



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

**DAYANE DE MELO BARROS**

**Quitosana como cobertura e incorporada em queijo de  
coalho: influência na viabilidade de *Staphylococcus  
aureus* e no controle de qualidade**

Vitória de Santo Antão  
2017

**DAYANE DE MELO BARROS**

**Quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho: influência na viabilidade de *Staphylococcus aureus* e no controle de qualidade**

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 Humana e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Erilane de Castro Lima Machado

Coorientadora: Profa. Dra. Roberta Albuquerque Bento da Fonte

**Vitória de Santo Antão  
2017**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

B277q Barros, Dayane de Melo.

Quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho: influência na viabilidade de *Staphylococcus aureus* e no controle de qualidade / Dayane de Melo Barros. Vitória de Santo Antão, 2017.

71f.

Orientadora: Eriane de Castro Lima Machado.

Coorientadora: Roberta Albuquerque Bento da Fonte.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) . Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Queijo de coalho. 2. Saúde ambiental. 3. Queijo de coalho . Quitosana. 4. *Staphylococcus aureus* - Queijo de coalho. I. Machado, Eriane de Castro Lima (Orientador). II. Fonte, Roberta Albuquerque Bento da. III. Título.

637.3 CDD (23.ed.)

**BIBCAV/UFPE-077/2017**

**DAYANE DE MELO BARROS**

**QUITOSANA COMO COBERTURA E INCORPORADA EM QUELJO DE COALHO:  
INFLUÊNCIA NA VIABILIDADE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E NO CONTROLE  
DE QUALIDADE**

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

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 20/02/2017.

---

**Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Erilane de Castro Lima Machado**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

**BANCA EXAMINADORA:**

---

**Dr.<sup>a</sup> Noemia Pereira da Silva Santos**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Tânia Lúcia Montenegro Stamford**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

**Dr.<sup>a</sup> Thayza Christina Montenegro Stamford**  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho primeiramente Deus, por ser fundamental em minha vida, autor do meu destino, meu guia e amigo, que me proporciona a maior das maravilhas da natureza: a vida e com ela o saber.

A minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim, demonstrando fé e confiança ao longo desse período, além de demonstrarem expressivamente amor, carinho e compreensão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente- PPGSHMA do Centro Acadêmico de Vitória, às pessoas com as quais convivi ao longo da realização desta pesquisa, pois com elas, pude vivenciar a experiência de uma produção compartilhada, adquirindo conhecimentos proveitosos e de grande importância para o meu desempenho profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente agradeço a Deus, que permitiu com que tudo isso acontecesse, ao longo da minha vida, e não somente nesse período como mestranda, mas, em todos os momentos; o Senhor é o maior mestre que alguém pode vir a conhecer.

A minha família, mãe, Edijane, pai, Manoel, avó, Carminha e irmã, Danielle que fazem parte da base da minha vida, sinônimo de amor, dedicação e compreensão.

A minha orientadora Erilane Machado pela oportunidade, empenho dedicado e apoio na elaboração desta pesquisa.

A minha co-orientadora Roberta Bento pelo carinho e confiança disponibilizados além do grande incentivo para a realização e concretização deste estudo.

Aos meus amigos e colegas do curso de mestrado pela cumplicidade, ajuda e amizade.

Ao Centro Acadêmico de Vitória (CAV), seu corpo docente, técnicos dos laboratórios: Microbiologia dos Alimentos e Bromatologia, direção e administração por proporcionarem um ambiente ético, seguro e respeitável.

A CAPES, pelo suporte financeiro, o qual foi necessário para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram com suas iniciativas, opiniões e conhecimentos em favor do desenvolvimento deste trabalho, o meu muito obrigada!

Esta é a confiança que temos ao nos aproximarmos de Deus: se pedirmos alguma coisa de acordo com a sua vontade, ele nos ouve.

1 João 5:14

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	15
<b>1.1 Introdução</b> .....	15
<b>1.2 Objetivos</b> .....	17
1.2.1 Objetivo geral.....	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
<b>1.3 Revisão de Literatura</b> .....	18
1.3.1 Queijo de coalho.....	18
1.3.2 Importância nutricional, aspectos físico-químicos e sensoriais do queijo de coalho.....	20
1.3.3 Importância socioeconômica do queijo de coalho.....	21
1.3.4 Impacto do queijo de coalho na saúde pública.....	22
1.3.5 Qualidade, características microbiológicas e principais contaminantes do queijo de coalho.....	23
1.3.6 Caracterização de <i>Staphylococcus aureus</i> e contaminação em queijos.....	24
1.3.7 Quitosana e ação antimicrobiana.....	29
1.3.8 Utilização da quitosana como conservante natural em alimentos.....	32
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	35
<b>Efeito da quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho sob a viabilidade de <i>Staphylococcus aureus</i> e controle de qualidade</b>	
2.1 Resumo.....	36
2.2 Abstract.....	37
2.3 Introdução.....	37
2.4 Material e Métodos.....	39
2.5 Resultados e Discussão.....	45
2.6 Conclusões.....	60
2.7 Referências bibliográficas.....	61
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	67
<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b> .....	67
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69
<b>APÊNDICE A</b> .....	86

<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>88</b>
<b>APÊNDICE D.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>90</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Estrutura química da quitosana.....	30
Figura 2.1	Fluxograma do processamento do queijo de coalho.....	39
Figura 2.2	Curva de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo de coalho adicionado de quitosana como cobertura comestível em diferentes concentrações e armazenado durante 16 dias sob refrigeração.....	46
Figura 2.3	Curva de sobrevivência de <i>Staphylococcus aureus</i> em queijo de coalho com quitosana adicionada a massa do produto em diferentes concentrações e armazenado durante 16 dias sob refrigeração.....	47
Figura 2.4	Frequência do consumo de queijo de coalho.....	53
Figura 2.5	Motivo do consumo de queijo de coalho.....	54
Figura 2.6	Local de aquisição do queijo de coalho.....	55
Figura 2.7	Tipo de embalagem de aquisição do queijo de coalho.....	56
Figura 2.8	Teste de comparação pareada (preferência) dos queijos de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana.....	59
Figura 2.9	Teste em unidade percentual de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de quitosana na massa e como cobertura nas concentrações que obtiveram melhores resultados na atividade antibactericida frente à <i>Staphylococcus aureus</i> .....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Aspectos físico-químicos e sensoriais do queijo de coalho.....	20
Tabela 1.2	Relação de episódios de surto de intoxicação estafilocócica decorrente do consumo de queijos no Brasil, no período de 1993-2002.....	26
Tabela 1.3	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> em queijos fabricados no Brasil.....	27
Tabela 1.4	Fontes de quitosana.....	29
Tabela 1.5	Propriedades da quitosana.....	31
Tabela 2.1	Análise dos parâmetros físico-químicos do queijo de coalho.....	48
Tabela 2.2	Análises físico-químicas de queijo de coalho adicionado de quitosana na massa e como cobertura em diferentes concentrações e armazenado durante 20 dias sob refrigeração.....	50
Tabela 2.3	Análise microbiológica de controle de qualidade das amostras de queijo de coalho utilizadas para os testes sensoriais.....	52
Tabela 2.4	Média das notas atribuídas no teste de aceitação para queijos de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana.....	57
Tabela 2.5	Aceitabilidade do queijo de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana, por parâmetro avaliado.....	58

## LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
h	Hora
mL	Mililitro
°C	Grau Celsius
L	Microlitro
v/v	Volume por volume
UFC.ml <sup>-1</sup>	Unidade formadora de colônia por mililitro
nm	Nanômetro
cm <sup>3</sup>	Centímetro cúbico
®	Marca Registrada

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
aW	Atividade de água
BPFs	Boas Práticas de Fabricação
C	Amostra controle
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CA	Amostra controle com ácido acético a 1%
cm	Centímetro
DVAs	Doenças Veiculadas por Alimentos
GD	Grau de Desacetilação
IA	Índice de Aceitabilidade
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
KOH	Hidróxido de Potássio
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial de hidrogênio
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RTIQ	Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SIF	Selo de Inspeção Federal
SPRRA	Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária
T <sub>ç</sub>	Tratamentos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## RESUMO

O queijo de coalho é um produto lácteo típico da região Nordeste que comumente não dispõe de segurança sanitária, sendo referido como um veículo de *Staphylococcus aureus*. Objetivou-se com esse estudo avaliar a influência da quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho sob a viabilidade de *Staphylococcus aureus* e controle de qualidade. Para tanto, foram produzidos queijos de coalho com quitosana em cobertura e adicionada à massa nas concentrações 5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL e 1mg/g, 2mg/g e 4mg/g, respectivamente. Produtos sem quitosana (C) e com ácido acético 1% (CA) foram usados como controles. A capacidade de inibição bacteriana da quitosana foi avaliada comparando-se a contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em cada tratamento, no decorrer de cinco intervalos de tempo (0, 4, 8, 12 e 16 dias de armazenamento), com a contagem inicial e amostras controles. Avaliou-se o teor de umidade e gordura do produto elaborado. Análises sensoriais (teste de aceitação, comparação pareada e intenção de compra) e de estabilidade de prateleira (0, 10 e 20 dias de armazenamento) através de análises microbiológicas (indicadores de qualidade) e físico-químicas (pH, acidez e atividade de água) foram conduzidas com as amostras controles e tratadas com quitosana nas concentrações antibacterianas mais eficientes. As análises de perfil do consumidor e sensoriais foram realizadas com 100 consumidores. Verificou-se atividade antimicrobiana de quitosana como cobertura e adicionada à massa, de modo que as concentrações mais elevadas, 15mg/mL e 4mg/g, potencializaram a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, atingindo reduções de 3,04 Log UFC/g e 3,22 Log UFC/g na taxa de crescimento, respectivamente, quando comparados ao controle (C). O teor de umidade e gordura dos produtos atenderam aos padrões regulamentares. Quanto à estabilidade de prateleira, as amostras avaliadas atenderam os limites microbiológicos regulamentares e apresentaram alterações físico-químicas aceitáveis. No perfil do consumidor, verificou-se maiores frequências para consumo de queijo de coalho em duas ou mais vezes por semana, por hábito, comercializados em supermercados ou mercados, e embalados sem vácuo. Na aceitação sensorial, as notas corresponderam aos termos hedônicos entre gostei ligeiramente e gostei muitíssimo, verificando-se melhoria na textura dos produtos com quitosana incorporada. Valores de aceitabilidade foram maior que 70,00%, exceto no quesito sabor dos produtos com quitosana em cobertura, com 68,30%. Houve maior preferência para os produtos com quitosana incorporada. Na intenção de compra, mais de 50,00% dos provadores afirmaram comprar os produtos com quitosana. Conclui-se que a aplicação do biopolímero quitosana é uma alternativa favorável de viabilidade comercial e na conservação do queijo de coalho.

**Palavras-Chave:** Biopolímero, conservação, produto lácteo, viabilidade comercial.

## ABSTRACT

The coalho-type cheese is a dairy product typical of the Northeastern region that commonly lacks sanitary security and is referred to as a *Staphylococcus aureus* vehicle. The objective of this study was to evaluate the influence of chitosan as a coating and incorporated in coalho-type cheese under the viability of *Staphylococcus aureus* and quality control. For this purpose, coalho-type cheeses with chitosan were added to the dough at 5mg/mL, 10mg/mL and 15mg/mL and 1mg/g, 2mg/g and 4mg/g, respectively. Products without chitosan (C) and 1% acetic acid (CA) were used as controls. The ability of bacterial inhibition of chitosan was evaluated by comparing the viable cell count of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in each treatment over five time intervals (0, 4, 8, 12 and 16 days of storage) with the initial count and control samples. The moisture and fat content of the processed product was evaluated. Sensory analyzes (acceptance test, paired comparison and purchase intention) and shelf stability (0, 10 and 20 days of storage) were analyzed by microbiological (quality indicators) and physico-chemical analyzes (pH, acidity and water activity). Conducted with the control and chitosan treated samples at the most efficient antibacterial concentrations. The consumer profile and sensorial analyzes were performed with 100 consumers. Chitosan antimicrobial activity was observed as a coating and added to the mass, so that the higher concentrations, 15mg/mL and 4mg/g, potentiated the inhibition of *Staphylococcus aureus* growth, reaching reductions of 3.04 Log CFU/g and 3.22 Log CFU/g in the growth rate, respectively, when compared to the control (C). The moisture and fat content of the products met regulatory standards. Regarding shelf stability, the samples evaluated met the regulatory microbiological limits and presented acceptable physicochemical alterations. In the consumer profile, there were higher frequencies for rennet cheese consumption two or more times per week, per habit, marketed in supermarkets or markets, and packed without vacuum. In the sensorial acceptance, the notes corresponded to the hedonic terms between I liked it slightly and I liked it very much, being verified improvement in the texture of the products with incorporated chitosan. Acceptability values were higher than 70.00%, except in the taste aspect of products with chitosan in coverage, with 68.30%. There was a higher preference for products with incorporated chitosan. In the intention to buy, more than 50.00% of the tasters affirmed to buy the products with chitosan. It is concluded that the application of the chitosan biopolymer is a favorable alternative for commercial viability and the conservation of coalho-type cheese.

**Keywords:** Biopolymer, conservation, dairy product, commercial viability.

# CAPÍTULO 1

## 1.1 Introdução

O queijo de coalho é um dos produtos mais tradicionais comercializados no Nordeste brasileiro. Devido a sua popularidade é consumido amplamente pela população regional. Este alimento é considerado um componente alimentar cultural com produção passada de geração em geração, estando integrado ao dia-a-dia dos nordestinos além de representar uma importante fonte de renda familiar para os seus produtores (CAVALCANTE et al., 2007; MENEZES, 2011; ALMEIDA, PAIVA JÚNIOR e GUERRA, 2013).

A produção de queijo de coalho é principalmente realizada por médias e pequenas queijarias da agricultura de base familiar ou de propriedades rurais de menor porte, e é atribuído valor substancial a esta atividade no que diz respeito à esfera local socioeconômica (NASSU, MACEDO e LIMA, 2006; MENEZES, et al., 2012).

Apesar de ser parte do cotidiano da população local, o queijo de coalho ainda é visto como de baixa qualidade sob o ponto de vista microbiológico por não oferecer as condições higiênico-sanitárias adequadas para o consumo, isto se deve a implicações relacionadas à ausência de critérios para a seleção qualitativa da matéria-prima e a falta de conformidades no que se refere às técnicas de fabricação do produto (SILVA et al., 2010).

A maior parte da produção deste derivado lácteo (85%) é realizada com leite cru apesar de ser apresentado no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de queijo de coalho, que o leite deve ser submetido a processos mecânicos apropriados e tratamento térmico ou pasteurização. Devido a isso, matéria-prima utilizada para a produção do queijo não atende as normas de higiene vigentes (DANTAS, 2012). Quanto às técnicas de processamento, o queijo de coalho representa um produto de intensa manipulação no decorrer de sua fabricação sem as condições higiênicas necessárias, havendo falhas também quanto às condições sanitárias de transporte e armazenamento, tornando-se, um potente veículo de contaminantes, e conseqüentemente vulnerabiliza a sociedade a possíveis Doenças

Veiculadas por Alimentos- DVAs (RUWER, MOURA e GONÇALVES, 2011; DIAS et al., 2015).

Estudos indicam elevado número de infecções em indivíduos decorrente do consumo de queijos. Particularmente, a incidência de *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho é elevada e tem sido evidenciada em diversos estudos (BORGES et al., 2003; FEITOSA et al., 2003; LIMA, 2005; PINTADO et al., 2008).

Diante disso, o emprego de tecnologias inovadoras de conservação microbiológica, integradas às Boas Práticas de Fabricação (BPFs) é primordial relevância, visto que, podem promover a manutenção da qualidade de produtos processados além de melhorar a estabilidade de prateleira (FAI et al., 2008).

Nos últimos anos, a quitosana tem sido referenciada como um importante biopolímero a ser utilizado na conservação de alimentos, devido as suas características de ação microbiológica no combate a diversos grupos de microrganismos, tais como bactérias Gram-positivas (DUAN et al, 2007).

Ressalta-se que, quitosana tem sido utilizada de forma expansiva pela indústria de alimentos, sendo aplicada, por exemplo: como base na produção de suplementos nutricionais, estabilizantes para alimentos em conserva, emulsificantes, clarificantes de bebidas e fibras em biscoitos dietéticos (SHAHIDI et al., 1999; BORDERÍAS et al., 2005; BORGOGNI et al., 2006; LI et al., 2007), como conservante em molho de soja macarrão e sardinha (RODRÍGUEZ et al., 2002), salsicha e mortadela (DAMIAN, 2005; CHI et al., 2006), suco de acerola (ALBUQUERQUE e STAMFORD, 2011) e patê de carne (BENTO et al., 2011). Além disso, a eficiência antimicrobiana da quitosana vem sendo demonstrada em produtos lácteos considerados muito perecíveis, como queijos, melhorando a conservação e estabilidade de prateleira do alimento (ALTIERI et al., 2005; MEI et al., 2013; OLIVEIRA, 2015).

Desta forma, torna-se viável avançar em estudos visando avaliar o efeito antibacteriano da quitosana em gel adicionada ao alimento sob diferentes formas e em diferentes concentrações, sobretudo em um derivado lácteo de elevada perecibilidade.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência da quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho sob a viabilidade de *Staphylococcus aureus* e controle de qualidade.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficácia da quitosana em diferentes concentrações como cobertura e incorporada em queijo de coalho no controle de viabilidade de *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a estabilidade de prateleira do queijo de coalho com e sem quitosana quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos;
- Caracterizar o consumidor de queijo de coalho;
- Avaliar as características sensoriais e de aceitabilidade da quitosana como cobertura e incorporada na massa em queijo de coalho.

## 1.3 Revisão da Literatura

### 1.3.1 Queijo de coalho

O queijo é um dos alimentos mais antigos ao qual se têm registros (DANTAS, 2012). Apesar de, não haver certeza da data de sua origem, acredita-se que o queijo tenha surgido por algo em torno de 11.000 a.C. (SEBRAE, 2008). Ao longo do tempo observaram-se diversas interpretações embasadas na literatura a respeito da origem do queijo, que percorrem desde uma versão mitológica, a qual menciona a descoberta do queijo por parte de um dos filhos de Apolo, rei da cidade de Arcádia, até outra versão baseada no fato de que, como o leite apresentava uma elevada perecibilidade por conta da ausência de meios para conservá-lo e logo se transformava em coalho, foi despertada nos homens a ideia de criarem métodos para um melhor armazenamento desta matéria-prima (SEBRAE, 2008; ALBUQUERQUE, 2009).

No entanto, foi de uma maneira não intencional, que um nômade observou após armazenar o leite em um cantil (elaborado a partir de couro de estômago seco de carneiro) que havia acontecido à coagulação do leite. Independente de sua real origem observa-se que ao longo do tempo o queijo foi produzido como uma forma de preservação dos componentes nutritivos do leite (SEBRAE, 2008; ALBUQUERQUE, 2009).

No Brasil, o consumo de queijo iniciou-se com a chegada dos portugueses, que consumiam o produto lácteo em larga escala, tendo em vista, a ampla diversidade de tipos de queijo produzidos com leite de cabra, que era bastante requisitado pela população (CASCUDO, 2004).

Com o decorrer do tempo, novas medidas de conservação do queijo foram sendo desenvolvidas a fim de, suprir as demandas sociais e atender aos mais variados e exigentes paladares, o que resulta hoje em dia, numa diversidade de queijos difundidos no mercado mundial (BORGES et al, 2003; DANTAS, 2012).

Apesar de, ao longo dos anos, o queijo tem sido utilizado como um meio de preservação do leite e a fabricação ser semelhante para a grande maioria, existem diferenças na produção tanto na origem do leite quanto nos métodos de processamento empregados (ANDRADE, 2006).

De acordo com o SEBRAE (2008), dentre os diversos tipos de queijo comercializados no Brasil, o queijo de coalho recebe importante destaque, representando uma iguaria da culinária nordestina. Este derivado lácteo é de elevada

aceitação comercial, além disso, possui propriedades nutricionais significativamente relevantes e por agradar aos diversos paladares devido a seu sabor e consistência característicos, o queijo de coalho atualmente encontra-se como um dos mais importantes tipos de queijos vendidos no Brasil.

Conforme o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade da IN nº 30, de 26/06/2001, do Ministério da Agricultura, Pecuária Abastecimento (MAPA) entende-se por queijo coalho, o queijo que se obtém a partir da coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação+(BRASIL, 2001a).

O queijo de coalho é considerado um artefato cultural do Nordeste, sendo um dos mais produzidos e consumidos na região. A maior parte de sua produção é realizada nos estados do Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Paraíba (ALMEIDA, PAIVA JÚNIOR e GUERRA, 2013).

