (2016) afirmem que a obtenção de queijos de boa procedência depende da qualidade microbiológica do leite seja este pasteurizado ou não.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram o efeito antibacteriano da quitosana sobre os microrganismos mesófilos presentes no queijo de coalho, tanto quando adicionada na massa quanto como cobertura. Alguns autores descrevem que isto decorre da sua capacidade de formar uma barreira impedindo a aquisição de substâncias importantes para sobrevivência do microrganismo ou ainda

por atuar como quelante, tornando-as escassas para o microrganismo (MARICATO, 2010).

A efetividade da quitosana como agente antimicrobiano aplicado a um produto (Queijo de coalho) sob a forma de cobertura ou incorporado a sua massa encontrada no estudo consolida os achados de Silva (2014), que demonstrou a ação da mesma frente a microrganismos como *E.coli*, *Salmonella*, *L.monocytogenes* e *S.aureus* em seus ensaios *in vitro*.

A aplicação da quitosana na massa do queijo permitiu que os microrganismos apresentassem comportamentos distintos a depender da concentração utilizada. Nos tratamentos Q1(1mg/g) e Q2 (2mg/g) se verificou redução da taxa de crescimento apenas por um período, demonstrando uma reação dos mesmos frente ao efeito da quitosana (FIGURA 3). Enquanto que no tratamento Q4 (4mg/g) os microrganismos se mostraram constantemente afetados. Neste sentido, observa-se que quanto maior a concentração da quitosana na massa, maior é o efeito inibitório e conseqüentemente menor será o crescimento microbiano. O potencial antimicrobiano da quitosana quando aplicada à massa encontrado neste estudo com queijo de coalho pode ser observado em outros produtos e frente a gêneros específicos de microrganismos como foi evidenciado por Martins (2016) ao avaliar a inibição de *L.monocytogenes* em amostras de mortadela contendo quitosana na massa.

Ao que se refere à cobertura, todas as amostras analisadas exibiram contagens reduzidas já no momento inicial incluindo aquela de menor concentração (5mg/mL) (FIGURA 4), corroborando com Souza (2010) que já havia evidenciado a efetividade da quitosana como cobertura frente a *S.aureus* nos primeiros momentos de incubação quando aplicado em queijo Tipo Minas Frescal. No entanto, foi evidenciado redução dos efeitos nos momentos subsequentes, principalmente na menor concentração (5mg/mL). Isto também foi verificado nos achados de Oliveira (2015) onde demonstrou redução da efetividade da menor concentração de quitosana (5mg/mL) como cobertura ao decorrer do tempo frente a *L.monocytogenes* em seu estudo com queijo de coalho.

A cobertura de quitosana com maior concentração (15mg/mL) se expôs com maior efetividade sob os microrganismos mesófilos corroborando com Oliveira

(2015) que destacou a cobertura de quitosana de mesma concentração como sendo a mais eficaz na inibição de *L. monocytogenes* em queijo de coalho.

Apesar do ácido acético, ser utilizados muitas vezes pela indústria como conservante alimentar (COSTA, 2016) o comportamento observado no AC (FIGURA 3) permite descartar que não houve efeito do ácido acético na redução da carga microbiana mesófila, demonstrando não exercer efeito nos tratamentos contendo quitosana quando aplicada na massa, ratificando assim os achados de Silva (2014) onde afirmou que o ácido acético a 1% não exerce efeito sobre a redução de microrganismos com quitosana. Resultados que diferem do observado no teste como cobertura, pois o AC se expôs com comportamento semelhante aos tratamentos contendo quitosana e inferior ao controle evidenciando um possível efeito sobre os microrganismos sob tais condições.

A aplicação da quitosana tanto em cobertura como em massa não impediu o crescimento do grupo de microrganismo estudado, porém inibiu sua proliferação exacerbada mantendo-os abaixo dos valores obtidos nos tratamento sem quitosana.

## **8 CONCLUSÕES**

A quitosana exerceu efeito antimicrobiano sobre os microrganismos mesófilos presentes no queijo de coalho, mantendo-os com contagens inferiores quando comparado ao queijo convencional sem conservante.

As maiores concentrações de gel de quitosana utilizado exibiram maior efeito antimicrobiano frente ao grupo de mesófilos tanto como cobertura quanto aplicada na massa do queijo.

Ressalta-se a importância da utilização da quitosana em queijo de coalho devido sua comprovada ação antimicrobiana, além de ser um produto o qual não oferece risco a saúde do consumidor e ser de baixo custo viabilizando ainda mais sua utilização.

