



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

LIDERLÂNIO DE ALMEIDA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS NA QUALIDADE DO QUEIJO COALHO
TIPO B**

Recife
2021

LIDERLÂNIO DE ALMEIDA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS NA QUALIDADE DO QUEIJO COALHO
TIPO B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

Coorientadora: Profa. Dra. Lucia Fernanda C. da Costa Leite

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Araújo, Liderlano de Almeida

Avaliação de produtos naturais na qualidade do queijo coalho tipo B / Liderlano de Almeida. - 2021.

127 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro.

Coorientadora: Profa. Dra. Lucia Fernanda C. da Costa Leite.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. Microbiologia. 2. Microrganismo. 3. Indústria alimentícia. I. Navarro, Daniela Maria do Amaral Ferraz (orientadora) II. Leite, Lucia Fernanda C. da Costa Leite (coorientadora). III. Título.

579

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-294

LIDERLANIO DE ALMEIDA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS NA QUALIDADE DO QUEIJO COALHO
TIPO B**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO) da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 17/05/2021

Banca examinadora

Prof^a. Dra. Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro (Orientadora)

Prof^a. Dra. Edvane Borges da Silva (UFPE)

Prof^a. Dra. Leoni Asfora Sarubbo (UNICAP)

Prof^a. Dra. Juliana Moura de Luna (UNICAP)

Prof. Dr. Mohand Benachour (UFPE)

A minha mãe Edilene Araújo e meu pai Luiz Tenório, a minha irmã Edilaine Araújo; as minhas professoras Edvane Borges, Daniela Navarro e Lucia Fernanda Leite, as minhas amigas Marcella Marinho e Vilma Galindo (in memoriam) e ao primo José Alberto (in memoriam).

Dedico

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço as minhas orientadoras Daniela Navarro e Lucia Fernanda Leite pelo apoio, dedicação e carinho ao longo do tempo de pesquisa, meu muito obrigado pela confiança depositada em mim.

A todos os meus amigos em especial a Alexciana Pereira, Camila Soledade, Edna Lima, Edvane Borges, Emanuely Araújo, Elineide Barreto, Graziela Almeida, Isaias Figueirôa, Kamilla Dutra, Leonarnardo Bezerra, Leonardo Lucas, Jaciane Almeida, Josiane Pereira, Julio Cesa, Robson Pereira, Simone Alves, Sonia Maria, Yana Brandão e Zara Marquez pelo apoio incondicional nessa fase do doutorado.

Meu muito obrigado a minha amiga/ mãe Marcella Marinho por todo apoio dado ao longo da minha pesquisa, nunca terei palavras o suficiente para agradecer. E a Universidade Católica de Pernambuco em especial a professora Lucia Fernanda, professor Sergio Paiva e a Pammello, pelo apoio e empenho em disponibilizar o laboratório para que eu desenvolvesse a minha pesquisa.

Aos meus familiares em especial aos meus pais Luiz Tenório e Ediline Araújo por sempre terem me apoiado. A minha tia Edineusa Almeida, a prima Elma Karelly e aos primos Antonio Galindo, Leidisvaldo Almeida e Nilberto Henrique pelo apoio. A minha irmã Edilaine Araújo pelo carinho e por sempre ser uma irmã maravilhosa, agradeço todo o apoio ao longo dessa minha jornada.

Ao coordenador professor Rafael Ximenes e a professora Teresinha Silva, pela disponibilidade e apoio em todo momento que precisei do PPGB – RENORBIO, aos membros da banca examinadora pelas contribuições que tornaram mais rico o meu trabalho e CAPES pelo financiamento propiciado.