Embora a legislação em vigor (portaria nº 146 de 07 de março de 1996, do MAPA), determine que o leite utilizado para a produção de queijos deve ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico (BRASIL, 1996), a maioria do queijo de coalho fabricado no Nordeste é proveniente de produção artesanal, produzido com leite cru, uma vez que, a legislação do estado de Pernambuco, através da resolução nº 002 da Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária (SPRRA), em contraposição com a legislação federal admite a produção de queijo de coalho com leite *in natura*. Essa resolução classifica o queijo de coalho em tipo A- queijo produzido com leite pasteurizado, e tipo B- queijo produzido com leite cru (PERNAMBUCO, 1999).

O processo produtivo do queijo de coalho se baseia na aplicação de tecnologias variadas, no entanto, a maior parte é realizada em escalas de produção de médio e pequeno porte. Também há a fabricação artesanal que utiliza as técnicas tradicionais (PEREZ, 2005). Geralmente, as etapas de processamento do queijo de coalho são divididas do seguinte modo: Recepção do leite; Pasteurização; Adição do fermento, cloreto de cálcio e coalho; Coagulação; Corte da coalhada; Repouso; Primeira dessoragem; Aquecimento da massa; Segunda dessoragem; Salga; Enformagem/Prensagem; Maturação; Embalagem/Comercialização, porém, dificilmente estas etapas de produção são padronizadas (NASSU et al, 2001).

De acordo com o RTIQ (BRASIL, 2001a), as particularidades que podem distinguir as etapas de fabricação do queijo de coalho em relação às demais variedades de queijos são: coagulação (por volta de 40 minutos), corte, mexedura da massa, retirada do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto

(apenas até obter a massa semicozida ou cozida), adição de sal, prensagem, embalagem e estocagem (sob temperatura média de 10 a 12°C, durante 10 dias no máximo)

### 1.3.2 Importância nutricional, aspectos físico-químicos e sensoriais do queijo de coalho

A matéria- prima do queijo de coalho isto é, o leite de vaca é considerado o alimento mais completo, de alto valor biológico na alimentação humana (GUERREIRO et al., 2005). Faz parte da composição do leite: a água (87,3%) e os sólidos totais (12,7%), distribuídos da seguinte forma: proteínas totais (3,3 a 3,5%) gordura (3,5 a 3,8%) lactose (4,8), minerais (0,7%) e vitaminas (SGARBIERI, 2005).

O queijo, é um alimento rico em proteínas, geralmente possui todos os aminoácidos essenciais, gordura, sais minerais (cálcio e fósforo) e vitaminas (vitamina B<sub>2</sub> e vitamina A). Sob o ponto de vista nutricional, a concentração alta de nutrientes presentes no queijo de coalho supõe certa vantagem em relação ao leite, haja vista a quantidade de água ser mais elevada (SCOTT, 1991, PERRY, 2004).

Quanto ao padrão de identidade do queijo de coalho, a IN nº 30 (BRASIL, 2001a), estabelece aspectos físico-químicos e sensoriais (Tabela 1.1).

Tabela 1.1- Aspectos físico-químicos e sensoriais do queijo de coalho

<b>Parâmetros</b>	<b>Características</b>
Umidade	Média a alta umidade.
Consistência	Semidura, elástica.
Textura	Compacta, macia.
Massa	Cozida ou semicozida.
Cor	Branco amarelado uniforme.
Sabor	Brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado.
Odor	Ligeiramente ácido, lembrando massa coagulada.
Crosta	Fina, sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida.
Olhaduras	Algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras.
Formato e peso	Variáveis.
Teor de gordura nos sólidos totais	Entre 35 % e 60 %.

Fonte: BRASIL, 2001a.

Parâmetros físico-químicos de atividade de água (aW), pH e acidez do queijo de coalho não são determinados pela legislação específica, contudo devido a sua importância sobre produtos alimentícios, estes valores podem ser encontrados através da literatura (SOUSA et al., 2014).

Em alimentos, a *aW*, pH e acidez são parâmetros que estabelecem o tipo de degradação microbiana (RAHMAN et al., 2004). O queijo de coalho é um produto com elevado teor de umidade (BRASIL, 2001a). Conforme Freitas Filho e colaboradores (2009), a umidade é um fator de influência na atividade de água do queijo e nas atividades do metabolismo de microrganismos no decorrer da maturação do produto, facilitando seu crescimento devido a elevada quantidade de água livre susceptível para suas reações metabólicas levando a possíveis repercussões na textura, aroma, sabor e pH do laticínio, geralmente, a *aW* do queijo de coalho é considerada superior a 0,85 (ALZAMORA et al., 2003, ANDRADE, 2006; FREITAS FILHO et al., 2009; SOUZA et al, 2014).

O pH do queijo de coalho é considerado alto, apresentando valor superior a 4,5, caracterizando-o conseqüentemente como um produto alimentício pouco ácido (GAVA, 2009). O pH é uma parâmetro de relevância na caracterização de queijos, devido a sua interferência na ação microbiana, textura e maturação do produto, visto que, existem reações químicas que são catalisadas mediante a atividade de enzimas (dependentes do pH) remanescentes do coalho ou da microbiota (SOUZA et al., 2014).

Já a acidez corresponde a um indicador da atividade de microrganismos os quais degradam a lactose que é metabolizada a ácido láctico, este parâmetro possui influência no pH, desidratação da massa durante a produção do queijo e na etapa inicial da maturação, a acidez do queijo de coalho varia comumente entre 0,11 a 1,01 (FREITAS FILHO et al., 2009; PEREZ, 2005; VIDAL, 2011, SOUZA et al., 2014).

### **1.3.3 Importância socioeconômica do queijo de coalho**

A produção e comercialização do queijo de coalho são difundidas amplamente no Nordeste brasileiro principalmente na zona rural, apresentando um número expressivo de produtores de pequeno porte que realizam a produção deste tipo de queijo. Essa atividade é muitas vezes praticada como meio de subsistência desses comerciantes (NASSU, MACEDO e LIMA 2006).

Cerca de 90% da fabricação de queijo de coalho artesanal é realizada por agricultores familiares de modo que, esse tipo de produção, leva consigo, valores culturais, identitários e simbólicos próprios, na região Nordeste a produção de queijo movimentada a cada mês cerca de 10 milhões de reais. (PERRY, 2004; ARAÚJO et al., 2011).

Os agricultores familiares recebem incentivos do governo federal através de programas como PRONAF (Programa Nacional de Agricultura Familiar), PAA (Programa de Aquisição de Alimentos) e do SUASA (Sistema Unificado de Atenção à

Sanidade Agropecuária) que são importantes para o desenvolvimento rural, a fim de melhorarem a produção de alimentos como o queijo de coalho, garantindo segurança alimentar para a população e viabilidade de comercialização do produto no mercado formal (BRASIL, 2006, DANTAS, 2012; FERNANDES, 2013).

Estudos demonstraram que a fabricação e o comércio de vendas de queijos representam um empreendimento mais rentável que a comercialização de leite *in natura*, o que pode gerar uma melhora nos lucros dos leiteiros, demonstrando que esta atividade é de relevante importância no âmbito econômico e social (BRITO, 2005; LOPES e CARVALHO, 2006).

#### **1.3.4 Impacto do queijo de coalho na saúde pública**

A imagem apresentada pelo queijo de coalho ainda é muito associada a um alimento que não representa suficiente segurança microbiológica. Isto, também por deve-se a problemas atrelados à matéria-prima, a qual, muitas vezes é desprovida das condições de higienização adequadas além de serem evidenciadas diversas não conformidades no processo de fabricação, armazenamento, transporte e exposição do alimento, o que causa potencial comprometimento de sua qualidade microbiológica, predispondo-o à contaminação e podendo dessa forma, atuar como um veículo de transmissão de doenças de origem alimentar (DUARTE et al, 2005, PEIXOTO, PRAÇA e GÓIS, 2007; DANTAS, 2012 ).

De modo a exemplificar este risco, a Vigilância Epidemiológica da Paraíba (OPAS, 2009), entre os períodos de 2004 e 2008, verificaram 42 casos de surtos alimentares, envolvendo 481 enfermos do total de um grupo de pessoas expostas ao risco (1266 pessoas). Destes surtos, 23,8% estavam associados a queijos (cerca de 10 casos), acometendo 59 pessoas (12,26%) e expondo ao risco 184 pessoas (14,53%).

Outro estudo realizado com 104 amostras de queijo de coalho comercializadas em seis estados da região Nordeste (Pernambuco, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba), onde 54 amostras eram não inspecionadas e 50 amostras possuíam inspeção fiscal, verificou-se que todos os queijos analisados apresentavam-se fora das normas microbiológicas exigidas pela legislação vigente. Estes dados demonstram que o queijo de coalho é muito susceptível a contaminação, caso não sejam realizados os procedimentos operacionais e técnicos necessários para a fabricação deste produto (SOUSA et al., 2014).

### **1.3.5 Qualidade, características microbiológicas e principais contaminantes do queijo de coalho**

A produção de queijo requer leite de qualidade, ou seja, leite que não comprometa a segurança microbiológica para o consumo (SALINAS, 2002). A qualidade do leite é determinada por parâmetros associados à composição química, atributos físico-químicos e condições de higiene. Os constituintes nutricionais do leite (proteína, gordura, lactose, sais minerais e vitaminas), definem a qualidade da composição e as condições de higiene que são determinadas pela presença de microrganismos indicadores de qualidade, que não fazem parte da composição natural do leite (DANTAS, 2012).

Dessa forma, a qualidade do queijo de coalho está associada de forma direta com a qualidade de sua matéria-prima. Apesar, de constar no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijos (Portaria DAS/MA de 07/03/1996) a admissão da produção sem tratamento térmico prévio apenas quando o produto passar por uma etapa de maturação equivalente a 60 dias no mínimo, a maior parte da produção de queijo de coalho, cerca de 85% é realizada, com leite de vaca cru sem a realização dos requisitos exigidos. Além disso, tratando-se de um alimento de intensa manipulação, a produção deste laticínio ocorre muitas vezes sem os cuidados higiênicos necessários, comprometendo assim a qualidade do produto final (BRASIL, 1996; GOMES et al., 2011; RUWER, MOURA e GONÇALVES, 2011; DANTAS, 2012; FREITAS, TRAVASSOS e MACIEL 2013).

Estas condições inadequadas envolvendo o processo de fabricação do queijo de coalho atribuem-se ao fato de que a maior parte da produção deste laticínio é realizada em Agricultura de Base Familiar ou queijarias de médio e pequeno porte, formadas por produtores que demonstram resistência às novas técnicas de produção de alimentos, haja vista, optarem por continuar transmitindo a maneira de produção herdada dos seus antepassados, viabilizando ainda mais, a vulnerabilidade deste alimento a contaminantes microbiológicos. (PEREZ, 2005; NASSU, MACEDO e LIMA, 2006; FREITAS FILHO et al., 2009; MENEZES, SILVA e SAMUEL, 2012; DANTAS, 2012).

Portanto, a característica da matéria-prima, associada a inadequações no processo de fabricação do queijo de coalho, o torna um alimento de pouca segurança microbiológica e baixo padrão de qualidade, podendo realmente causar riscos de doenças alimentares, pois, a contaminação microbiana influencia de forma direta na qualidade dos alimentos (FEITOSA et al., 2003; ALMEIDA, PAIVA JÚNIOR e GUERRA, 2013).

Estudos a respeito da qualidade microbiológica do queijo de coalho indicam que os microrganismos patogênicos encontrados com maior prevalência são: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella ssp.*, e coliformes termotolerantes (FEITOSA et al., 2003; DUARTE, ET AL., 2005; OLIVEIRA et al., 2010). As fontes relacionadas ao surgimento destas bactérias geralmente são leite cru, leite pasteurizado de forma inadequada ou o próprio queijo contaminado pós-pasteurização com microrganismos oriundos do leite cru ou do ambiente de produção (PINTADO et al., 2008, BORGES et al., 2008a).

No estado do Rio Grande do Norte, 11 amostras de queijo de coalho foram analisadas para verificar a ocorrência de possível contaminação no alimento e constatou-se que 9% das amostras foram positivas para *Salmonella spp.* (FEITOSA et al., 2003). Outro estudo realizado com 127 amostras de queijo de coalho coletadas em 21 municípios do estado de Pernambuco, demonstraram a presença de *Salmonella spp.* em 5,5% das amostras além de coliformes termotolerantes em 44,1% das amostras encontrados em contagens acima de  $5,0 \times 10^2$  UFC/g, limite preconizado pela legislação (DUARTE et al., 2005; BRASIL, 2001b). Na capital de Recife, foram coletadas 42 amostras de queijo de coalho em 4 regionais do município do Cabo de Santo Agostinho a fim de, verificar a qualidade microbiológica do laticínio, os dados obtidos, revelaram que 9,52% das amostras foram positivas para *Salmonella spp.* e 80,95% das amostras estavam fora dos limites estabelecidos para coliformes termotolerantes (OLIVEIRA et al., 2010).

Diversos estudos, cada vez mais vêm destacando a presença do patógeno *Staphylococcus aureus* em queijos quando o compara a outros microrganismos de também de elevada incidência em laticínios, tendo em vista isso, o *S. aureus*, recebe importante atenção, uma vez que, é responsável por números elevados de surtos e casos esporádicos de intoxicação alimentar decorrentes de derivados do leite contaminados por enterotoxina estafilocócica (BUYSER et al., 2001; LECLERC et al., 2002; CARMO et al., 2002).

### **1.3.6 Caracterização de *Staphylococcus aureus* e contaminação em queijos**

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa de formato esférico, que possui temperatura de desenvolvimento na faixa de 7 a 48,5°C, com temperatura ótima entre 35 e 37°C. Esta bactéria pode desenvolver-se em pH de 4,0 a 9,8, sendo o pH ótimo para seu desenvolvimento, entre 6,0 e 7,0 (FRAZIER e WESTHOFF, 2000; LUZ, 2008), possui 0,86 como valor mínimo de atividade de água (aW), embora já tenha sido descrito o crescimento desse

microrganismo em alimentos com 0,83 de aW de água (WONG e BERGDOLL, 2002; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

A diferenciação do *S. aureus* em relação a outras espécies do gênero ocorre através da realização do teste de coagulase, no qual a enzima (coagulase) é produzida por esta bactéria levando a coagulação do plasma, (TORTORA, FUNKE e CASE, 2000; QUINN et al., 2005), segundo Germano e Germano (2011), no âmbito da vigilância sanitária de alimentos, o *S. aureus* representa um dos agentes etiológicos que mais causam toxinfecção em indivíduos através de contaminação em alimentos.

O *S. aureus* está presente no ar atmosférico, água, poeira, esgoto, equipamentos de processamento de alimentos e nos próprios alimentos. Além disso, o *S. aureus* pertence à microbiota normal dos animais e seres humanos (pele, cabelo, vias nasais e garganta, podendo alcançar outras regiões da pele e das mucosas, caso as barreiras naturais (ou seja, pele e mucosas) estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, esta bactéria pode se alojar-se no tecido e provocar uma lesão local (FORSYTHE, 2002; ROBERT e CHAMBERS, 2005; VELÁZQUEZ-MEZA et al, 2005; SANTOS et al., 2007).

Devido às abrangências de hábitat, este microrganismo encontra-se de forma expressiva na natureza. Os portadores de *S. aureus* (a maior parte, portadores assintomáticos) ao manipularem alimentos podem tornar-se importante fonte de contaminação para os alimentos. Considera-se que de 20% a 60 % da população humana possa portar o *S. aureus*, sem possuir nenhum tipo de doença. Nestas situações, apesar de apresentarem condições normais de saúde, os portadores dessa bactéria, oferecem riscos ao entrar em contato com alimentos durante as diversas fases de preparação do alimento, através das mãos e secreções oro-nasais (BALABAN; RASOOLY, 2000; GERMANO e GERMANO, 2011; FRANCO e LANDGRAF, 2005).

Os alimentos comumente associados a intoxicações estafilocócicas são os que possuem alto teor de umidade e elevado percentual de proteínas, tais como, carnes, derivados de bovinos, de aves, além de leites e derivados. Particularmente, sua transmissão em derivados lácteos ocorre através de leite contaminado, oriundo de animais com mastite e da falta de boas práticas de manipulação (FORSYTHE, 2002; GERMANO e GERMANO, 2011; ASSUMPÇÃO et al., 2003; CAVALCANTE et al., 2007; SANTANA et al., 2008).

Diante disso, é de suma importância a realização de treinamento (capacitação para adotar medidas adequadas de higiene pessoal, equipamentos, utensílios e instalações) com os manipuladores a fim de, prevenir a contaminação de alimentos durante as etapas de preparo (GERMANO e GERMANO, 2011).

Salienta-se que, a intoxicação alimentar causada por *S. aureus*, ocorre através da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (ES) produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento (LOIR, BARON e GAUTIER, 2003). As ES são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e possuem resistência à atividade de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, mantendo-se ativas após a ingestão, além disso, possui termoestabilidade, podendo resistir a tratamentos térmicos tais como a pasteurização e a ultrapasteurização. O número de ES ampliou-se devido à identificação de novos genes e, já foram identificados 18 tipos distintos, mas com semelhanças na estrutura e sequência. As de maior ocorrência são SEA, SEB, SEC<sub>1, 2, 3</sub>, SED e SEE, e as 13 demais foram detectadas (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER E SEU) com descrição dos seus genes (BLAIOTTA et al., 2004; OMOE et al., 2005).

Dentre as Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), a intoxicação estafilocócica é considerada, a causa mais constante de surtos alimentares em diversos países. Tanto os surtos alimentares quanto eventuais episódios de intoxicação alimentar têm sido relacionados ao consumo de derivados lácteos, predominando em queijos (CARMO et al., 2002; BORGES et al., 2008b). Os surtos de intoxicação alimentar provocados por *S. aureus* averiguados no Brasil (Tabela 1.2) foram atribuídos principalmente ao consumo de queijos do tipo Minas frescal, Minas e coalho contaminados por esta bactéria (CARMO et al., 2002; OMOE et al., 2005; BORGES et al., 2008b; OLIVEIRA et al., 2010; FONTE, 2012; FREITAS, TRAVASSOS e MACIEL 2013; SOUSA et al., 2014).

Tabela 1.2- Relação de episódios de surto de intoxicação estafilocócica decorrente do consumo de queijos no Brasil, no período de 1993-2002

Estado	Cidade	Veículo de contaminação	Agente etiológico	Número de pessoas envolvidas
Minas Gerais	Belo Horizonte	Queijo	<i>S. aureus</i>	03
Minas Gerais	Belo Horizonte	Queijo	<i>S. aureus</i>	08
Minas Gerais	Belo Horizonte	Queijo	<i>S. aureus</i>	03
Paraná	Arapongas	Queijo colonial		07
Paraná	Curitiba	Queijo	<i>S. aureus</i>	03
Paraná	Curitiba	Queijo	<i>S. aureus</i>	04
Paraná	Curitiba	Queijo	<i>S. aureus</i>	04
Paraná	Paulo Frontin	Queijo	<i>S. aureus</i>	05
Rio Grande do Sul	Viamão	Queijo	<i>S. aureus</i>	04
Rio Grande do Sul	Rio Grande	Queijo	<i>S. aureus</i>	12
Rio Grande do Sul	Caxias do Sul	Queijo	<i>S. aureus</i>	08
Paraná	Quedas do Iguaçu	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	04
Ceará	Itapajé	Queijo	<i>S. aureus</i>	07

Rio Grande do Sul	Porto Alegre	Queijo colonial	<i>S. aureus</i>	03
Ceará	Fortaleza	Queijo	<i>S. aureus</i>	07
Amazonas	Autazes	Queijo	<i>S. aureus</i>	04

Fonte: Adaptado de Borges et al., (2008b).

Estudos realizados com diferentes queijos nacionais (Tabela 1.3) também evidenciaram o risco potencial desse alimento para a saúde do consumidor, visto que, foram encontradas altas contagens de *S. aureus* nos produtos analisados (MACHADO et al., 2011).

Tabela 1.3- Contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijos fabricados no Brasil

Tipos de queijos	Número de amostras	Amostras positivas (%)	Média da contagem (log UFC/g)	Referências
Minas frescal	30	97	4,48	Loguercio; Aleixo (2001)
	80	50	5,86	Almeida; Nader (2000)
	93	7,5	2,85	Carvalho et al. (2007)
Prato	20	50	4,28	Salvador et al. (2001)
Canastra	10	70	5,93	Borelli et al. (2006)
	56	62,5	5,76	Santos et al. (1995)
Coalho artesanal	50	NI <sup>(1)</sup>	6,31	Benevides et al. (2000)
	43	93	5,59	Borges et al. (2003)
	11	73	6,48	Feitosa et al. (2003)
	219	78	6,37	Machado et al.; (2011)
Coalho industrial	50	NI	4,46	Benevides et al. (2000)
	127	35	4,09	Machado et al.; (2011)

(1) NI: Não Informado.