Sugere-se a realização de novos estudos com a quitosana aplicada ao queijo de coalho em especial frente a outros grupos de microrganismos, tendo em vista o potencial risco de contaminação envolvendo tal produto.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, F. O. M. S. et al. Propriedades e características da quitosana obtida a partir do exoesqueleto de caranguejo-uçá utilizando radiação de microondas. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, São Carlos, v. 23, n. 5, p. 630-635, 2013.
- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Crescimento da produção de queijo no Brasil**, 2015. Disponível em <[http://www.laticinio.net/noticias/completa/17885\\_-queijos-o-crescimento-daproducao-de-queijos-no-brasil-perdeu-folego-em-2015](http://www.laticinio.net/noticias/completa/17885_-queijos-o-crescimento-daproducao-de-queijos-no-brasil-perdeu-folego-em-2015)>. Acessado em: novembro de 2017.
- ABIQ. Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. **Evolução da produção mundial de leite**, 2017. Disponível em <[http://www.abiq.com.br/abiq\\_noticias\\_ler.asp?codigo=1796&codigo\\_categoria=6&codigo\\_subcategoria=6](http://www.abiq.com.br/abiq_noticias_ler.asp?codigo=1796&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6)>. Acessado em: fevereiro de 2018.
- ALMEIDA, S.L; PAIVA JÚNIOR, F. G; GUERRA, J.R. F; Representação da Produção e Consumo do Queijo Coalho Artesanal. **Revista interdisciplinar de gestão social**. Salvador, v.2, n.2, 2013.
- ALTARUGIO, L. M.; PEREIRA, E. B. Imobilização de lipase de candida rugosa em micropartículas de quitosana utilizando diferentes agentes ativadores. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetinga, v. 3, n. 1, 2016.
- ALVES, L. M. C. et al. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - MA. **Pesquisa em Foco**, São Luís, v. 17, n.2, p. 01-13, 2009.
- ARAÚJO, J. B. C. et al. 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, 2012.
- ARAÚJO, V. R.; SHIRAI, M. A. Aplicação de revestimento comestível de quitosana em brócolis minimamente processado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 34, n. 2, 2017.
- AUSTREGÉSILO NETO, J. **Práticas de gestão da qualidade na produção de queijo coalho: o caso de Pernambuco**. 2016. Dissertação (Mestrado em Administração e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2016.
- BENEVIDES, S. D. et al. Atividade antimicrobiana de filme e revestimento de quitosana incorporados de nisina sobre bactérias patogênicas. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento – Embrapa**. Fortaleza, n. 124, fev. 2017.
- BESSA-JUNIOR, A. P.; GONÇALVES, A. A. Análises econômica e produtiva da quitosana extraída do exoesqueleto de camarão. **Acta Fish. Aquat. Res.** Aracajú, v. 1, n. 1, p. 13-28. 2013.

- BERGER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polimeros**, [s.l.], v.12, n.4, p. 195-215, 2011.
- BIBLÍA SAGRADA. **Gêneses 18, 8**. Tradução da CNBB. ed. Canção Nova. 1ª ed. p. 320. São Paulo, 2011a.
- BIBLÍA SAGRADA. **1 Samuel 17, 18**. Tradução da CNBB. ed. Canção Nova. 1ª ed. p. 320. São Paulo, 2011b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 2017.
- CHAGAS, M. A. **O Queijo**. Poemas & Poemas, 2015. Disponível em: <<http://poemasnovacultura.blogspot.com.br/2015/04/o-queijo.html>>. Acessado em: Dezembro 2017.
- CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; CARDOSO, M. B. Propriedades e Aplicações de Quitosana. **Revista científica da Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange**. Goiânia, v.1, n.2, ano 1, 2007.
- CHALITA, M. A. N. et al. Algumas considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil. **Informações Econômicas**. São Paulo, v.39, n.6, jun. 2009.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Leite e Derivados**. Conjuntura mensal especial. Brasília-DF, 2017. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17\\_05\\_15\\_14\\_13\\_38\\_leite\\_abril\\_2017.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_05_15_14_13_38_leite_abril_2017.pdf)>. Acessado em: fevereiro 2018.
- COSTA, D. S. **Modelagem probabilística do crescimento de Listeria monocytogenes em função do efeito de pH, temperatura e tempo de estocagem**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. 2012. 79 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande, 2012.

DANTAS, D. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, Estado da Paraíba. **Revista ACSA - Agropecuária Científica no Semiárido**, Campina Grande, v. 9, n. 3, p. 110-118, 2013.

DIAS, K. B. et al. Chitin and chitosan: Characteristics, uses and production current perspectives. **Journal of Biotechnology. Biodiversity**. Amsterdam, v. 4, n.3, p. 184-191, 2013.

DORES, M. T. das et al. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from Artisan Minas cheese from the Serra da Canastra - MG, Brazil. **Food Science Technology**, Campinas, v. 33, n. 2, p. 271-275, 2013.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tipos de Microrganismos**. Agência de Informação de Embrapa – Agronegócio do Leite, 20\_. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_182\\_21720039246.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html)>. Acesso em: Dezembro de 2017.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. Fortaleza, v.10, n.1, p. 55 – 67, 2016.

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**, [s.l.], v.9, n.5, p.435-451, 2008.

FONSECA, B. C. P. da; REIS, J. N.; SANTOS, M. S. dos. Avaliação microbiológica de produtos lácteos comercializados na cidade de Vitória da Conquista – Bahia. **Revista Saúde.Com**. [s.l.], v. 12, n.2, p. 575-583, 2016.

FREITAS, W. C. de **Aspectos higiênico-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica de leite cru, queijo de coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba**, 2011. 91 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, João Pessoa, 2011.