Fonte: MACHADO et al., (2011).

Dessa maneira a incidência de *S. aureus* em queijos é consideravelmente alta e tem sido demonstrada por meio de estudos que investigam a qualidade microbiológica de produtos lácteos (SENA, 2000; BOARI et al., 2002, LIMA, 2005, FREITAS, 2005; KOMATSU et al., 2010).

Amostras de queijo de coalho comercializados em Recife-Pernambuco apresentaram alto índice de contaminação, pois, das 107 amostras analisadas, 98,1% encontraram-se contaminadas por *Staphylococcus sp.*, com valor médio de  $10^6$  UFC/g produto, além disso foi realizado o isolamento das 637 cepas. Foram identificadas 377

cepas das quais aproximadamente 219 eram *Staphylococcus aureus* (58%) evidenciando risco potencial deste queijo para a saúde do consumidor (SENA, 2000).

Boari et al., (2002), analisaram a presença de cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* em 18 amostras de queijos maturados de vários tipos comercializados em Lavras-MG e comprovaram que das 43 colônias atípicas isoladas 28 (65,1%) eram estafilococos produtores de coagulase e 10 (23,3%) foram identificadas como *Staphylococcus aureus*.

Lima (2005), também evidenciou alto nível de contaminação por *Staphylococcus sp.*, em queijos de coalho artesanal e industrial, comercializados em diversos pontos de venda no estado do Ceará, o estudo do referido autor constatou que de um total de 80 amostras, 98,75% (79 amostras) apresentaram contaminação por *Staphylococcus sp.* com contagens  $>10^4$  UFC/g e 53,75% por *Staphylococcus coagulase positiva*, classificando os queijos avaliados como impróprios para o consumo humano.

Freitas (2005) pesquisou a presença de *Staphylococcus coagulase positiva*, isolados de queijos minas frescal de algumas regiões do Rio de Janeiro e constatou que das 30 amostras avaliadas, 12 (40%) revelaram contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* acima de  $5 \times 10^2$  UFC/g, valor preconizado pela legislação para este laticínio.

Kmotasu et al., (2010), averiguaram que das 50 amostras de queijo minas frescal artesanal comercializados na cidade de Uberlândia-MG, 44 (88%) estavam acima do recomendado para *Staphylococcus coagulase positiva*, indicando que estes queijos representavam potencial risco a saúde do consumidor.

Diante deste contexto, ao longo dos últimos anos, os produtores de alimentos tem enfrentado o desafio de cumprir com as normas legais que visam assegurar a inocuidade alimentar, além de buscarem satisfazer às exigências dos consumidores cuidadosos com a saúde e conhecedores dos possíveis impactos danosos de aditivos químicos utilizados para a manutenção e conservação de gêneros alimentares (MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011).

A fim de, atender a demanda para a manutenção das características nutricionais e de qualidade microbiológica do alimento, a procura por conservantes naturais de aplicação em alimentos tem se tornado cada vez maior. Contudo, a seleção do antimicrobiano deve ser baseada em uma boa compatibilidade química e sensorial do composto com o alimento alvo, além de possuir eficácia no combate a microrganismos patogênicos e deteriorantes, garantindo a segurança e qualidade do produto alimentar (SETTANNI e CORSETTI, 2008).

Para a conservação, aumento da vida útil e segurança dos alimentos, compostos de origem animal tem sido estudados para serem utilizados em alimentos, dentre os compostos naturais, a quitosana, polissacarídeo resultante da desacetilação da quitina, vem destacando-se devido às características que possui tais como: abundância na natureza, facilidade de obtenção e bioatividade antimicrobiana frente a diversos microrganismos patogênicos (AZEVEDO et al., 2007; FAI, STAMFORD e STAMFORD, 2008; ALBUQUERQUE et al., 2009; MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011).

### 1.3.7 Quitosana e ação antimicrobiana

A quitosana é um biopolímero resultante do processo de desacetilação da quitina, esta por sua vez, é considerada o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza (Tabela 1.4), depois da celulose, sendo principal componente da constituição do exoesqueleto de crustáceos principalmente, caranguejos, lagosta e camarão e insetos, está presente também na formação de nematoides e parede celular de fungos e leveduras (KUBOTA et al., 2000; KUMAR, 2000; SINGLA e CHAWLA, 2001; MUZZARELLI et al., 2012).

Tabela 1.4- Fontes de quitosana

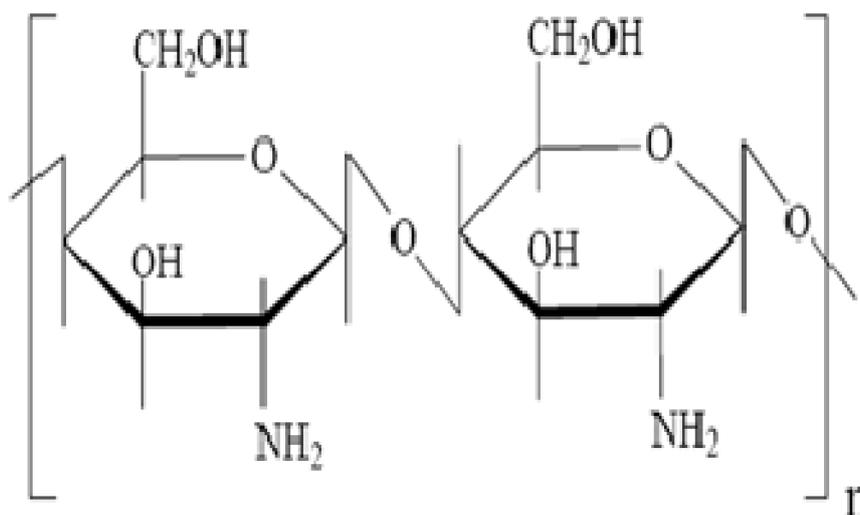
<b>Animais marinhos</b>	Anelídios, moluscos, celenterados, caranguejo, lagosta, camarão e <del>milrã</del> .
<b>Insetos</b>	Besouros, formigas, escorpiões e aranhas.
<b>Microrganismos</b>	Algas verdes, leveduras, esporos, algas Marrons e fungos.

Fonte: OLIVEIRA, 2004.

A quitosana foi isolada pela primeira vez no final da década de 50, através do aquecimento da quitina em solução concentrada de Hidróxido de Potássio (KOH), resultando na sua desacetilação (DAMIAN et al., 2005). Para a obtenção da quitosana, a desacetilação da quitina pode ocorrer por processos químicos ou enzimáticos, contudo, os processos enzimáticos não são aplicados em escala industrial, devido tanto aos custos altos de extração das desacetilases, quanto, a sua baixa produtividade. Já, os processos químicos podem ser realizados pela via homogênea, que ocorre com a utilização de soluções concentradas de álcali, ou heterogênea, processo que emprega altas temperaturas e soluções concentradas de hidróxido de sódio (NaOH), sendo este o método mais extensivamente usado para a obtenção de quitosana (CAMPANA e DESIBRIÈRES, 2000; CAMPANA-FILHO, 2007; CARDOSO, 2008; VEIGA, 2011).

A eficiência da desacetilação da quitina é influenciada por alguns fatores tais como: concentração da solução alcalina e adição de diluente (empregam-se cetona e álcoois de cadeia curta), temperatura e tempo de reação, tamanho das partículas de quitina, razão quitina/solução alcalina, atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização do composto (CAMPANA-FILHO e SIGNINI, 2001). A quitosana (Figura 1.1) é constituída em sua maior parte por unidades de 2-amino-2-desoxi-D-glicose unidas através de ligações glicosídicas do tipo beta-1,4 (SANTOS, 2004).

Figura 1.1 - Estrutura química da quitosana



Fonte: SANTOS, 2004.

A quitosana é formada por cadeia linear, catiônica com a protonação do grupamento amino ( $\text{NH}_3^+$ ). Sua diferenciação em relação à quitina dá-se em termos de solubilidade e proporção dos grupos aminos. Quanto à solubilidade, a quitosana é solúvel em solução aquosa diluída por diversos ácidos, sendo os mais utilizados, o ácido acético e o ácido clorídrico, por outro lado a quitina não apresenta solubilidade nesses meios sendo dissolvida em poucos sistemas solventes. Em relação aos grupamentos amino, a quitosana possui esses grupamentos livres potencializando a sua capacidade de reagir com diversas moléculas, o que a torna, o biopolímero com maior disponibilidade de grupos pendentos (VARMA, DESHPANDE e KENNEDY, 2004, MOURA, 2005; AIROLDI, 2008).

Dentre os antimicrobianos naturais, a quitosana tem despertado interesse da comunidade científica, visto que, dispõe de propriedades importantes (Tabela 1.5), as quais permitem o aumento do seu potencial biotecnológico e aplicações no mercado

industrial (TONHI e PEPLIS, 2002; SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003; THARANATHAN e KITTUR, 2003; CAMPANA-FILHO et al., 2007; SINGH et al., 2008, DĀYALA et al., 2008; SINGH, VESENTIN e SINGH, 2008; ALBUQUERQUE et al., 2009; LARANJEIRA e FÁVÉRE, 2009; DASH et al., 2011).

Tabela 1.5- Propriedades da quitosana

<b>Qitosana</b>	
<b>Propriedades</b>	Bioatividade; Biodegradabilidade; Biocompatibilidade; Permeabilidade seletiva; Hidrofilicidade; Versatilidade de preparação (géis, filmes, membranas, microesferas, flocos, nanopartículas e soluções de viscosidade controlada); Habilidade de quelação; Baixa toxicidade a seres humanos e animais; Atividade antimicrobiana.

Dentre as principais atividades da quitosana destaca-se sua capacidade antimicrobiana o que a diferencia de outros polissacarídeos naturais. O mecanismo de ação da quitosana frente aos microrganismos não está completamente definido, no entanto, sabe-se que sua ação é influenciada por fatores intrínsecos como grau de desacetilação e extrínsecos tais como: nutrientes, substratos químicos e condições do meio ambiente (COSTA, SANTOS e FERREIRA, 2006).

Alguns pesquisadores associam a ação antimicrobiana da quitosana à formação de complexos polieletrólíticos, pois, seus grupamentos amínicos protonados ligam-se de forma seletiva a superfície celular dos microrganismos, carregados negativamente ocasionando conseqüentemente a perda de componentes intracelulares e, por conseguinte inibindo o crescimento microbiano (YADAV E BHISE, 2004, AVADI et al., 2004, TSAI e HWANG, 2004, BAUTISTA-BAÑOS, HERNÁNDEZ-LÓPEZ e BOSQUEZ-MOLINA, 2004).

Em contrapartida outros estudos associam o mecanismo da atividade antimicrobiana com: as propriedades físico-químicas, concentração utilizada e tempo de exposição da quitosana além das características da membrana do microrganismo (LIFENG et al., 2004, COSTA, SANTOS e FERREIRA, 2006).

O mecanismo de atividade da quitosana frente a microrganismos também se distingue quanto às bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Segundo estudos, quanto maior a massa molecular da quitosana, maior será sua ação frente a Gram-positivas e quanto menor a massa molecular da quitosana maior será sua atividade contra bactérias Gram-negativas. A hipótese proposta para esclarecimento desse mecanismo, é que, nas gram-positivas, a quitosana de alta massa molecular forma

películas em volta da célula que promovem a inibição da absorção de nutrientes, enquanto que a quitosana de baixa massa molecular adentra com maior facilidade em Gram-negativas, ligando-se ao DNA (evitando a transcrição e tradução celular), o que ocasiona o distúrbio metabólico dessas bactérias (HELANDER et al., 2001; DEVLIEGHERE, VERMEIREN e DEBEVERE, 2004; HARISH e THARANATHAN, 2007). De acordo com Dressler (2008), a nível comercial, a massa molar da quitosana varia entre 80.000 e 180.000 g/mol, estando subdividida em quitosana de: baixa massa molecular (entre 80.000 e cerca de 110.000 g/mol), média massa molecular (entre 120.000 e 50.000 g/mol) e alta massa molecular (valor superior a 150.000 g/mol).

Embora existam diversas propostas com o intuito de esclarecer ação da quitosana frente a microrganismos, este biopolímero tem apresentado ação satisfatória na inibição de diversos agentes etiológicos como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (LI et al., 2007), *Salmonella entérica*, *Salmonella paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* (YADAV e BHISE, 2004), *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus faecalis* (CHUNG et al., 2004), *Listeria monocytogenes* (PORTER et al., 2000; COMA et al., 2002; CHI, ZIVANOVIC e PENFIELD, 2006), *Sacharomyces cerevisiae*, *Sacharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces baillii*, *Cryptococcus albidus*, *Candida sp.*, *Rhodotorula sp.* (RHOADES e ROLLER, 2000; SAGOO, BOARD e ROLLER, 2002), *Bacillus cereus*, *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (COSTA, SANTOS e FERREIRA, 2006).

É importante ressaltar que, outra vantagem conferida ao uso da quitosana de origem animal é pelo fato deste biopolímero promover o gerenciamento de problemas resultantes da poluição ambiental causadas pelos resíduos da indústria pesqueira uma vez que, conduzirá o aproveitamento eficiente de subprodutos (carapaça de crustáceo), destinando adequadamente estes resíduos alimentares e consequentemente reduzindo os impactos ao meio ambiente (OLIVEIRA, 2015).

### **1.3.8 Utilização da quitosana como conservante natural em alimentos**

Devido as suas características físico-químicas e potencial atividade antimicrobiana, a quitosana tem sido utilizada como agente natural na conservação de alimentos (FAI, 2008). Estudos vêm testando a aplicação de quitosana com o intuito de aumentar a conservação pós-colheita de frutos e legumes tendo em vista, sua potencial capacidade de formar revestimentos semipermeáveis. A associação das características antimicrobianas e gelificantes da quitosana, a torna ideal para a produção de coberturas comestíveis. A quitosana age na alteração da atmosfera interna do fruto, diminuindo as perdas por transpiração e minimizando a senescência

(deterioração do alimento). Os revestimentos constituídos de quitosana são fortes, de longa duração, flexíveis e difíceis de romper proporcionando, ainda, a vantagem de serem comestíveis (RIBEIRO, 2005; HAN et al., 2005; FAKHOURI et al., 2007).

Os revestimentos a base de quitosana atuam como uma barreira, que impede a saída de nutrientes e minerais, além disso, também pode atuar como uma barreira a elementos externos tais como: gases, umidade e óleos (TANADA-PALMU et al., 2005, BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006). Cada vez mais, pesquisas demonstram a eficiência de filmes e revestimentos comestíveis a base de quitosana na conservação de alimentos tais como: bacalhau (SHAHIDI et al., 2002), carne de cordeiro (KANATT et al., 2004), banana (MALMIRI et al., 2011), morango (BAUTISTA-BAÑOS, 2006, MAZARO et al., 2008; ASSIS, 2009; SCHENATO, 2010) goiaba (SOARES et al., 2011), alho (BOTREL et al., 2007), pêssego dourado (SANTOS et al., 2008), uvas (CAMILI et al., 2007), mamão papaia (DOTTO et al., 2008), maçã (ASSIS e LEONI, 2003; JORGE et al., 2011) e manga (BAUTISTA-BAÑOS, 2006). Outras aplicações da quitosana visando sua atividade antimicrobiana foram realizadas também em saladas de vegetais cozidos, suco de frutas e molhos emulsificados e em produtos cárneos (OUATTARA et al., 2000).

A quitosana também tem sido aplicada em derivados lácteos como queijos. Segundo Altieri e colaboradores (2005), a adição de quitosana na produção de queijo muçarela mantido sob refrigeração, levou a inibição de microrganismos patogênicos do grupo Coliforme e de *Pseudomonas spp.* Além disso, verificaram que esta substância não afetou a viabilidade e o crescimento de bactérias ácido láticas, pelo contrário, reportaram uma sutil estimulação quanto a sua multiplicação, uma vez que, não houve comprometimento da função biotecnológica que esta classe de microrganismos possui frente ao laticínio.

Quanto à concentração, estudos sugerem que a quitosana concentrada de 0,01 a 1,0 %, tem efeito antimicrobiano, contudo, isto é considerado para a eficiência antimicrobiana demonstrada *in vitro*. Por outro lado, quando aplicada em alimentos, a atividade da quitosana contra microrganismos geralmente não apresenta o mesmo êxito, devido a natural e elevada reação dos radicais catiônicos deste biopolímero que interagem fortemente com gorduras, proteínas, e outras substâncias aniônicas presentes nos alimentos (KNOWLES e ROLLER, 2001).

ROBBINS (2002), por sua vez, afirma que concentrações de quitosana entre 1 e 1,5% em pesquisas *in vitro* tem obtido êxito na inativação completa de *S. aureus*, contudo, outras pesquisas indicam que a quitosana em concentrações menores que 0.005% mostrou-se suficiente para a total inativação do *S. aureus*, demonstrando a necessidade de mais investigações científicas que melhor elucidem as concentrações

eficientes de quitosana contra bactérias patogênicas. Estudo recente demonstrou que a utilização de quitosana como cobertura em queijo de coalho em concentrações variando de 0,5% a 1,5%, demonstrou atividade antimicrobiana frente à bactéria Gram-positiva, não comprometendo as características físico-químicas e os aspectos sensoriais do produto (OLIVEIRA, 2015).

Dentro desse contexto, a quitosana pode ser considerada uma boa opção de origem animal a ser utilizada para a conservação de queijo de coalho, proporcionando aumento do tempo de vida útil, melhora da qualidade microbiológica, proteção contra diversos patógenos e importante contribuição no fortalecimento de sua repercussão, pois, este produto lácteo ainda é muitas vezes associado a um produto sem garantia de inocuidade (ASSIS e SILVA, 2003, DUARTE et al., 2005, ALTIERI, 2005, ANDRADE, 2006, LIMA, 2010, PAGANI et al., 2012; NUNES et al., 2013, ALMEIDA, PAIVA JUNIOR e GUERRA, 2013).

## CAPÍTULO 2

Artigo

### **EFEITO DA QUITOSANA COMO COBERTURA E INCORPORADA EM QUEIJO DE COALHO SOB A VIABILIDADE DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* E CONTROLE DE QUALIDADE**

Submissão para publicação ao periódico indexado **Journal of the Science of Food and Agriculture**

## EFFECT OF QUITOSAN AS COVERAGE AND INCORPORATED IN COALHO-TYPE CHEESE UNDER THE FEASIBILITY OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND QUALITY CONTROL

Dayane de Melo Barros<sup>1</sup>, Eriane de Castro Lima Machado<sup>2</sup>, Roberta Albuquerque Bento da Fonte<sup>3</sup>

### 2.1 Resumo

O queijo de coalho é um produto lácteo típico da região Nordeste e amplamente consumido pela população, contudo, à má qualidade da matéria prima associada à ausência de padronização no processo de fabricação torna este produto lácteo susceptível à contaminação microbiana principalmente por *Staphylococcus aureus*. Objetivou-se com este estudo avaliar a influência da quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho sob a viabilidade de *Staphylococcus aureus* e controle de qualidade. Para isso, foram produzidos queijos de coalho com quitosana em cobertura e adicionada à massa nas concentrações 5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL e 1mg/g, 2mg/g e 4mg/g, respectivamente. Produtos sem quitosana (C) e com ácido acético 1% (CA) foram usados como controles. A capacidade de inibição bacteriana da quitosana foi avaliada por meio da comparação da contagem de células viáveis de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) em cada tratamento, no decorrer de cinco intervalos de tempo (0, 4, 8, 12, 16 dias de armazenamento), com a contagem inicial e amostras controles. O produto sem quitosana (C) foi avaliado quanto ao teor de umidade e gordura. As análises sensoriais (teste de aceitação, comparação pareada e intenção de compra) e de estabilidade de prateleira (0, 10 e 20 dias de armazenamento) por meio de análises microbiológicas (indicadores de qualidade) e físico-químicas (pH, acidez e atividade de água) foram realizadas com as amostras controles e tratadas com quitosana nas concentrações antibacterianas mais eficientes. As análises de caracterização do consumidor e sensoriais foram realizadas com 100 consumidores. Verificou-se atividade antimicrobiana de quitosana em todos os tratamentos, porém, as concentrações mais elevadas de quitosana como cobertura e adicionada à massa, 15mg/mL e 4mg/g, respectivamente potencializaram a inibição do *Staphylococcus aureus*. O teor de umidade e gordura atendeu aos padrões regulamentares. Quanto à estabilidade de prateleira, as amostras cumpriram com os limites microbiológicos regulamentares e apresentaram valores de pH, acidez e atividade de água aceitáveis. No perfil do consumidor, averiguaram-se maiores frequências para consumo de queijo de coalho em duas ou mais vezes por semana, por hábito, comercializados em supermercados ou mercados, e embalados sem vácuo. Na aceitação sensorial, as notas corresponderam aos conceitos hedônicos entre gostei ligeiramente e gostei muitíssimo, verificando-se melhoria na textura dos produtos com quitosana incorporada. Valores de aceitabilidade foram maior que 70,00%, exceto no quesito sabor dos produtos com quitosana em cobertura, com 68,30%. O produto com quitosana incorporada a massa apresentou maior preferência (54%). Na intenção de compra, mais de 50,00% dos provadores afirmaram comprar os produtos com quitosana. Portanto, pode-se inferir que a utilização do biopolímero quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho é uma alternativa favorável de viabilidade comercial e na conservação deste produto lácteo considerando ainda a aceitação sensorial e intenção de compra.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, biopolímero, conservação, produto lácteo, viabilidade comercial.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pernambuco . (UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: dayane.mb@hotmail.com).

<sup>2</sup> Professora Adjunta, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco . (UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: erilanevet@hotmail.com).

<sup>3</sup> Professora Adjunta, Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco . (UFPE-CAV), Vitória do Santo Antão, PE, Brasil (e-mail: robertabentonutricionista@hotmail.com).

## 2.2 Abstract

The coalho-type cheese is a dairy product typical of the Northeast region and widely consumed by the population, however, due to the poor quality of the raw material associated with the lack of standardization in the manufacturing process, this dairy product is susceptible to microbial contamination mainly by *Staphylococcus aureus*. The objective of this study was to evaluate the influence of chitosan as a coating and incorporated in coalho-type cheese under the feasibility of *Staphylococcus aureus* and quality control. To that end, coalho-type cheeses with chitosan were added in the coating, adding 5mg/mL, 10mg/mL and 15mg/mL and 1mg/g, 2mg/g and 4mg/g, respectively. Products without chitosan (C) and 1% acetic acid (CA) were used as controls. The ability of bacterial inhibition of chitosan was assessed by comparing the viable cell count of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) in each treatment, over five time intervals (0, 4, 8, 12, 16 days of storage), with the initial count and control samples. The product without chitosan (C) was evaluated for moisture and fat content. Sensory analysis (acceptance test, paired comparison and purchase intention) and shelf stability (0, 10 and 20 days of storage) through microbiological (quality indicators) and physico-chemical analyzes (pH, acidity and of water) were carried out with the control and chitosan treated samples at the most efficient antibacterial concentrations. The consumer and sensorial characterization analyzes were performed with 100 consumers. Chitosan antimicrobial activity was observed in all treatments, however, the highest concentrations of chitosan as a cover and added to the mass, 15mg/mL and 4mg/g, respectively, potentiated the inhibition of *Staphylococcus aureus*. The content of moisture and fat met the regulatory standards. Regarding shelf stability, the samples complied with the regulatory microbiological limits and presented acceptable pH, acidity and water activity values. In the consumer profile, higher frequencies were observed for consumption of coalho-type cheese in two or more times per week, per habit, marketed in supermarkets or markets, and packed without vacuum. In the sensorial acceptance, the notes corresponded to the hedonic concepts between liked slightly and liked very much, being verified improvement in the texture of the products with incorporated chitosan. Acceptability values were higher than 70.00%, except in the taste aspect of products with chitosan in coverage, with 68.30%. The product with chitosan incorporated into the mass had a higher preference (54%). In the intention to buy, more than 50.00% of the tasters affirmed to buy the products with chitosan. Therefore, it can be inferred that the use of chitosan biopolymer as a coating and incorporated coalho-type cheese is a favorable alternative of commercial viability and in the conservation of this dairy product considering also the sensorial acceptance and purchase intention.

**Keywords:** Antimicrobial activity, biopolymer, conservation, dairy product, commercial viability.

## 2.3 Introdução

Dentre os derivados lácteos, o queijo recebe importante destaque, por se tratar de um alimento fonte de proteína, aminoácidos essenciais, vitaminas, cálcio e outros nutrientes de importância nutricional (OPAS, 2009). No Brasil existe uma vasta

diversidade de queijos produzidos comumente a partir de leite cru e sem os cuidados higiênicos necessários, o que torna esse alimento um potencial veículo de contaminação (OLIVEIRA et al., 2010).

Embora, o queijo de coalho possua relevante importância econômica e social para a população regional, seu processo produtivo, baseia-se majoritariamente na utilização de matéria-prima desprovida de submissão a processos mecânicos ou tratamentos térmicos além de não atenderem as normas higiênico-sanitárias preconizadas pela legislação em vigor, o que conseqüentemente, compromete a qualidade do produto, haja vista, a ausência de qualquer tratamento que possa diminuir a quantidade de microrganismos presentes no queijo de coalho (PEIXOTO, PRAÇA e GÓIS, 2007; FREITAS FILHO et al., 2009; FREITAS, TRAVASSOS e MACIEL 2013). Então, as características da matéria-prima utilizada para a fabricação do queijo de coalho, associadas ao processo de fabricação inadequado, são fatores que contribuem para torná-lo um alimento que não confere segurança microbiológica e padrão de qualidade, podendo causar DVAs (Doenças Veiculadas por Alimentos) na população (SILVA et al., 2010; TOZZO, GUIMARÃES e CAMARGO., 2015).

Dentre as DVAs, a intoxicação estafilocócica, causada por *Staphylococcus aureus* é a causa mais frequente de surtos alimentares, mais precisamente no Brasil. Os surtos provocados por esta bactéria têm sido atribuídos principalmente ao consumo de queijos como o de coalho, justamente pelo fato do processo de elaboração deste derivado lácteo não dispor de tecnologia adequada para aprimoramento da qualidade (CAVALCANTE et al., 2007; BORGES et al., 2008). Dessa maneira, o desenvolvimento de técnicas inovadoras de controle microbiológico para queijos associadas à aplicação de Boas Práticas de Fabricação (BPFs), podem promover a manutenção da qualidade desses produtos processados além de, aumentar a estabilidade de prateleira (ALTIERI, 2005; BEZERRA, 2008; SANTANA et al., 2008).

A quitosana, antimicrobiano natural, nos últimos anos, tem sido empregada em queijos de alta umidade, visto que, possui importante ação bactericida no combate a diversos microrganismos causadores de doenças (ALTIERI et al., 2005; MEI et al., 2013). Neste contexto, a utilização de quitosana, pode ser considerada uma opção satisfatória para a biopreservação, levando ao aumento da vida útil e melhoria da segurança microbiológica do alimento (MACHADO, BORGES e BRUNO, 2011). Contudo, a viabilidade da aplicação da quitosana em alimentos, requer a avaliação dos parâmetros físico-químicos e sensoriais dos alimentos submetidos a este conservante natural, a fim, de verificar sua influência sob as características de qualidade do produto (BENTO et al., 2011). Em vista disso, o objetivo deste estudo foi

avaliar o efeito da quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho sob a viabilidade de *Staphylococcus aureus* e controle de qualidade.

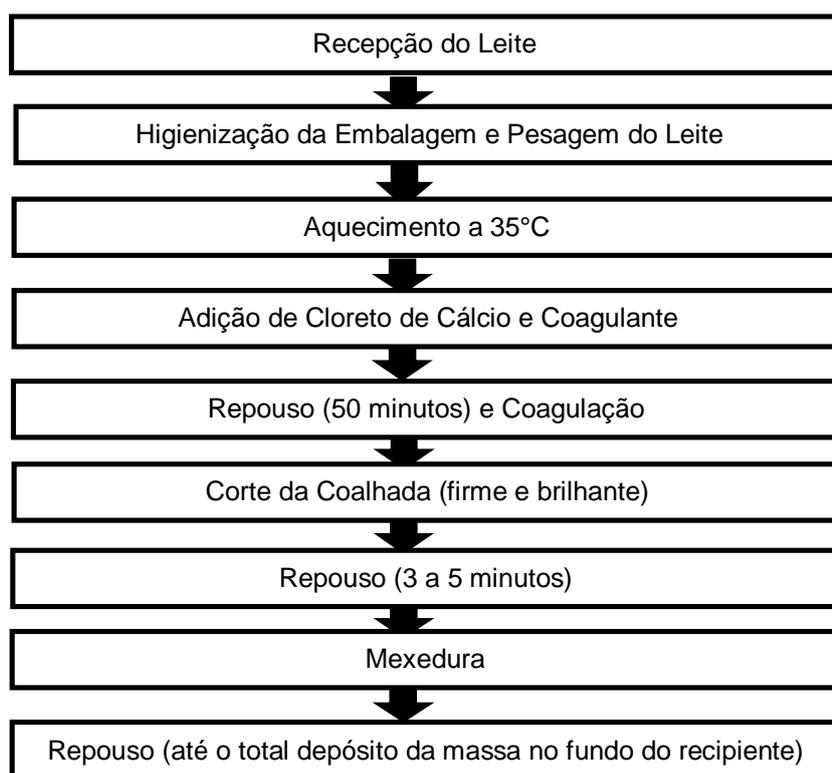
## 2.4 Material e Métodos

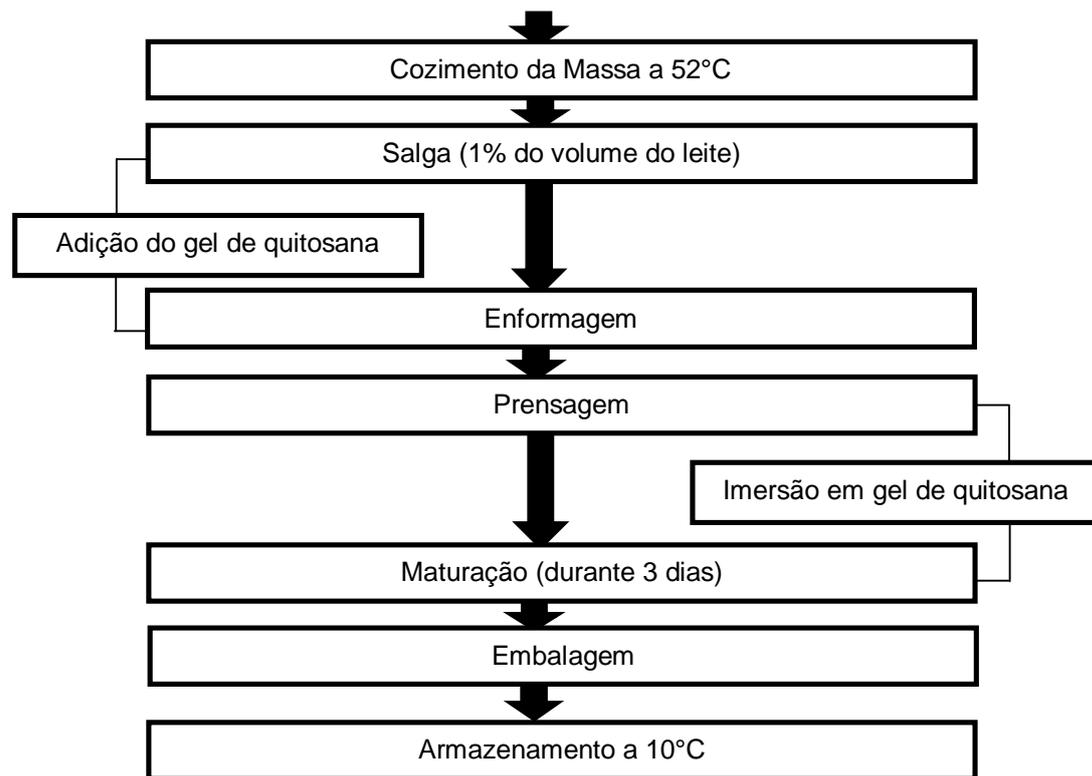
### *Preparo do queijo de coalho com quitosana*

As análises foram conduzidas nos laboratórios de Técnica e Dietética, Bromatologia, e Microbiologia dos Alimentos do Centro Acadêmico de Vitória-Universidade Federal de Pernambuco CAV/UFPE. O preparo dos géis de quitosana a serem utilizados no queijo foi realizado através do uso do pó de quitosana obtido da empresa Sigma-Aldrich® de médio peso molecular (massa molar = 340.000g/mol), GD= >75%, extraído da carapaça de crustáceo, sendo preparado por dissolução em ácido acético (1%), mantido sob agitação moderada em agitador magnético durante 24 h em temperatura ambiente 25°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ), até a dissolução total do pó e obtenção do gel homogêneo, sendo seguida de calibração do pH para 5,8, (utilizando NaOH e HCl), conforme descrição de Shigemasa e Minami (1996).

A produção do queijo de coalho foi realizada de acordo com metodologia de Nassu, Macedo e Lima (2006), com adaptações (Figura 3.1). Foram utilizados leite bovino integral pasteurizado, padronizado com 3% de gordura (Betânia®), coagulante líquido HA-LA (Cristian Hansen®), Cloreto de cálcio e cloreto de sódio (VETEC®).

Figura 2.1- Fluxograma do processamento do queijo de coalho





Adaptado de Nassu, Macedo e Lima, 2006.

As embalagens de leite foram higienizadas para a retirada de eventuais sujidades, utilizando solução de detergente neutro e álcool a 70%, sendo seguida a pesagem e aquecimento do leite sob temperatura de 35°C. As amostras com gel de quitosana como cobertura foram tratadas no terceiro dia de maturação, período em que a massa do queijo apresentava-se firme, ou seja, em condições para o corte sem comprometer a estrutura do produto. Já as amostras com quitosana adicionadas a massa foram tratadas logo após a salga. Em ambos os tratamentos, os queijos de coalho foram cortados em cubos com cerca de 25g de volume e espessura de 1,5 a 2 cm de aresta.

Nas amostras o qual foi adicionado quitosana na massa, cada produto recebeu 20 mL do gel de quitosana ( $m=25g$ ) nas concentrações finais de 1mg/g, 2mg/g e 4mg/g a 75g de massa de queijo. Para as amostras tratadas com quitosana como cobertura, os cubos de queijo de coalho, foram individualmente imersos nos géis de quitosana a 5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL com auxílio de um suporte metálico. Todas as amostras foram assepticamente transferidas para recipientes de vidros estéreis com tampa plástica, e armazenadas em condições de refrigeração a 10° C.

### *Antibiograma e elaboração da suspensão de células*

Para verificar a sensibilidade das cepas, estas foram submetidas a testes de antibiótico padrão. Discos de papel foram impregnados com antibióticos (Norfloxacina e Cloranfenicol) na concentração de 5mg/mL e colocados na superfície do Agar nutriente previamente inoculado com culturas puras das cepas estudadas. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C, e verificou-se os halos de inibição correspondentes a cada cultura (CLSI, 2009). Posteriormente, foram realizados os ensaios antimicrobianos, no qual, a suspensão da cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, foi padronizadas de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland, confirmando-se a contagem de células por espectrofotometria sob densidade ótica de 610nm.

### *Viabilidade de Staphylococcus aureus frente à quitosana em queijo de coalho*

A viabilidade de inibição bacteriana na presença de quitosana em amostras de queijo de coalho foi acompanhada comparando-se a contagem de células viáveis (curva de sobrevivência bacteriana) em cada tratamento com a contagem inicial e amostras controles. Nestes ensaios foi observado o comportamento do microrganismo, este frente à quitosana adicionada em massa e à cobertura comestível de quitosana nas concentrações do produto final 1mg/g, 2mg/g e 4mg/g e 5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL respectivamente.

Amostras de queijo de coalho (25g) contendo quitosana e amostras controle (sem quitosana ou apenas com ácido acético), foram inoculadas com 2,5 mL da suspensão bacteriana de cepa ATCC em teste e mantidas sob refrigeração (6 a 8°C). Nos intervalos de 0, 4, 8, 12 e 16 dias pós-incubação, o produto foi homogeneizado com água peptonada a 0,1% (25g de amostra para 225ml de água peptonada) e em seguida foi diluído seriadamente (1:9 v/v) em água destilada ( $10^{-1}$  -  $10^{-6}$ ) estéril e alíquotas de 100 µL das diluições semeadas em placa de Petri contendo meio seletivo ágar Baird-Parker (BP) enriquecido com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio a 1%, uniformemente distribuída com alças Drigalski e incubadas a 35°C/48h. Após a contagem do número de células viáveis, os resultados foram expressos em log de UFC/g (SAGDIÇ, 2003).

### Análises físico-químicas

O produto controle 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) de acordo com as normas do Instituto Adolf Lutz (2008).

- Umidade

A umidade foi determinada por secagem direta em estufa. Foram pesadas alíquotas de 4 g em cadinho previamente secos seguindo para aquecimento em estufa a 105°C, por 4 horas. Os recipientes foram esfriados em dessecador durante 30 a 60 minutos e pesados em intervalos de 1 hora até peso constante. Os percentuais de umidade foram calculados conforme a seguinte equação:

Equação:

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{umidade ou substancias voláteis a } 105^{\circ} \text{ por cento m/m}$$

N = n° de gramas de umidade (perda de massa em g).

P = n° de gramas da amostra.

- Lipídios totais

A determinação de gordura foi realizada mediante utilização de butirômetro para leite. O percentual de lipídeos das amostras foi calculado de acordo com a equação:

Equação:

$$\frac{V \times 11,33}{P} = \text{lipídeos por cento m/m}$$

V = valor lido na escala do butirômetro.

11,33 = equivalente em peso de 11mL de leite (a escala do butirômetro está graduada para 11 mL de leite).

P = n° de gramas da amostra.

### *Estabilidade de prateleira*

Na avaliação da estabilidade de prateleira, as amostras de queijos de coalho controle sem adição de quitosana e sob tratamentos com quitosana como cobertura e adicionada à massa nas concentrações que obtiveram maior eficiência antimicrobiana sobre a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos nos intervalos de tempo 0, 10 e 20 dias de armazenamento. Para os parâmetros físico-químicos foram determinados: pH (017/IV), acidez em ácido láctico (463/IV) de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008), e atividade de água (aW) conforme as descrições do manual do equipamento .

- pH

Alíquotas de 10g foram pesadas em béquer e, posteriormente, adicionadas de 100 mL de água. A amostra foi homogeneizada até que as partículas ficassem suspensas de maneira uniforme. Em seguida, o pH foi determinado com o pHmetro (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

- Acidez em ácido láctico

Pesou-se 10 g da amostra e realizou-se a sua transferência para um balão volumétrico de 100 mL com álcool a 95%, neutro, deixando-a em contato por 6 horas. A solução foi filtrada e tomada uma alíquota para a titulação, adicionando 5 gotas da solução de fenolftaleína, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até que atingisse a coloração rósea. Com os resultados, calculou-se o percentual de acidez (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

- Atividade de água (aW)

A aW foi medida sob temperatura de  $\pm 25^{\circ}\text{C}$  ( $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) utilizando o equipamento AquaLAB, modelo CX-2 Water Activity System, seguindo as instruções contidas no manual do equipamento.

Quanto às análises microbiológicas, estas foram realizadas conforme a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a), a qual preconiza as contagens de coliformes a 45°C, *Staphylococcus coagulase positiva/g*, *Salmonella sp/25g* e *Listeria monocytogenes/25g* seguindo a metodologia da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) destinada a análises microbiológicas para controle de alimentos. Após o

término do período de incubação e contagens, os resultados foram expressos em UFC/g.

#### *Análise microbiológica de controle de qualidade*

As amostras de queijos de coalho utilizadas para a os testes sensoriais controle sem adição de quitosana e sob tratamentos com quitosana como cobertura e adicionada à massa nas concentrações que obtiveram maior eficiência antimicrobiana sobre a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) foram analisadas, conforme a RDC nº 12, (BRASIL, 2001a) de acordo com a recomendação da Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003) para análises microbiológicas de controle de alimentos. Após o término do período de incubação e contagens, os resultados foram expressos em UFC/g.

#### *Análise sensorial*

As amostras de queijo de coalho controle sem quitosana e sob tratamento com maior eficiência antimicrobiana tanto incorporado a massa quanto como cobertura comestível frente ao *Staphylococcus aureus* foram oferecidas a um painel de 100 provadores não treinados (docentes, discentes e técnicos do Centro Acadêmico de Vitória- CAV/UFPE), escolhidos conforme disponibilidade e critérios de inclusão (gostar de queijo de coalho e ter idade acima de 18 anos). Foram excluídos do painel pessoas que possuam intolerância a algum componente da fórmula, tenham idade acima de 60 anos, tabagistas e pessoas com doenças que comprometam a funcionalidade do paladar e olfato. Antes do início da degustação das amostras de queijo de coalho, os provadores responderam a um questionário relacionado ao consumo de queijo de coalho (Apêndice A).