FREITAS, W. C.; TRAVASSOS, A. E. R.; MACIEL, J. F. 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.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

GUERRA, A. F. **Microbiologia Geral: Fatores do crescimento microbiano**. Biossegurança em laboratórios de microbiologia. 1.ed. Valença, 2016. Disponível em: <[www.microbiologia-de-alimentos.com](http://www.microbiologia-de-alimentos.com)>. Acessado em: Dezembro de 2017.

KUNIYOSHI, N. J. La quitosana. **Revista de Química**. Lima, v. 26, n. 1-2. 2012.

- LIMA, K. O de. et al., Determinação de matéria gorda em queijo coalho (tipo A e B) comercializado no estado de Pernambuco. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**. Garanhuns-PE, v.7, n. 1, p. 94-98. 2017.
- MARICATO, E. S. O. **Desenvolvimento de filmes de quitosana insolúveis em meio ácido com actividade antioxidante**. 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica dos Alimentos) - Universidade de Aveio, Aveio, 2010.
- MARTINS, A. P. **Atividade bactericida de antimicrobianos naturais sobre *Listeria monocytogenes* inoculada em mortadela**. 2016. 163 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.
- MELO, M. R. P. de. **Bioconversão do exoesqueleto do camarão para elaboração de filme biodegradável a base de quitosana**. 2014. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.
- MENESES, R. B. de 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, p.381-392. 2012.
- MENEZES, S. de S. M.; SILVA, J. N. G. da; SANTOS, S. Queijo de coalho caseiro: a tradição como ativo territorial no município de Porto da Folha-DOI 10.5216/ag. v6i3. 21056. **Ateliê Geográfico**, Goiânia, v. 6, n. 3, p. 52-71, 2012.
- MENEZES, S. de S. M. Queijo de coalho-rei do balcão: expansão da produção alicerçada pela demanda dos migrantes sertanejos. **Revista Habitus**. Goiânia, v. 11, n.2, p. 143-158., 2013.
- MENEZES, S. de S. M. Sabores do Sertão ao Litoral: saberes e fazeres como estratégia de reprodução social e econômica de grupos familiares. **Revista Geografias**. Belo Horizonte, v. 11, n. 2., 2015.
- NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P.. **Queijo de coalho**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. (Agroindústria Familiar).
- OLIVEIRA, P. G. de. **Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes***. 2015. 121 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.
- PAGANI, A. A. C. et al. Aplicação de biopelículas em queijo de coalho. **Revista GEINTEC**. vol. 3, n.1, p. 41-47 São Cristovão. 2012.
- PAGNO, C. H. **Efeito da adição de nanoestruturas, óleos essenciais e quitosana no desenvolvimento de filmes e coberturas biodegradáveis com prioridades antioxidantes e antimicrobianas**. 2016. 182 p. Tese (Doutorado em Ciências e

Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

PAULA, J. C. J. de; CARVALHO, A. F. de; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga. **Revista Instituto Laticínios. “Cândido Tostes”**, Juiz de Fora, n. 367/368, 64: 19-25, 2009.

PERNAMBUCO. Secretaria Produção de Rural e Reforma Agrária. Resolução nº002, de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco**, Recife, 1999.

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

PORTO, B. C. et al. Determinantes de virulência em enterococcus endógenos de queijo artesanal. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 47, n. 1, p. 69, 2016.

SAEKI, E. K.; MATSUMOTO, L. S. Contagem de mesófilos e psicrotróficos em amostras de leite pasteurizado e uht. **Revista Instituto Laticínios. Cândido Tostes**, Juiz de Fora, nº 377, 65: 29-35, Nov/Dez 2010.

SEBRAE. **Queijos Nacionais- Leite e Derivados**. Estudo de Mercado Sebrae, 2016. Disponível em < <http://www.sebraemercados.com.br/mercado-de-producao-de-queijos-em-alta/>>. Acessado em: 30 nov. 2017.

SILVA, M. C. D. da et al. 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.

SILVA, L. P. da. **Avaliação da atividade antimicrobiana da N,N,N-trimetilquitosana e da quitosana comercial sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e de fungos filamentosos**. 2014. 83 p. Dissertação (Mestrado em Multidisciplinar) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

SILVA, S. A. da; FURTADO, S. C.; VARGAS, B. L. Avaliação microbiológica do queijo coalho produzido com leite pasteurizado sob refrigeração. **Revista Nanbiquara**. [s.l.], v.6, n.1, 2017.

SILVEIRA, J. G. **Investigação de Listeria sp. e microorganismos mesófilos totais em carcaças bovinas e em ambiente industrial de abatedouro**. p.65. Tese (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto alegre, 2010.

SOUSA, A.Z. B. de 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.

SOUZA, M. I. B. de. **Controle de Staphylococcus aureus em queijo Minas Frescal com uso de quitosana**. 2010. 35 p. Monografia (Nutrição). Universidade Federal de Pernambuco. 2010.

VIDAL-MARTINS, A. M. C.; ROSSI JUNIOR, O. D.; RESENDE-LAGO, N. C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do Bacillus cereus em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.3, p.396-400, 2005.