A análise sensorial foi realizada em cabines individuais com luz branca artificial, aplicando-se a ficha sensorial contendo parâmetros de avaliação quanto à Qualidade global, à cor, ao aroma, à textura e ao sabor. Foram realizados testes de aceitação (Apêndice B) com escala hedônica estruturada de 9 pontos, onde 9 representa ~~9~~ <sup>gostei muitíssimo+</sup> e 1 ~~1~~ <sup>gostei muitíssimo+</sup>, teste de comparação pareada-preferência (Apêndice C) e teste de intenção de compra (Apêndice D). A partir dos resultados obtidos foi calculado o Índice de Aceitabilidade de acordo com Teixeira, Menert e Barberta (1987), segundo a fórmula:  $IA (\%) = A/B \times 100$  (A=representa nota média na escala hedônica, obtida pelo produto analisado, B=

representa a nota máxima na escala hedônica que o produto recebeu). Antes de cada teste, os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE (Apêndice E) em concordância com o projeto de pesquisa submetido e aprovado (Anexo A e Anexo B) pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (CAAE 56538416.7.0000.5208), em conformidade com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

#### *Análise estatística e reprodutividade*

Os dados do experimento, resultantes das análises em triplicata, foram avaliados mediante estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste de Duncan) para a determinação de diferenças estatísticas significantes ( $p < 0,05$ ) entre as amostras controles e os diferentes tratamentos aplicados mediante Análise de Variância (ANOVA).

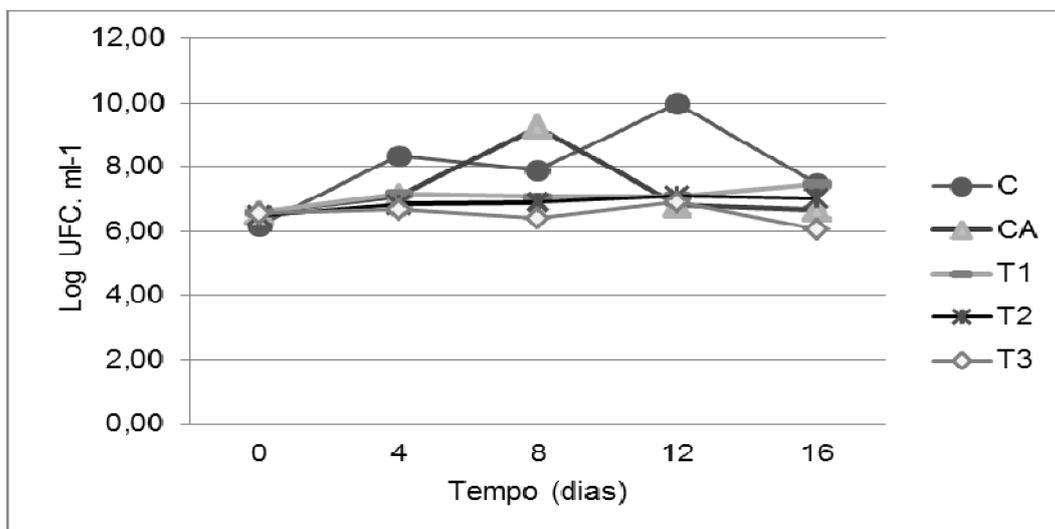
## 2.5 Resultados e Discussão

#### *Viabilidade de *Staphylococcus aureus* frente à quitosana em queijo de coalho*

Os resultados das contagens de células viáveis de *Staphylococcus aureus* frente à quitosana como cobertura e adicionada à massa de queijo de coalho sob diferentes concentrações estão apresentados na figura 2.2 e 2.3. Salienta-se que as culturas de *S. aureus* apresentaram sensibilidade frente aos antibióticos referência, cloranfenicol e Norfloxacin de acordo com os valores recomendados pela CLSI (2009) com os halos de inibição variando entre 20 e 29 mm.

Com base nos resultados, a ação antimicrobiana da quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho sob a viabilidade de *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho, demonstrou-se satisfatória, considerando a redução ou manutenção da carga microbiana do produto, na dependência da concentração usada e do período de exposição, quando se compara as taxas de crescimento do microrganismo quanto à contagem inicial neste tratamento e em relação aos controles sem quitosana ou apenas com ácido acético (Figura 2.2 e Figura 2.3).

Figura 2.2- Curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho adicionado de quitosana como cobertura comestível em diferentes concentrações e armazenado durante 16 dias sob refrigeração



C: Controle sem adição de quitosana; CA: Controle com ácido acético; T1: cobertura (5mg/mL Quitosana); T2: cobertura (10mg/mL Quitosana) e T3: cobertura (15mg/mL Quitosana).

A curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho adicionado de quitosana como cobertura (Figura 2.2), demonstra que os tratamentos T2 (10mg/mL Quitosana) e T3 (15mg/mL Quitosana) obtiveram resultados próximos com reduções logarítmicas microbianas variando de 3,00 a 0,69 e 3,04 a 0,92, respectivamente em relação ao controle sem adição de quitosana levando em consideração todos os intervalos de tempo avaliados (Figura 2.2). O tratamento T3 (15mg/mL Quitosana) revelou resultados mais eficazes no 8º e 16º dias de armazenamento quando comparado à amostra C (sem adição de quitosana) com reduções logarítmicas microbianas de 3,04 e 2,67 respectivamente (Figura 2.2).

Oliveira (2015) constatou resultados semelhantes ao avaliar o comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho, verificando que a amostra com cobertura de quitosana (médio peso molecular extraída da carapaça de crustáceo na) com GD entre 75% e 85% na concentração de 15mg/mL, apresentou melhor resposta na inibição bacteriana, no 16º dia de armazenamento do produto.

Resultados diferentes foram obtidos por El-Diasty et al (2012), os quais reportaram que a aplicação de revestimento de quitosana a 5mg/ml e 10mg/ml no controle de fungos em queijo Kariesh resultou em diminuição nas contagens de células viáveis (cerca de 1 log UFC/g) em um período de armazenamento equivalente a 21 dias, contudo, vale ressaltar que o estudo realizou um abordagem com outro tipo de microrganismo.

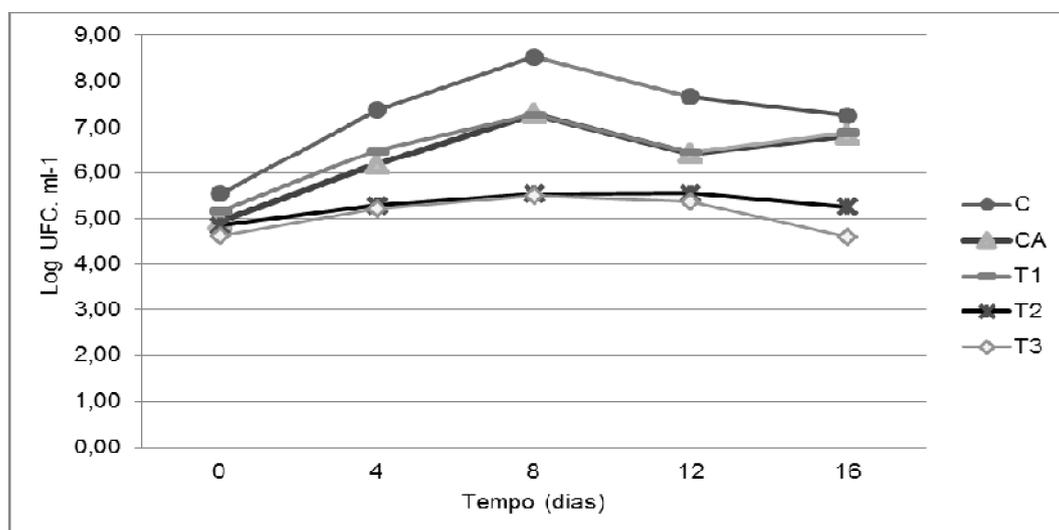
Já Sánchez-González et al., (2011), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de bergamota, limão e chá verde incorporados em filme quitosana

a 10mg/mL (GD= 82,7%) durante 12 dias e verificaram o efeito antibactericida do biopolímero contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia Coli*.

Noutro estudo ao avaliar a atividade antimicrobiana da quitosana em concentrações diferentes (de 10mg/mL a 60mg/mL, GD=95%) associada a N-halamina (onde este composto foi fixado sobre a quitosana por uma reação de abertura do anel), Rong et al., (2013), demonstraram que as películas de quitosana apresentaram eficácia contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia Coli* (ATCC 43895), revelando reduções logarítmicas de 7,4 e 7,5 nos tempos de 10 e 5 minutos respectivamente. MEI et al., (2013) analisaram o efeito de filme constituído por quitosana (13mg/mL) em queijo da Mongólia, nos tempos 15 e 30 dias de armazenamento, confirmando as reduções de microrganismos mesófilos, autóctones e fungos, evidenciando a ação eficaz da quitosana como antimicrobiano natural em derivados lácteos.

A curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em queijo de coelho adicionado de quitosana a massa, demonstrou efeito antimicrobiano efetivo do biopolímero no produto (Figura 2.3). Pode-se verificar que o T3 (4mg/g Quitosana) apresentou maior efeito frente a *S. aureus*. O 4º e 12º dias de armazenamento da amostra T3 foram os intervalos de tempo em que mais houve redução da carga logarítmica microbiana nos valores de 1,70 e 3,22 respectivamente (Figura 2.3). Ao se comparar o T3 aos demais tratamentos e amostras controle, observou-se que o comportamento da taxa de crescimento do *S. aureus* durante todos os dias de armazenamento, apresentou um crescimento linear do microrganismo (Figura 2.3).

Figura 2.3- Curva de sobrevivência de *Staphylococcus aureus* em queijo de coelho com quitosana adicionada a massa do produto em diferentes concentrações e armazenado durante 16 dias sob refrigeração



C: Controle sem adição de quitosana; CA: Controle com Ácido acético; T1: incorporada (1mg/g Quitosana); T2: incorporada (2mg/g Quitosana) e T3: incorporada (4mg/g Quitosana).

Altieri et al (2005), obtiveram resultados similares quanto a atividade antimicrobiana da quitosana em queijo muçarela, no qual, averiguou-se que o gel de quitosana 85% desacetilada inibiu a o crescimento de microrganismos patogênicos do grupo *Pseudomonas* spp. e coliformes, contudo, foram analisadas contagens microbianas mais reduzidas no 5º e 3º dia de armazenamento respectivamente.

O presente estudo evidencia que no decorrer dos 16 dias de armazenamento do produto T3 (4mg/g Quitosana) as amostras mantiveram-se estáveis quanto ao crescimento do microrganismo (*S. aureus* ATCC 6538) em relação à amostra controle sem adição de quitosana (Figura 2.3). Bento et al., (2009), ao avaliarem a influência da quitosana (desacetilada a 85%, extraída do fungo *Mucorrouxi* UCP 064) sob *Listeria monocytogenes*, também verificaram, reduções logarítmicas microbianas obtidas para 2,5 mg/mL (Concentração Inibitória Mínima- CIM) e 5,0 mg/mL (Concentração Bactericida Mínima-CBM) em um período de 4 e 2 horas respectivamente, apresentando o mesmo comportamento de inibição de células viáveis ao longo de 96h (4 dias).

Batista et al. (2011), ao avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana de quitosana de médio e alto peso molecular (concentrações de 5mg/mL a 20mg/mL) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* 319U multirresistente (isolado de casos de mastite bovina), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Lactobacillus casei* (ATCC 7469), verificaram que a quitosana atua na inibição de bactéria Gram-positiva (*L. casei*), no entanto, no que se refere à *S. aureus* 319U o efeito do biopolímero não foi constatado por se tratar de um cepa multirresistente.

#### Análises físico-químicas

Os dados percentuais avaliados quanto ao teor de umidade e gordura do queijo de coalho (Tabela 2.1) atenderam ao padrão estabelecido pela legislação (BRASIL, 2001b).

Tabela 2.1- Análise dos parâmetros físico-químicos do queijo de coalho

Parâmetros Físico-químicos	Valores (%)	Referência (BRASIL, 2001b)
Umidade	54,30± 0,37	46,0 a 54,9%
Gordura	36,40± 0,51	35,0% e 60,0%

C: Controle sem adição de quitosana.

Descritos presentes na literatura demonstram que o teor médio de umidade e gordura para queijo de coalho é bastante variado. Sousa et al., (2014) ao analisarem a umidade de queijo de coalho de fabricação artesanal e industrial sob Inspeção estadual e federal, referiram variações de umidade entre 14,38% e 29,38%. Santos et al., (2011), determinaram valores de umidade para queijos de coalho elaborados com leite de cabra com inclusão de leite de vaca entre 49,07% e 62,33%. Amostras de queijo de coalho, provenientes do sertão do estado de Alagoas, apresentaram valores médios de umidade entre 45,5% e 51,5% (SILVA et al., 2010); Ferreira e Freitas Filho (2008) ao avaliarem a umidade de queijos de coalho comercializados em Barreiros-PE, obtivera valores entre 31,11% e 40,62% e Cavalcante et al., (2007), ao avaliarem queijo de coalho produzido com cultura láctica endógena encontraram valores de umidade de 31,50% a 42,73%.

Quanto, ao teor de gordura em queijo de coalho, Santos et al., (2011) verificaram valores de 16,83% a 24,00%. Já Silva et al., (2010) obtiveram valores que variaram de 36,59 a 48,16%. Freitas Filho et al., (2009), relataram valores médios de 18,99% a 31,88% em amostras de queijo de coalho artesanal produzidos no município de Jucati-PE e Cavalcante et al., (2007) reportaram valores percentuais entre 28,00% e 34,50%.

#### *Análise de estabilidade de prateleira*

Os resultados dos parâmetros A (pH), B (acidez) e C (atividade de água- aW) dos queijos de coalho elaborados encontram-se descritos na Tabela 2.2. Nos intervalos de tempo 0, 10 e 20 dias de armazenamento as amostras de queijo C (sem adição de quitosana), T1 (cobertura a 15mg/mL Quitosana) e T2 (incorporada a 4mg/g Quitosana) apresentaram valores com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação à amostra CA (Controle com ácido acético). Salienta-se que a amostra CA, obteve valores de pH entre 4,97 e 5,1. Munck (2004), relata que em pH inferior a 5,7 ocorre o derretimento do queijo de coalho com deformação da sua estrutura na presença de calor, o que pode provocar a descaracterização do produto.

Tabela 2.2- Análises físico-químicas de queijo de coalho adicionado de quitosana na massa e como cobertura em diferentes concentrações e armazenado durante 20 dias sob refrigeração

<b>A (pH)</b>				
Dias	C	CA	T1	T2
0	6,57±0,21Ba	5,00±0,10Aa	6,53±0,06Ba	6,73±0,06Bb
10	6,60±0,15Aa	4,97±0,06Aa	6,50±0,10Ba	6,67±0,20Ba
20	6,23±0,29Bb	5,10±0,17Aa	6,50±0,10Ba	6,77±0,06Bb
<b>B (Acidez %)</b>				
0	0,12±0,02Aa	0,35±0,01Db	0,27±0,01Ca	0,22±0,01Bb
10	0,11±0,01Aa	0,31±0,01Da	0,26±0,01Ba	0,15±0,01Ca
20	0,31±0,03Bb	0,34±0,01Cb	0,30±0,02Bb	0,22±0,02Ab
<b>C (aW)</b>				
0	0,96±0,01Ab	0,98±0,01Aa	0,97±0,01Ac	0,96±0,01Ab
10	0,95±0,01Ab	0,96±0,01Aa	0,95±0,01Ab	0,95±0,01Ab
20	0,92±0,01Ba	0,97±0,01Aa	0,93±0,01Ba	0,90±0,01Ba

<sup>ABC</sup>Médias seguidas de letras iguais na horizontal não diferem significativamente ( $p>0,05$ ) pelo teste de Duncan. <sup>abc</sup>Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ( $p>0,05$ ) pelo teste de Duncan. C (Controle sem adição de quitosana); CA (Controle com Ácido acético); T1: cobertura (15mg/mL Quitosana) e T2: incorporada (4mg/g Quitosana).

As amostras analisadas possuíram valores semelhantes para todos os parâmetros avaliados em relação aos descritos na literatura (Tabela 2.2). Em todos os períodos de armazenamento (0, 10 e 20 dias), a amostra T2 apresentou pH mais ácido que a amostra C (sem adição de quitosana), isto pode ser esclarecido devido a presença de ácido acético para a dissolução da quitosana e do ajustamento do pH da quitosana, a fim de alcançar grupamentos amina com elevado grau de protonação (HERNANDEZ-MUÑOZ et al 2008). Sousa et al., (2014), consideram o pH, um parâmetro de importante na determinação do perfil de queijos, haja vista, seu efeito na textura, maturação e ação microbiana, uma vez que, as reações químicas são realizadas por enzimas, oriundas coalho ou da microbiota as quais dependem do pH.

O percentual em ácido láctico das amostras B variaram entre 0,11 e 0,35 (Tabela 2.2) para as amostras controle e tratamentos avaliadas com diferença significativa entre as amostras ( $p < 0,05$ ) nos tempos 0 e 10 dias de armazenamento, este resultados assemelham-se com os da literatura, embora haja valores diversos para o parâmetro acidez. Mamede et al., (2010) descreveu valores entre 0,53% a 0,91% de acidez, Vidal (2011) verificou resultados entre 0,08 e 0,59% e Sousa et al., (2014) encontraram valores de 0,12 a 1,01% para as amostras de queijo de coalho analisadas.

Os valores obtidos em C (atividade de água- aW), variaram entre 0,90 e 0,98 para todas as amostras de queijo analisada, sem diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ) nos tempos 0 e 10 dias pós-armazenamento (Tabela 2.2). Outros estudos corroboram com estes resultados. Sousa et al., 2014 encontrou valores entre 0,89 e 0,96 para queijos de coalho comercializados no Nordeste. Ao avaliar o a aW de queijo de coalho produzido no estado da Paraíba, Freitas, Travassos e Maciel (2013) encontraram valores entre 0,97 e 0,98. Pagani et al., (2012) relataram valores de 0,95 a 0,98 em queijo de coalho proveniente de Aracajú-SE.

Quanto ao perfil microbiológico as amostras de queijo de coalho C (sem adição de quitosana), T1 (cobertura a 15mg/mL Quitosana) e T2 (incorporada a 4mg/g Quitosana) em todos os intervalos de tempo (0, 10 e 20 dias de armazenamento) cumpriram com os limites preconizados pela legislação (BRASIL, 2001a). As contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras de queijo de coalho foram  $< 10$  UFC/g enquanto que para coliformes termotolerantes obteve-se contagens  $< 5 \times 10^2$  UFC/g. Já a presença de *Salmonella* ssp. e *Listeria monocytogenes* não foi identificada em 25g de cada produto analisado.

Estudos na literatura demonstram resultados diferentes. Santana e colaboradores (2008) analisaram 60 amostras de queijos de coalho comercializados no mercado central em Aracajú-SE a fim de, verificar a ocorrência de microrganismos indicadores de contaminação, e relataram contaminação em 46,7% das amostras por *Staphylococcus* coagulase positiva, revelando a inviabilidade do produto para o consumo humano.

Borges et al., (2008) através do acompanhamento das condições de higiene utilizadas para o processamento de queijo de coalho, observaram contaminação por *S. aureus* em uma linha de produção de queijo de coalho da região metropolitana de Fortaleza-CE. Foram encontradas em 100% (25/25) das amostras de leite cru a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva sendo identificada a presença de enterotoxina estafilocócica em 20% das amostras de leite cru e por consequência, também foi encontrada no leite pasteurizado, na coalhada e no queijo produzido.

Ao avaliar os aspectos microbiológicos de queijos de coalho comercializados em estabelecimentos dos estados de Pernambuco, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe e Paraíba, que possuíam ou não Selo de Inspeção Federal (SIF), Souza et al., (2014), verificaram que das 104 amostras coletadas 96,15% (100 amostras) estavam fora dos limites aceitos para *Staphylococcus coagulase positiva*.

Estes achados científicos podem ser considerados preocupantes, embora este grupo de bactérias (*Staphylococcus coagulase positiva*) produza menor número de enterotoxinas em relação ao *Staphylococcus aureus*, faz-se necessário a investigação quanto a sua ocorrência em episódios relacionados à intoxicação alimentar (ANDRADE et al., 2011).

Ressalta-se que o elevado nível de contaminação de queijos, especialmente o queijo de coalho por agentes patogênicos tem sido atribuído à ausência de: critérios de qualidade para a seleção da matéria-prima, padronização no processo de produção e aplicação dos procedimentos de BPFs (BORGES et al., 2008; SILVA et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; SOUZA et al.; 2014).

#### *Análise microbiológica de controle de qualidade*

As amostras de queijos de coalho C (sem adição de quitosana), T1 (cobertura 15mg/mL Quitosana) T2 (incorporada 4mg/g Quitosana) empregadas para os testes sensoriais apresentaram-se de acordo com os limites microbiológicos estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2001a).

Tabela 2.3- Análise microbiológica de controle de qualidade das amostras de queijo de coalho utilizadas para os testes sensoriais

<b>Amostras</b>	<b>Coliformes 45°C</b>	<b><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva/g</b>	<b><i>Salmonella</i> sp/25g</b>	<b><i>Listeria</i> monocytogenes /25g</b>
C	<5x10 <sup>2</sup> UFC/g	<10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausente	Ausente
T1	<5x10 <sup>2</sup> UFC/g	<10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausente	Ausente
T2	<5x10 <sup>2</sup> UFC/g	<10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausente	Ausente
Referência (BRASIL, 2001a)	5x10 <sup>2</sup> UFC/g	5x10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausente	Ausente

C: Controle (sem adição de quitosana); T1: cobertura (15mg/mL Quitosana); T2: incorporada (4mg/g Quitosana).

Os resultados colaboram com o estudo de Fai, Stamford e Stamford (2008), as quais afirmam que a aplicação da quitosana como antimicrobiano natural atua de forma complementar ao processo de conservação dos alimentos, contudo, é de

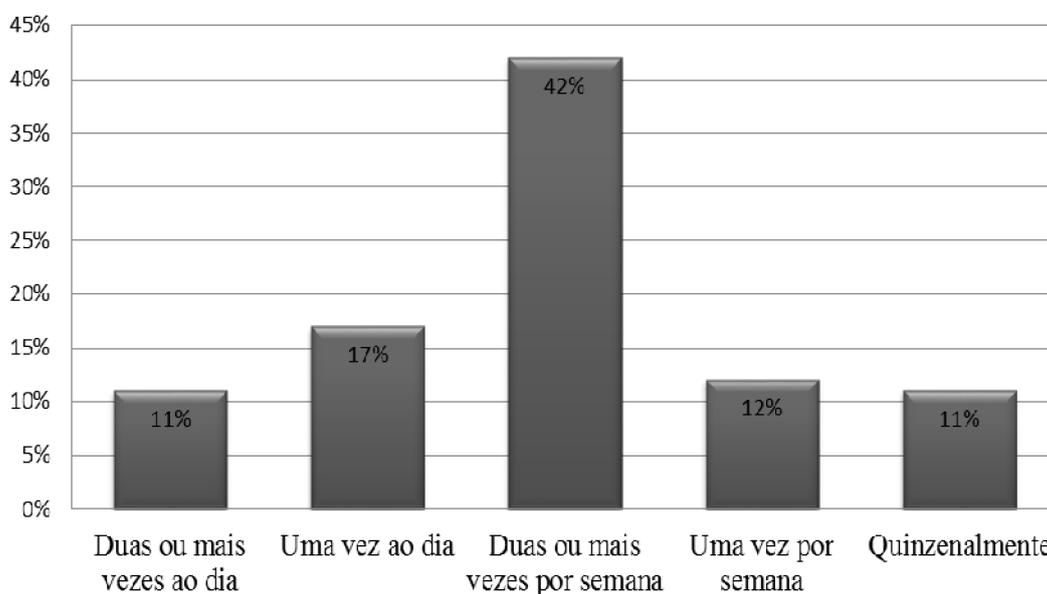
primordial importância que as Boas Práticas de Fabricação (BPFs) estejam integradas no processo de produção dos alimentos a fim de, garantir maior segurança e qualidade ao produto final (NASCIMENTO e BARBOSA, 2007; GONÇALVES et al., 2008; BEZERRA, 2008; SILVA JUNIOR, 2008; FREITAS FILHO et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011).

#### *Caracterização do perfil do consumidor de queijo de coalho*

Participaram da análise sensorial 100 provadores não treinados, dispostos da seguinte forma: 51 do gênero masculino e 49 do gênero feminino, com idade entre 18 e 49 anos. Todos os avaliadores afirmaram consumir queijo de coalho e não possuir nenhum tipo de patologia, intolerância à lactose ou alergia a qualquer ingrediente da fórmula.

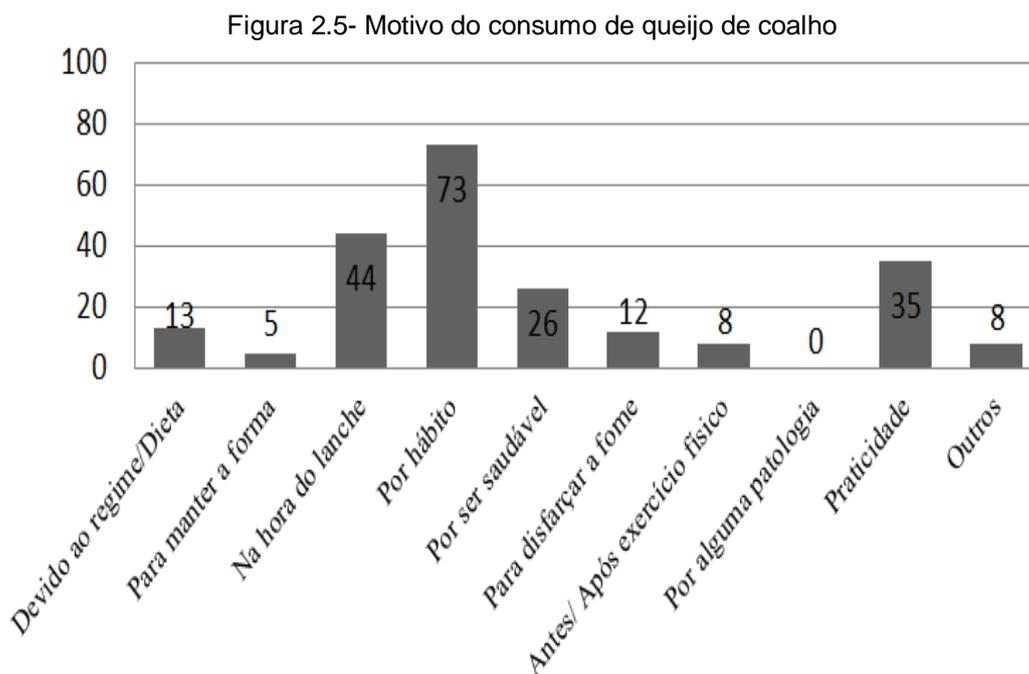
Tratando-se da frequência, a maioria dos provadores (Figura 2.4) relatou que consome queijo de coalho duas ou mais vezes por semana (42%) ou pelo menos uma vez ao dia (17%). De acordo com Vidal (2011), 45,25% (181 indivíduos) dos apreciadores de queijo de coalho da cidade de Natal-RN, consomem o laticínio de uma a três vezes/ semana e 17,5% (70 indivíduos) relataram consumi-lo diariamente, o que corrobora com este estudo.

Figura 2.4- Frequência do consumo de queijo de coalho



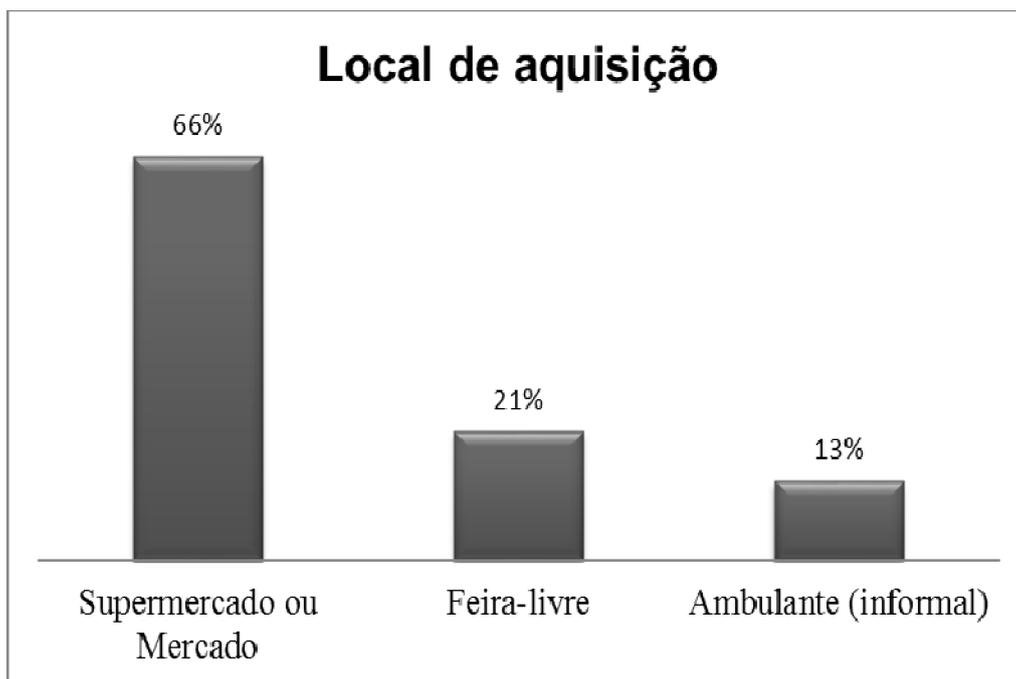
Quando questionados sobre o motivo de consumo (Figura 2.5), 73 provadores afirmaram consumi-lo por hábito, demonstrando assim, que o queijo de coalho é um alimento típico da região, o que reforça ser produto habitual e popular da cultura

nordestina (MENEZES, 2011; ALMEIDA, PAIVA JÚNIOR e GUERRA, 2013). As características nutricionais e sensoriais do queijo de coalho possuem expressiva aceitação comercial, fazendo com que este produto lácteo seja consumido nas mais diversas refeições, como no desjejum, lanche, almoço, jantar ou ceia; pode ser utilizado em receitas como ingrediente principal ou secundário, agradando aos mais diversos grupos sociais, econômicos e étnicos por se tratar de um alimento de uso bastante versátil (OPAS, 2009; ALMEIDA, PAIVA JÚNIOR e GUERRA, 2013).



Sobre o ambiente de compra, 66% dos provadores asseguraram que o local em que mais adquirem queijo de coalho é no supermercado ou mercado (Figura 2.6). Resultados semelhantes foram encontrados por Vidal (2011) ao realizar uma entrevista sobre o perfil dos consumidores de queijo de coalho na cidade de Natal-RN. Dos 400 consumidores, pouco mais de 87,00% (348 indivíduos) dos consumidores afirmaram preferir comprar o queijo em supermercados ou mercados, 5,25% (21 indivíduos) adquirem em feira-livre e 7,75% (31 indivíduos) relataram comprá-lo de vendedores ambulantes.

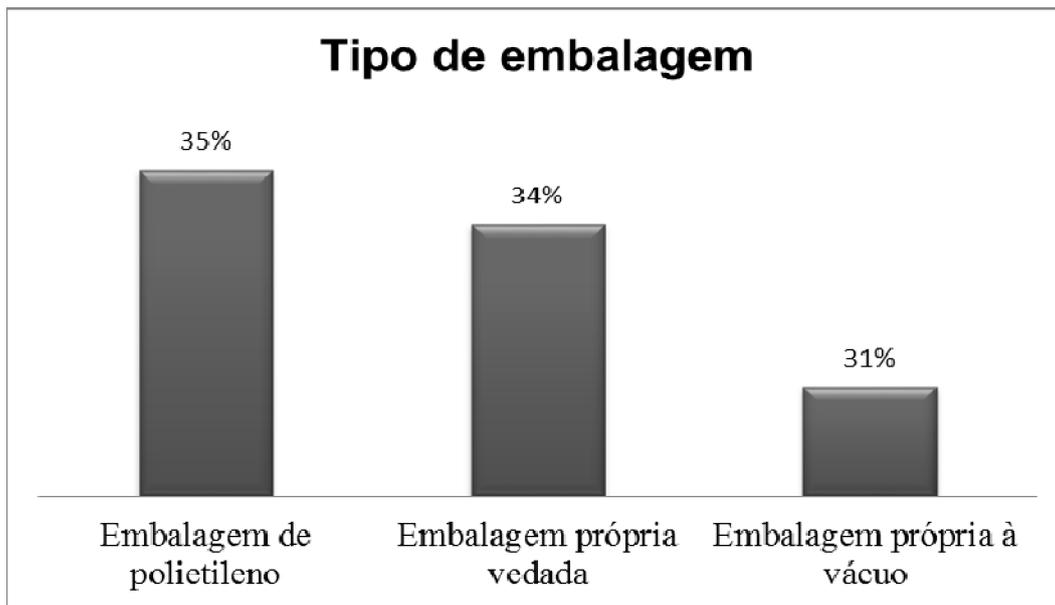
Figura 2.6- Local de aquisição do queijo de coalho



Alguns estudos sugerem as razões pelas quais os consumidores preferem adquirir alimentos principalmente em supermercados. Segundo Andrade et al (2013), ao avaliarem o perfil dos consumidores de alimentos de duas cidades brasileiras (Campinas-SP e Rio de Janeiro-RJ), reportaram que o supermercado foi o local que mais transmitia confiabilidade, quanto a segurança microbiológica sobretudo no que se refere aos alimentos perecíveis quando comparado com outros ambientes de comercialização de produtos alimentícios. Além disso, os clientes de supermercado optam por este espaço, devido a outros fatores tais como: familiaridade ao estabelecimento (o que torna-os mais habituados e direcionados ao espaço físico), diversidade de produtos e preços, agilidade de atendimento e prestatividade dos funcionários (RINALDI, MORABITO e TACHIBANA, 2009).

Quanto ao tipo de embalagem de aquisição do laticínio distribuiu-se de forma proporcional, dos 100 provadores, 35% afirmaram adquirir o queijo de coalho embalado em plástico de polietileno seguido de 34% em embalagem de PVC e de 31% de embalagem a vácuo (Figura 2.7).

Figura 2.7- Tipo de embalagem de aquisição do queijo de coalho



Recomenda-se que queijo de coalho seja acondicionado em embalagem plástica, com etiqueta de identificação (data de fabricação, data de validade e dados completos do produtor), seguindo as normas Portaria nº 371 de 1997 e da RDC nº 259 de 2002 (BRASIL, 1997; BRASIL, 2002; NASSU, MACEDO e LIMA, 2006). De acordo com Dantas (2012), as embalagens primárias (que ficam em contato direto com o produto), devem adequar-se as BPFs a fim de, não causar risco de contaminação do queijo evitando consequentemente intoxicações alimentares decorrentes de alimentos comprometidos a nível microbiológico.

#### *Análise sensorial*

De acordo com as notas obtidas no teste de aceitação (Tabela 2.4), pôde-se verificar que as três amostras de queijo de coalho obtiveram êxito, uma vez que, as médias obtidas, variaram entre 6,83 e 8,14, o que representa nos termos hedônicos *gostei ligeiramente* e *gostei muito*. Além disso, verificou-se que as amostras não se diferenciaram significativamente ( $p > 0,05$ ), exceto para o atributo textura, o qual diferiu ( $p > 0,05$ ) da amostra C (sem adição de quitosana) e T1 (cobertura 15mg/mL Quitosana) para a amostra T2 (incorporada a 4 mg/g Quitosana).

Tabela 2.4- Média das notas atribuídas no teste de aceitação para queijos de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana

Produtos	Cor	Odor	Sabor	Textura	Aparência
C	7,95±1,30a	7,47±1,27a	7,29±1,52a	7,05±1,78a	7,5±1,66a
T1	7,79±1,30a	7,25±1,44a	6,83±1,80a	6,93±1,60a	7,1±1,55a
T2	8,14±0,98a	7,65±1,23a	7,67±1,36a	7,73±1,28b	7,82±1,32a

Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ( $p>0,05$ ) pelo teste de Duncan. C: Controle (sem adição de quitosana); T1: cobertura (15mg/mL Quitosana); T2: incorporada (4mg/g Quitosana).

Quanto ao parâmetro cor, às médias obtidas para os queijos compreenderam-se de 7,79 a 8,14 que representa nos termos hedônicos %Gostei moderadamente+ e %Gostei muito+ (Tabela 2.4). Observou-se que todas as amostras não diferiram significativamente ( $p>0,05$ ), contudo o queijo de coalho T2 obteve a maior média na avaliação do atributo cor. Ao oferecer queijo Kariesh tratado com quitosana nas concentrações de 5mg/mL e 10mg/mL, El-Diasty e colaboradores (2012), reportaram resultados semelhantes onde avaliadores sensoriais não identificaram diferença significativa quanto à cor, entre os queijos com e sem adição de quitosana.

O atributo odor das amostras avaliadas obteve notas médias entre 7,25 e 7,65 para este atributo, o que denota em termos hedônicos %Gostei moderadamente+. Os queijos analisados revelaram diferença insignificante ( $p>0,05$ ), e a amostra T2 apresentou maior pontuação para este aspecto sensorial. Neste estudo o sabor obteve a menor média (6,83), dentre todos os atributos avaliados, apenas para o queijo tratado com quitosana (cobertura 15mg/mL), contudo, essa nota nos termos hedônicos é considerada satisfatória, pois equivale ao conceito %Gostei ligeiramente+ (Tabela 2.4). E as demais amostras (C e T2), revelaram médias  $>7,0$ . Quanto à textura, as médias obtidas posicionaram-se nos termos hedônicos em %Gostei ligeiramente+ e %Gostei moderadamente+ com médias de 6,93 e 7,73. Além disso, verificou-se que a amostra tratada com o antimicrobiano incorporado a massa apresentou maior nota (7,73) quando comparada aos demais queijos degustados, demonstrando diferença significativa ( $p<0,05$ ).

Garcia et al., (2008), ao avaliarem o odor, sabor e textura de queijos de coalho comerciais obtidos a partir de leite de búfala, leite cabra e leite de vaca obtiveram nos conceitos hedônicos notas entre 6,55 e 7,40 (odor), 6,23 e 7,65 (sabor), 7,32 e 7,68 (textura). Para o atributo aparência os avaliadores atribuíram a nota  $7\pm 1$  para todas as

amostras, o reflete nos termos hedônicos os conceitos %Gostei ligeiramente+ e %Gostei muito+.

Dados semelhantes foram obtidos por Oliveira (2015), que não observou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ) entre as amostras de queijo controle (sem adição de quitosana) e tratados com quitosana para todos os atributos sensoriais avaliados (cor, odor, sabor, textura e aparência), porém, o presente estudo evidencia diferença significativa ( $p > 0,05$ ) do queijo T1 para as amostras C e T2 no que se refere ao atributo textura.

Quanto ao Índice de Aceitabilidade (IA) da amostra C (sem adição de quitosana) e tratamentos, T1 (cobertura 15mg/mL Quitosana) e T2 (incorporada 4mg/g Quitosana) verificaram-se resultados superiores a 70,00% para os diferentes parâmetros, exceto no quesito sabor da amostra tratada com quitosana como cobertura comestível (Tabela 2.5). De acordo com Dutcosky (1996), índices  $\geq 70,00\%$  de aceitação remetem que o produto possui boa repercussão e é promissor no setor mercadológico.

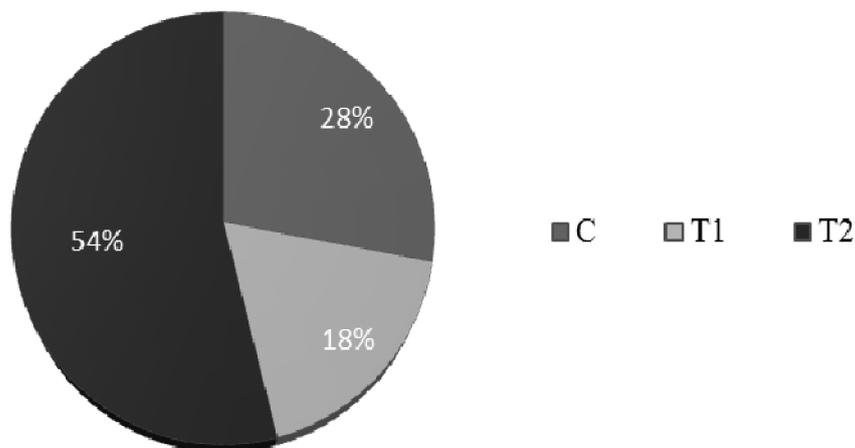
Tabela 2.5- Aceitabilidade do queijo de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana, por parâmetro avaliado

<b>Produtos</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>	<b>Sabor</b>	<b>Textura</b>	<b>Aparência</b>
C	88,33%	83,00%	81,00%	78,33%	83,33%
T1	86,60%	80,55%	68,30%	77,00%	78,88%
T2	90,44%	85,00%	85,22%	85,88%	86,88%

C: Controle (sem adição de quitosana); T1: cobertura (15mg/ml Quitosana); T2: incorporada (4mg/g Quitosana).

O resultado do teste de comparação pareada-preferência encontra-se ilustrado na Figura 2.8. O queijo T2 (incorporada a 4mg/g Quitosana) obteve a maior média para todos os parâmetros avaliados e foi considerada pelos provadores a preferida através do teste de comparação pareada-preferência (Figura 2.8), obtendo 54% de preferência dentre as amostras avaliadas, demonstrando que a quitosana incorporada à massa possui um maior potencial, por melhorar as características organolépticas do produto lácteo, mesmo quando comparado com o queijo controle (sem adição de quitosana).

Figura 2.8- Teste de comparação pareada (preferência) dos queijos de coalho adicionado de quitosana na massa, como cobertura e sem quitosana

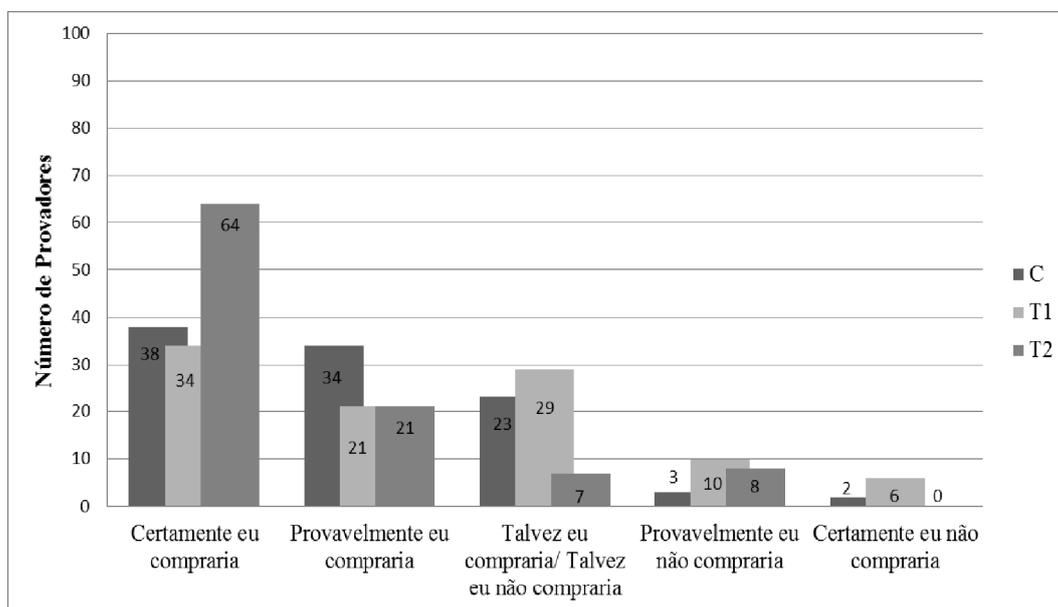


C: Controle (sem adição de quitosana); T1: cobertura (15mg/mL Quitosana); T2: incorporada a massa (4mg/g Quitosana).

Quanto ao teste de intenção de compra (Figura 2.9), os resultados evidenciaram que a amostra T2 (incorporada a 4mg/g Quitosana) apresentou maior aceitabilidade para os termos hedônicos %Certamente eu compraria+. A amostra C (sem adição de quitosana) alcançou o melhor resultado quanto ao termo %Provavelmente eu compraria+ e as amostras T1 (cobertura a 15mg/mL Quitosana) e T2 obtiveram o mesmo resultado para este conceito. As amostras de queijo de coalho C e T1 receberam avaliações próximas para a resposta %Talvez eu compraria/Talvez eu não compraria+.

Os conceitos hedônicos %Provavelmente eu não compraria+ e %Certamente eu não compraria+ foram os que receberam menor atribuição pelos provadores. Os valores obtidos indicaram que as amostras apresentaram boa intenção de compra com destaque para o queijo tratado com quitosana a 4mg/g. Oliveira (2015), apresentou resultados favoráveis quando avaliou a intenção de compra para queijo de coalho revestido com cobertura de quitosana em diferentes concentrações (5mg/mL, 10mg/mL e 15mg/mL). Azerêdo et al., (2016), também revelou resultados satisfatórios quando verificou que amostras de manga *Tommy Atkins* recobertas com fécula de mandioca a 20mg/mL mais quitosana a 20mg/mL possuíam maior intenção de compra quando comparadas com a amostra controle (sem recobrimento).

Figura 2.9- Teste em unidade percentual de intenção de compra de queijo de coalho adicionado de quitosana na massa e como cobertura nas concentrações que obtiveram melhores resultados na atividade antibactericida frente à *Staphylococcus aureus*



C: Controle (sem adição de quitosana); T1: cobertura (15mg/mL Quitosana) e T2: incorporada a massa (4mg/g Quitosana).

## 2.6 Conclusões

A eficiência antimicrobiana da quitosana usada como cobertura e incorporada em queijo de coalho em todas as concentrações usadas neste estudo pode ser comprovada, sendo que, os tratamentos com quitosana nas concentrações de 15mg/mL (cobertura comestível) e 4mg/g (incorporada à massa) foram os mais eficientes na inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 no decorrer de 16 dias de armazenamento do queijo de coalho. Os produtos elaborados para o experimento apresentaram características físico-químicas de acordo com os padrões regulamentares para o queijo de coalho. Durante a estabilidade de prateleira, os produtos elaborados apresentaram-se estáveis quanto a aW, acidez e pH; as amostras avaliadas atenderam aos limites microbiológicos preconizados pela legislação específica, demonstrando que a quitosana associada às BPFs pode assegurar a conservação e qualidade do alimento. Quanto à aceitação sensorial, a adição de quitosana não influenciou nos parâmetros de qualidade exceto, por melhorar a textura quando incorporada a massa; sobre o índice de aceitabilidade houve aceitação satisfatória para as amostras com quitosana nos parâmetros avaliados, exceto no sabor quando adicionado como cobertura. No teste de intenção de compra

as amostras de queijo com quitosana revelaram ter viabilidade mercadológica. Em vista disso, a aplicação de quitosana em queijo de coalho, tanto em cobertura quanto incorporada, é uma alternativa rentável e promissora para a conservação e qualidade do queijo de coalho.

## 2.7 Referências Bibliográficas

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**, v.2 n.2, 2013.

ALTIERI, C.; SCROCCO, C.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Use of chitosan to prolong mozzarella cheese shelf life. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 2683-2688, 2005.

ANDRADE, A.P.C.; BORGES, M.F.; FIGUEIREDO, E.A.T.; MACHADO, T.F.; PORTO, B.C. **Perfil de Staphylococcus Coagulase Positiva e Negativa Contaminantes de Queijo de Coalho**. EMBRAPA Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011.

ANDRADE, J.C; DELIZA, R.; YAMADA, E.A.; GALVÃO, M.T.E.L. Percepção do consumidor frente aos riscos associados aos alimentos, sua segurança e rastreabilidade. **Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 184-191, 2013.

ARAÚJO, W. D. B; DEUS, A. E; SANTOS, C. E. M; PIZZILOLO, V. R; ALMEIDA, M. E. F. Avaliação do conhecimento de manipuladores de alimentos antes e depois de palestras educativas. **Revista Vivências**. vol. 7, n.12, 23-36 p., maio 2011.

AZERÊDO, L.P.M, SILVA, S.M.; LIMA, M.A.C; DANTAS, R.L.; PEREIRA, W.E. Qualidade de manga Tommy Atkins da produção integrada recoberta com fécula de mandioca associada a óleos essenciais e quitosana. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v.38, n. 1. 141-150, 2016.

BATISTA, A.C.L.; DANTAS, G.C.; SANTOS, J.; AMORIM, R.V.S. Antimicrobial Effects of Native Chitosan against Opportunistic Gram-negative Bacteria. **Microbiology Journal**, v.1, p.105-112, 2011.

BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; STAMFORD, T. C. M.; SOUZA, E.L. Potential of Chitosan from *Mucor rouxii* UCP064 as Alternative Natural Compound to Inhibit *Listeria monocytogenes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.583-589, 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 *Mucorrouxii*. **Food Science and Technology**, v. 44, n.2, p. 588-591, 2011.

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

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Revista Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

Brasil, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº259** de 20 de setembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados, 2002.

BRASIL, Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria nº 371** de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 62**, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 14, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30**, de 26/06/2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 12**, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.1-54, 2001a.

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, 2007.

CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard-Eighth Edition. CLSI document M07-A8. Wayne, PA: CLSI; 2009.

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.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 123p, 1996.

EL-DIASTY, E. M.; NESREEN, Z.E.; HODA, A.M.A.; IDEIA, A.M. 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, 2008.

FERREIRA, W. L.; FREITAS FILHO, J. R. Avaliação da Qualidade Físico-químicos do Queijo Coalho Comercializado no Município de Barreiros-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 02, p. 127-133, 2008.

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

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.

GARCIA, R.V.; FALCAO FILHO, R.S.; DUARTE, T.F; PESSOA, T.R.B; QUEIROGA, R.C.R.E.; MOREIRA, R.T. Aceitabilidade e preferência sensorial do queijo de coalho de leite búfala, de leite cabra e de leite de vaca. **Rev. Inst. Latic. Í Cândido Tostes**, nº 363, 63: 12-16, 2008.

GONÇALVES, P.M; SILVA, H.F ; BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO . BPF: aplicação em uma indústria de embalagens alimentícias. **RAF - Revista de Administração da FATEA**. Vol. 1, n. 1, 2008.

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**, v. 110, n. 2, p. 428-435, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do IAL**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 5.ed. São Paulo, 2008.

MACHADO, T.F.; BORGES, M.F.; OLIVEIRA, F.E.M.; SOUSA, C.T. **Isolamento e Identificação de Patógenos em Queijo Coalho**. EMBRAPA Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011.

MAMEDE, M.E.O.; VIANA, A.C.; SOUZA, A.L.C.; FARIAS, S.A. de O.; ARAUJO, P.A. de. Estudo das características sensoriais e da composição química de queijo de coalho industrializado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.69, n.3, p.364-370, 2010.

MEI, J. YUAN, Y.; YAN, W.; YUNFEI, L. 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.

MENEZES, S. S. M. **Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste**. Revista de Geografia (UFPE) v.28, n.1, 2011. Disponível em: <<http://www.revista.ufpe.br/revistageografia/index.php/revista/article/viewFile/318/339>>, acessado em 28 de maio de 2015.

MUNCK, A. V. Queijo de coalho: princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Í Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.59, n.339, p.13-15, 2004. NASCIMENTO, G.A.; BARBOSA, J.S. Boas práticas de fabricação: uma revisão. **Revista Higiene Alimentar**, v. 21, n. 148, p. 24-30, 2007.

NASSU, R. T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. **Queijo de Coalho**. EMBRAPA Informação Tecnológica. Brasília, 2006.

OLIVEIRA, J.P.F.; BARRETO, M.L.J.; MEDEIRO, H.R.; JÚNIOR, S.M.; RANGEL, A.H.N. Aspectos da comercialização de derivados lácteos em supermercados, padarias e lojas de conveniência do setor varejista de Natal/RN. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.3, p.197-212, 2010.

OLIVEIRA, P.G. **Bioatividade de quitosana como cobertura comestível na inibição de *Listeria monocytogenes***. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, 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.; 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.

PEIXOTO, A. M. S.; PRAÇA, E. F.; GÓIS, V. A. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde** (Mossoró . RN . Brasil)v.2, n.2, p. 52-64, 2007.

RINALDI, J.G. S; MORABITO, R. TACHIBANA, V.M. A importância da rapidez de atendimento em supermercados: um estudo de caso. **Gestão & Produção**, São Carlos, v. 16, n. 1, p. 1-14, 2009.

RONG, L.; PEI, H.; XUEHONG, R.; WORLEY, S.D.; HUANG, T.S. Antimicrobial N-halamine modified chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p.534-539, 2013. SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensm.-Wiss. u.-Technolol.**,v. 36, n. 55, p. 467-473, 2003.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C.; CHIRALT, A.; CHÁFER, M. Physical and antimicrobial properties of chitosan. tea tree essential oil composite films. **Journal of Food Engineering**, v.98, p. 443. 452, 2010.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M; PINTADO, M. M. E, P.; GOMES, A. M. P; SOUZA, E.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 70, p.302-10, 2011.

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, 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.

SOUZA, A. Z. B.; ABRANTES, M. C.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P.O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

TEIXEIRA, E.; MENERT, E. M.; BARBERTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 180 p, 1987.

TOZZO, K.; GUIMARAES, I.M.; CAMARGO, C.A. Avaliação microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel . PR. Higiene Alimentar, v.29, n.244/245, p.149-154, 2015.

VIDAL, R.H.L. **Diagnóstico regional do processo de queijo de coalho comercializado em Natal/RN**. 96p. 2011. Dissertação (Mestre) . Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011. Disponível em:<  
[http://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15817/1/RogeriaHLV\\_DISSERT.pdf](http://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15817/1/RogeriaHLV_DISSERT.pdf)  
>, acesso em 05 de junho de 2015.

## CAPÍTULO 3

### DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo revelaram a eficiência antibactericida da quitosana (extraída da carapaça de crustáceos, de médio peso molecular) utilizada como cobertura e incorporada em queijo de coalho na taxa de redução do crescimento de cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, visto que, observou-se que a aplicação do antimicrobiano natural ao produto lácteo resultou em menores contagens bacterianas, demonstrando melhores efeitos os tratamentos com quitosana nas concentrações de 15mg/mL como cobertura comestível e 4mg/g incorporada a massa quando comparada as demais amostras analisadas, no decorrer de 16 dias de armazenamento.

Quanto às características físico-químicas, os produtos elaborados para o experimento apresentaram-se em conformidade com os padrões regulamentares para o queijo de coalho.

No decurso da estabilidade de prateleira, os queijos elaborados nas concentrações mais eficientes frente à inibição de *S. aureus*, demonstraram-se estáveis em relação ao pH, acidez e aW as amostras analisadas cumpriram com os limites microbiológicos estabelecidos pela legislação específica.

Sobre os aspectos sensoriais, os produtos tratados com quitosana como cobertura e incorporada em massa (em concentrações determinadas pelo critério utilizado para a análise de estabilidade de prateleira), apresentaram boa aceitação nos termos hedônicos para os atributos avaliados. Acerca da preferência e atitude de compra dos produtos, a amostra com quitosana adicionada à massa na concentração de 4mg/g destacou-se dentre os demais produtos.

A utilização de antimicrobianos naturais é uma tecnologia alternativa de biopreservação dos alimentos, que vem recebendo ampla notoriedade, devido à presença do mercado consumidor cada vez mais esclarecido e exigente, que busca por alimentos saudáveis (quanto às propriedades nutricionais e de qualidade), isentos de conservantes químicos e de reduzido impacto ao meio ambiente.

Os resultados obtidos a partir desta pesquisa são importantes, haja vista, a segurança dos alimentos, pois a aplicação de quitosana como conservante natural em queijo de coalho pode ser utilizada como uma opção viável e vantajosa à melhoria da

qualidade o queijo de coalho, mediante suas propriedades de: conservação, extensão de vida de prateleira e segurança microbiológica do alimento.

Contudo, fazem-se necessários estudos complementares que avaliem a influência da adição de quitosana como cobertura e adicionada à massa sob as propriedades sensoriais do queijo de coalho ao longo de um período mais abrangente de armazenamento, a fim de, proporcionar um alimento de maior qualidade, preservando suas características organolépticas.

## REFERÊNCIAS

AIROLDI, C. A relevante potencialidade dos centros básicos nitrogenados disponíveis em polímeros inorgânicos e biopolímeros na remoção catiônica. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.144-153, 2008.

ALBUQUERQUE, L. C. **História da fabricação de queijos**. 2009. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br>>, acessado em 17 de junho de 2015.

ALBUQUERQUE, R. B.; 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, p.260-274, 2009.

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.

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**, v.2 n.2, 2013.

ALTIERI, C.; SCROCCO, C.; SINIGAGLIA, M.; DEL NOBILE, M. A. Use of chitosan to prolong mozzarella cheese shelf life. **Journal Dairy Science**, v. 88, p. 2683-2688, 2005.

ALZAMORA, S. M.; TAPIA, M. S.; LÓPEZ-MALO, A.; WELTI-CHANES, J. The control of water activity. In: ZEUTHEN, P.; BOGH-SØRENSEN, L. (Ed.). **Food Preservation Techniques**. Cambridge: Woodhead Publishing, p. 126-153, 2003.

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.

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, 2011.

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 biofúngica sobre frutas fatiadas. **Revista de Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 30, p.33-38, 2003.

ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. **Polímeros**, v.13, n.4, p. 223-228, 2003.

ASSUMPÇÃO, E.G.; PICCOLI-VALLE, R.H.; HIRSCH, D. et al. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.55, p.366-370, 2003.

AVADI, M. R.; SADEGHI, A. M. M.; TAHZIBI, A.; BAYATI, K. H.; POULADZADEH, M.; ZOHURIANN-MEHER, M. J.; RAFIEE-TEHRANI, M. Diethylmethyl chitosan as na antimicrobial agent: Syntesis, characterization an antibacterial effects. **European Polymer Journal**, n. 40, p. 1355-1361, 2004.

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

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ- LÓPEZ, M.; BOSQUEZ-MOLINA, E. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plants extracts. **Journal of Phytopathology**, v.22, p. 178-186, 2004.

BAUTISTA-BAÑOS, S.; HERNÁNDEZ-LAUZARD, A. N.; VELÁZQUEZ-DEL-VALLE, M. G.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; AIT BARKA, E.; BOSQUEZ-MOLINA, E.; WILSON, C. L. Chitosan as a potencial natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, v.25, p.108-118, 2006.

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

BLAIOTTA, G.; ERCOLINE, D.; PENNACCHIA, C.; FUSCO, V.; CASABURI, A.; PEPE, O.; VILLANI, F. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of seG and seL in *S. aureus* AB-8802. **Journal of Applied Microbiology**, Belfast, v. 97, n. 5, p. 719-730, 2004.

BOARI, C. A.; PICCOLI-VALLE, R. H.; NASCIMENTO, A. R.; ALCÂNTARA, E. M.C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird Parker em queijos maturados. **Boletim do CEPPA**. Curitiba, v. 20, n.2, p. 347-354, 2002.

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.; 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.

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C.; KUAYE, A. Y. Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Revista Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008a.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L; FEITOSA, T., KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: Revisão. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.26, n.1, p.71-86, 2008b.

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

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.

BRASIL. **Instrução Normativa Nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 8, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 30**, de 26/06/2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2001a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146** de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos e Regulamento Técnico Geral para a Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 3977, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC nº 12**, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.1-54, 2001b.

BRITO, C. O. **Agroindústria artesanal e o programa fábrica do agricultor: uma tentativa de racionalizar a atividade em uma unidade de produção agrícola familiar**. 2005. 95p. Dissertação (Mestrado em Sociologia). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BUYSER, M.L.DE; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different 20 industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67 p. 1-17, 2001.

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

CAMPANA, S. P.; DESBRIÈRES, J. Chitin, Chitosan and Derivatives. **Natural Polymers and Agrofibers Composites**; (E. Frollini; A.L Leão; L.H.C. Mattoso eds.), USP; UNESP; EMBRAPA. p.41-71, 2000.

CAMPANA-FILHO, 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 - e -quitina. **Química Nova**, v.30, n.3, p.644-650, 2007.

CAMPANA-FILHO, S.P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n.4, p. 169-173, 2001.

CARDOSO, M. B. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos de desacetilação assistida por ultra-som de alta potência**. 2008.102f. Tese (Doutorado)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARD, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology, London**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

CASCUDO, L. C. **História da Alimentação no Brasil**. 1ª edição. São Paulo: global editora, 2004.

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**, v.27, p. 205-214, 2007.

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

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, 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, 2002.

COSTA SILVA, H. S. R.; 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.

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

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

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.

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.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruits and vegetable. **Food Microbiology**, v.21, p.703-714, 2004.

DIAS, J.N.; FONTINELE, L.L.; MACHADO, S.M.O.; OLIVEIRA, J.S.; FERREIRA, G.P.; CUNHA, A.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no Norte do Piauí. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DOTTO, G. L.; GREVINELI, A. C.; OLIVEIRA, A.; PONS, G.; PINTO, L. A. A. Uso de quitosana como filme microbiológico para o aumento da vida útil de mamões papaia. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 17, 2008, Pelotas. **Anais eletrônicos...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2008. Acesso em 26 de julho de 2015.

DRESSLER, A.C. **Propriedades reológicas de compósitos sol-gel de quitosana/glicerol/nanoelementos**. 2008.70f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

DUAN, J.; PARK, S.-I.; DAESCHEL, M. A.; ZHAO, Y. Antimicrobial chitosan. lysozyme (CL) films and coatings for enhancing microbial safety of Mozzarella cheese. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.355-362, 2007.

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, 2005.

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, 2008.

FAKHOURI, F. M; FONTES, L. C. B; GONÇALVES, P. V. M; MILANEZ, C.R; STEEL, C. J; COLLARES-QUEIROZ, F. P. Filmes e coberturas comestíveis compostas à base de amidos nativos e gelatinas na conservação e aceitação sensorial de uvas Crimson. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p 369-375, 2007.

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.

FERNANDES, A. M. S. **O PRONFAF na Agricultura Familiar: sua criação, distribuição e principais resultados**. 20013.58p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Economia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2013.

FONTE, A.I.E. **Queijo de coalho do sertão alagoano: enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar-Biotecnologia Microbiana). 84p. 2012. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, 2012.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. 3ª edição, São Paulo: Artmed, 2002.

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

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

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

FREITAS, E. I. **Deteção de genes de enterotoxinas de Staphylococcus sp. isolados de queijo Minas Frescal**. 2005. 106f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) . Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

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. **Tecnologia de alimentos: princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2009.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4ed. São Paulo: Manole, 2011.

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, 2011.

GUERREIRO, P. K.; MACHADO, M. R. F.; BRAGA, G. C.; GASPARINO, E.; FRANZENER, A. S. M. Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HAN, C; LEDERER, C; McDANIEL, M; ZHAO, Y. Sensory Evaluation of Fresh Strawberries (*Fragaria ananassa*) Coated with Chitosan-based Edible Coatings. **Journal Of Food Science**, Vol. 70, N. 3, 2005.

HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science e Technology**, v.18, n.3, p.117-131, 2007.

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, p.235-244, 2001.

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**, v. 29, n. 2, p. 253-264, 2011.

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.

KNOWLES, J. R.; ROLLER, S. Efficacy of chitosan, carvacrol and a hydrogen peroxide-based biocide against foodborne microorganisms in suspension and adhered to stainless steel. **Journal of Food Protection**, n. 64, p. 1.542 - 1.548, 2001.

KOMATSU, R.; RODRIGUES, M.A.M.; LORENO, W,B,N.; SANTOS, K.A. **Ocorrência de Staphylococcus coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em Uberlândia** . MG. Bioscience Journal, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

KUBOTA, N.; TASTUMOTO, N.; SNO, T.; TOYA, K.; A simple preparation of half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. **Carbohydrate Reserach**, v.324, p.268-274, 2000.

KUMAR, M. N. V. R. A review and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, v.32, n.3, p.672-678, 2009.

LECLERC. V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVAT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; DE BUYSER, M.L.; GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk products: surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, v. 76, n. 2, p. 195-202, 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, 2007.

LIFENG Q.; ZIRONG X.; XIA J.; CAIHONG H.; XIANGFEI Z. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2693-2700, 2004.

LIMA, A.F. **Staphylococcus coagulase-positiva e enterotoxinas em queijo de coalho**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) . Faculdade Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, 2005.

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.

LOIR, Y. LE; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning. **Genetic Molecular Research**, v.2, n.1, p.63-76, 2003.

LOPES, M. A.; CARVALHO, F. M. Análise de rentabilidade de uma empresa om opção de comercialização de queijo ou leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n.4, p. 642-647, 2006.

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. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de Antimicrobianos Naturais na Conservação de Alimentos**. EMBRAPA Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011, disponível em: <  
[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zTzIqILaU1wJ:www.cnpat.e mbrapa.br/download\\_publicacao.php%3Fid%3D341+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:zTzIqILaU1wJ:www.cnpat.e mbrapa.br/download_publicacao.php%3Fid%3D341+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>, acesso em 18 de abril de 2016.

MACHADO, T.F; BORGES, M.F; OLIVEIRA, F.E.M; SOUSA, C.T. **Isolamento e Identificação de Patógenos em Queijo Coalho**. EMBRAPA Agroindústria Tropical. Fortaleza, 2011, disponível em: <  
[http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Rnz5oYctmqQJ:www.cnpat.e mbrapa.br/download\\_publicacao.php%3Fid%3D336+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:Rnz5oYctmqQJ:www.cnpat.e mbrapa.br/download_publicacao.php%3Fid%3D336+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br)>, acesso em 15 de abril de 2016.

MALMIRI, H. J.; OSMAN, A.; TAN, C. P.; RAHMAN, R. A. Development of an edible coating based on chitosan-glycerol to delay Beranganqbanana (Musa sapientum cv. Berangan) ripening process. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 3, p. 989-997, 2011.

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**, v. 30, n. 1, p. 185-190, 2008.

MEI, J. YUAN, Y.; YAN, W.; YUNFEI, L. 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.

MENEZES, S. S. M. Queijo de coalho: tradição cultural e estratégia de reprodução social na região Nordeste. **Revista de Geografia (UFPE)**, v.28, n.1, 2011. Disponível em: <<http://www.revista.ufpe.br/revistageografia/index.php/revista/article/viewFile/318/339>>, acessado em 28 de maio de 2015.

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.

MOURA, C.; MUSZINSKI, P.; SCHMIDT, C.; ALMEIDA, J.; PINTO, L.; Quitina e quitosana produzidas a partir de resíduos de camarão e siri: Avaliação do processo em escala piloto. **Revista de Ciências Exatas e Engenharias**, v. 15, n. 1, p. 7- 17, 2005.

MUZZARELLI, R. A. A., BOUDRANT, J., MEYER, D., MANNO, N., DEMARCHIS, M., & PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 995. 1012, 2012.

NASSU, R. T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. **Queijo de Coalho**. EMBRAPA Informação Tecnológica. Brasília, 2006.

NASSU, R.T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J.R.; MACÊDO, B.A.; LIMA, M. H. P.; BASTOS, M. S. R. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de Coalho e manteiga da terra no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 89, p. 28-36, 2001.

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, J.P.F.; BARRETO, M.L.J.; MEDEIRO, H.R.; JÚNIOR, S.M.; RANGEL, A.H.N. Aspectos da comercialização de derivados lácteos em supermercados, padarias e lojas de conveniência do setor varejista de Natal/RN. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.3, p.197-212, 2010.

OLIVEIRA, P.G. **Bioatividade de quitosana como cobertura comestível na inibição de *Listeria monocytogenes***. 2015. 121p. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente), Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, 2015.

OLIVEIRA, R. A. **Avaliação do efeito antimicrobiano in vitro de quitosana e da associação quitosana/clorexidina sobre saliva e *Streptococcus mutans***. 95f. 2004. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia). São Carlos-SP: Universidade de São Paulo, 2004.

OMOE, K.; HU, D. L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, n. 2, p. 191-198, 2005.

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.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; PIETT, G.; BÉGIN, A.; HOLLEY, R. A. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n.1, p.12, 2000.

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.

PEIXOTO, A. M. S.; PRAÇA, E. F.; GÓIS, V. A. A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. **Revista Verde** (Mossoró . RN . Brasil)v.2, n.2, p. 52 . 64, 2007.

PEREZ, R. M. **Perfil sensorial, físico-químico e funcional de queijo coalho comercializado no município de Campinas, SP**. 2005. 122p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) . Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2005.

PERNAMBUCO. Secretária de Produção Rural e Reforma Agrária. **Resolução n° 002** de 19 de abril de 1999. Estabelece a identidade e os requisitos mínimos de qualidade que deverá cumprir o Queijo de Coalho produzido no Estado de Pernambuco e destinado ao consumo humano. Diário oficial do Estado de Pernambuco, Recife, 1999.

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

PINTADO, A. I. E; PINHO, O; FERREIRA, I. M. P. L. V. O; PINTADO, M. M. E; GOMES, A. M. P; MALCATA, F. X. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 631-640. 2008.

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, 2000.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W. J.; LEONAR, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. São Paulo: Artmed, 2005.

RAHMAN, M. S.; GUIZANI, N. G.; AL-RUZEIKI, M. H. D- and Z- values of microflora in tuna mince during moist and dry heating. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 93-98, 2004.

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, 2000.

RIBEIRO, C. **Estudo de estratégias para a valorização industrial do morango**. 2005. 65p. Dissertação (Mestrado) . Programa de Pós-Graduação, Universidade do Minho, Portugal, 2005.

ROBBINS, A. **O uso da quitosana na agricultura**. 2002. Disponível em: <[http://agrooceanica.web2002.uni5.net/arquivos/artigos\\_5.pdf](http://agrooceanica.web2002.uni5.net/arquivos/artigos_5.pdf)>, acesso em 20 de julho de 2015.

ROBERT, S.; CHAMBERS, S. Diagnosis and management of *Staphylococcus aureus* infection of the skin and soft tissue. **Intern Med J**, v. 35, p. 97S-105S, 2005.

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

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. 60-66, 2011.

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, 2002.

SALINAS, R. D. **Alimentos e Nutrição- Introdução à Bromatologia**. 3º edição, Porto Alegre: Artmed, 2002.

SANTANA, R.F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008.

SANTOS, A. L. S.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. F.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p.413-423, 2007.

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. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, p.88-93, 2008.

SANTOS, J. E. **Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. 2004. 124f. Tese (Doutorado em Ciências - Área Química Analítica) - Departamento de Química, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

SCHENATO, M.T. **Coberturas comestíveis a base de quitosana, cálcio e ácidos 206 graxos na qualidade pós-colheita de morangos**. 2010. 58 p. 207 Trabalho de Conclusão (Graduação em Tecnologia de Alimentos) . Instituto Federal do Rio Grande do Sul, Bento Gonçalves, 2010.

SCOTT, R. **Fabricación de Queso**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, S.A., 1991.

SEBRAE- Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Queijos Nacionais: estudos de mercado.** SEBRAE/ESPM. SEBRAE, 2008.

SENA, M. J. **Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de Staphylococcus sp. isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE.** 2000. 75 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, p. 123-138, 2008.

SGARBIERI, V.C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, n.1, p.43- 56, 2005.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.. J. Food applications oh chitin and chitosans. **Trends Food Science e 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.

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.

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.

SINGLA, A.K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects-an update. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p. 1047-1067, 2001.

SOARES, N. F. F.; SILVA, D. F. P.; CAMILLOTO, G. P.; OLIVEIRA, C. P.; PINHEIRO, N. M.; MEDEIROS, E. A. A. Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 281-289, 2011.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. C.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P.O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D. B. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

SYNOWIECKI, J.; AL-KHATTEB, N.A. A. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 43, p.144-171, 2003.

TANADA-PALMU, P.S. PROENÇA, P.S. P; TRANI, P.E.; PASSOS, F.A.; GROSSO, C.R.F. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, v. 64, n. 2, p. 291-297, 2005.

THARANATHAN, R.N.; KITTUR, F.S. Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.43, n.1, p.61-87. 2003.

TONHI E.; PEPLIS A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Química Nova**, v.25, n.6, p.943-948, 2002.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, p.1-760, 2000.

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

VARMA, A. J.; DESHPANDE, S. V.; KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 77-93, 2004.

VEIGA, P. C. S. **Estudos físico-químicos de N-acetilação de quitosanas em meio homogêneo**. 2011. 101f. Dissertação (Mestre em Ciências) . Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

VELÁZQUEZ-MEZA, M. E. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. **Salud Pública de México**, v. 47, p. 381-7, 2005.

VIDAL, R.H.L. **Diagnóstico regional do processo de queijo de coalho comercializado em Natal/RN**. 96p. 2011. Dissertação (Mestre) . Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011. Disponível em:<  
[http://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15817/1/RogeriaHLV\\_DISSERT.pdf](http://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/15817/1/RogeriaHLV_DISSERT.pdf)  
>, acesso em 05 de junho de 2015.

WONG, A.C.L.; BERGDOLL, M.S. **Staphylococcal Food Poisoning**. Foodborne Diseases. 2. ed. Elsevier, 2002

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: a potencial biomaterial effective against from shiitake stipes. **Current Science**, v.87, n.9, p 1176-1178, 2004.

## APÊNDICE A



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



Nome: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_  
 Período \_\_\_\_\_  
 Ocupação: \_\_\_\_\_ Email: \_\_\_\_\_ Celular/Whatsapp: \_\_\_\_\_  
 Facebook: \_\_\_\_\_

### **QUESTIONÁRIO PARA ANÁLISE SENSORIAL DE QUEIJO DE COALHO**

1. Você é consumidor de QUEIJO DE COALHO?  
 SIM     NÃO
  
2. Com qual frequência você consome QUEIJO DE COALHO?  
 2 ou mais vezes ao dia     1 vez dia     2 ou mais vezes por semana     1 vez semana  
 Quinzenalmente     1 vez mês
  
3. Você costuma consumir QUEIJO DE COALHO: (pode marcar mais de uma alternativa)  
 Devido a regime/dieta     Para disfarçar a fome  
 Para manter a forma     Antes/após exercício físico  
 Na hora do lanche     Por alguma patologia  
 Por hábito     Praticidade  
 Por ser mais saudável     Outros \_\_\_\_\_
  
4. Possui alguma patologia, intolerância a lactose / ou alergia?  
 SIM     NÃO    Se sim, qual? \_\_\_\_\_
  
5. Você costuma adquirir o QUEIJO DE COALHO: (marque apenas uma alternativa por coluna).  
 Supermercado     Embalagem de polietileno  
 Feira-livre     Embalagem própria vedada  
 Ambulante (informal)     Embalagem própria á vácuo

*Os pesquisadores agradecem a sua colaboração!*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

## APÊNDICE B



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



Nome: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_  
 Email: \_\_\_\_\_ Celular/Whatsapp: \_\_\_\_\_

### TESTE DE ACEITAÇÃO

Você está recebendo três amostras de queijo de coalho, uma padrão e duas elaboradas com ingrediente em diferentes concentrações. Por favor avalie as amostras servidas e identifique o quanto você gostou ou desgostou de cada produto, dando notas de acordo com a escala abaixo.

- |                             |                    |       |
|-----------------------------|--------------------|-------|
| 9. Gostei muitíssimo        | Código da amostra: | _____ |
| 8. Gostei muito             | COR:               | _____ |
| 7. Gostei moderadamente     | ODOR:              | _____ |
| 6. Gostei ligeiramente      | SABOR:             | _____ |
| 5. Não gostei/nem desgostei | TEXTURA:           | _____ |
| 4. Desgostei ligeiramente   | APARÊNCIA:         | _____ |
| 3. Desgostei moderadamente  |                    |       |
| 2. Desgostei muito          |                    |       |
| 1. Desgostei muitíssimo     |                    |       |

## APÊNDICE C



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



Nome: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_  
Email: \_\_\_\_\_ Celular/Whatsapp: \_\_\_\_\_

### TESTE DE COMPARAÇÃO PAREADA (PREFERÊNCIA)

**Instruções:** Você está recebendo 3 amostras, para serem avaliadas. Deguste com atenção cada uma das amostras e escreva o código da amostra preferida.

### CÓDIGO DA AMOSTRA PREFERIDA

**Observações:**

---

---

---

## APÊNDICE D



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



Nome: \_\_\_\_\_ data: \_\_\_\_\_ Curso: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_  
 Email: \_\_\_\_\_ Celular/Whatsapp: \_\_\_\_\_

### TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Você compraria esses produtos?	Amostra	Amostra	Amostra
	_____	_____	_____
1. Certamente eu compraria			
2. Provavelmente eu compraria			
3. Talvez eu compraria/talvez eu não compraria			
4. Provavelmente eu não compraria			
5. Certamente eu não compraria			

## APÊNDICE E

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa **Í Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de *Staphylococcus aureus***, 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:** Í Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de *Staphylococcus aureus*

**PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL:** Dayane de Melo Barros

**ENDEREÇO:** Rua Eugenio Cunha, nº 287, Cajá, Vitória de Santo Antão-PE. CEP: 55610-210.

**TELEFONE:** (81) 98765- 8049

**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:** Eriane de Castro Lima Machado e Roberta de Albuquerque Bento (Professoras).

**ARMAZENAMENTO DE DADOS:** Os dados coletados na pesquisa serão arquivados junto ao pesquisador responsável.

**OBJETIVOS:** Verificar a bioatividade antimicrobiana da quitosana em queijo de coalho frente a *Staphylococcus aureus* objetivando fornecer ao mercado novas tecnologias de conservação do produto. A fim 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 da ficha sensorial. 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:** Os riscos implicados a pesquisa podem manifesta-se como pequeno desconforto sensorial e/ou em manifestações clínicas relacionadas à intolerância a lactose, dissacarídeo presente na matéria-prima do queijo de coalho. A quitosana utilizada no produto não traz riscos e malefícios à saúde, porém, pessoas alérgicas a peixes e crustáceos devem evitar o consumo deste produto.

**BENEFÍCIOS:** A quitosana é um produto natural que possui propriedades medicinais para a saúde humana, trazendo assim benefícios aos seus consumidores. 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. A comunidade científica e indústria esta proposta de pesquisa busca colaborar com nova tecnologia de conservação e estabilidade microbiológica do queijo de coalho através da utilização de subprodutos da indústria pesqueira, com produção de tecnologias sustentáveis, contribuindo de forma precisa para o desenvolvimento social, econômico e ambiental, por reduzir os danos ambientais causados pelos resíduos alimentares.

**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) Dayane de Melo Barros 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.

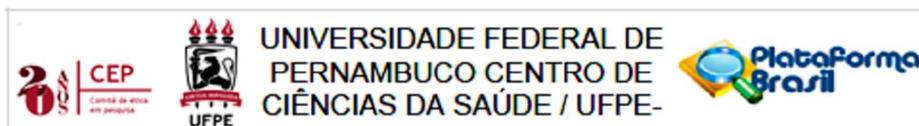
**LOCAL E DATA:**

**NOME E ASSINATURA DO SUJEITO:**

_____	_____
(Nome por extenso)	(Assinatura)
_____	_____
(Testemunha 1)	(Assinatura)
_____	_____
(Testemunha 2)	(Assinatura)

## ANEXO A

**Comprovante de submissão do projeto ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE**



**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de *Staphylococcus aureus*.

**Pesquisador:** Dayane de Melo Barros

**Versão:** 1

**CAAE:** 56538416.7.0000.5208

**Instituição Proponente:** Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão

**DADOS DO COMPROVANTE**

**Número do Comprovante:** 049522/2016

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

Informamos que o projeto Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de *Staphylococcus aureus*. que tem como pesquisador responsável Dayane de Melo Barros, foi recebido para análise ética no CEP Universidade Federal de Pernambuco Centro de Ciências da Saúde / UFPE-CCS em 31/05/2016 às 08:46.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br

## ANEXO B

**Comprovante de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE**

The screenshot displays the 'Plataforma Brasil' web interface. At the top, there is a header with the 'Saúde' logo and 'Ministério da Saúde'. Below this, the 'Plataforma Brasil' logo is on the left, and navigation links for 'principal' and 'sair' are on the right. A user profile bar shows 'Dayane de Melo Barros - Pesquisador | V3.0' and a session expiration notice 'Sua sessão expira em: 28min 12'. The main content area is titled 'DETALHAR PROJETO DE PESQUISA' and contains a section for 'DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA'. The details listed are: 'Título da Pesquisa: Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de Staphylococcus aureus.', 'Pesquisador Responsável: Dayane de Melo Barros', 'Área Temática:', 'Versão: 1', 'CAAE: 56638416.7.0000.5208', 'Submetido em: 26/05/2016', 'Instituição Proponente: Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão', 'Situação da Versão do Projeto: Aprovado', 'Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável', and 'Patrocinador Principal: Financiamento Próprio'. A circular stamp with the text 'COORDENADOR' is visible on the right side of the details. At the bottom right, there is a link for 'Comprovante de Recepção' with a PDF icon and the file name 'PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_698921'.

Saúde  
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

principal sair

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

Dayane de Melo Barros - Pesquisador | V3.0

Cadastros Sua sessão expira em: 28min 12

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Bioatividade de quitosana em queijo de coalho na inibição de Staphylococcus aureus.  
**Pesquisador Responsável:** Dayane de Melo Barros  
**Área Temática:**  
**Versão:** 1  
**CAAE:** 56638416.7.0000.5208  
**Submetido em:** 26/05/2016  
**Instituição Proponente:** Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

COORDENADOR

Comprovante de Recepção: PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_698921