RESUMO

A produção de queijo coalho é uma das principais fontes econômicas dos pequenos e médios produtores das cidades do interior nordestino. Esse possui como matéria prima o leite oriundo da vaca. A depender das etapas empregadas na sua produção, pode ser classificado em dois tipos: O tipo A oriundo do leite submetido ao processo de pasteurização; e o tipo B, quando o leite usado na fabricação é *in natura*, ou seja, não é submetido a nenhum procedimento que vise a eliminação ou redução de microrganismos. O queijo coalho é destacado pela literatura como concentrado lácteo com baixa qualidade microbiológica, principalmente o do tipo B. Assim, o presente estudo objetiva avaliar a ação dos extratos de cinco produtos naturais, a saber: óleo essencial das cascas de laranja Pineapple e limão Tahiti e dos extratos aquosos do coentro, velame do campo e do alho, em diferentes concentrações, em relação aos efeitos promovidos por estes na qualidade microbiológica do queijo coalho tipo B. O estudo foi dividido em quatro (04) etapas, na primeira realizou-se a análise microbiológica, físico-química e sensorial do extrato do coentro. A segunda etapa consistiu na avaliação da influência do extrato aquoso do velame do campo na qualidade microbiológica do queijo coalho tipo B. A terceira etapa do estudo resultou na aplicação do extrato de alho ao queijo, sendo avaliado sua influência na qualidade microbiológica e tempo de prateleira. Na última etapa avaliou-se o uso dos óleos essenciais de laranja e de limão na qualidade microbiana e o índice de aceitabilidade do queijo produzido com a adição desses óleos. De modo geral, os resultados das análises aplicadas evidenciam que principalmente o extrato aquoso do alho e o óleo essencial da casca da laranja Pineapple se revelaram como os melhores agentes bactericidas frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, coliformes total e termotolerante. De modo geral, os produtos naturais utilizados apresentaram potencial para aplicação ao queijo coalho tipo B como mecanismos de aprimoramento de sua qualidade, podendo assim, ser ofertado aos consumidores um alimento com maior segurança e qualidade alimentar.

Palavras-chave: microrganismo; extrato aquoso; óleo essencial.

ABSTRACT

The production of coalho cheese is one of the main economic sources of small and medium producers in the cities of the northeastern interior. This has as raw material the milk from the cow. Depending on the steps used in its production, it can be classified into two types: Type A comes from milk submitted to the pasteurization process; and type B, when the milk used in the manufacture is in nature, that is, it is not submitted to any procedure aimed at eliminating or reducing microorganisms. Coalho cheese is highlighted in the literature as a dairy concentrate with low microbiological quality, especially type B. Thus, the present study aims to evaluate the action of extracts from five natural products, namely: essential oil of Pineapple orange peel and Tahiti lemon and the aqueous extracts of coriander, field candy, and garlic, at different concentrations, concerning the effects promoted by these on the microbiological quality of type B cheese. The study was divided into four (04) stages, in the first stage microbiological, physical-chemical and sensory analysis of the coriander extract. The second step consisted of evaluating the influence of the aqueous extract of the field canopy on the microbiological quality of type B cheese. The third step of the study resulted in the application of garlic extract to the cheese, evaluating its influence on the microbiological quality and shelf life. In the last step, the use of orange and lemon essential oils on microbial quality and the acceptability index of the cheese produced with the addition of these oils were evaluated. In general, the results of the applied analyzes show that mainly the aqueous garlic extract and the Pineapple orange peel essential oil proved to be the best bactericidal agents against *Staphylococcus aureus* microorganisms, total and thermotolerant coliforms. In general, the natural products used showed potential for application to type B coalho cheese as mechanisms for improving its quality, thus enabling consumers to be offered food with greater safety and food quality.

Keywords: microorganism; aqueous extract; essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Queijo coalho	21
Figura 2 - Etapas envolvidas na produção do queijo coalho.....	25
Figura 3 - Velame do campo (Croton campestris).	38
Figura 4 - Coentro (<i>Coriandrum sativum</i> L.)	40
Figura 5 - Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	42
Figura 6 - Limão Tahiti (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka)	44
Figura 7 - Laranja Pineapple	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de Queijos e requeijão em toneladas por região do Brasil.....19

Tabela 2 - Exemplos de queijo artesanais de origem brasileira..... 21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivos Gerais	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 UM POUCO DE HISTÓRIA	15
2.2 COAGULAÇÃO DO LEITE	17
2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO QUEIJO PARA O BRASIL	18
2.4 QUEIJOS BRASILEIROS	20
2.5 QUEIJO COALHO	21
2.6 IMPORTÂNCIA HIGIÊNICO-SANITÁRIA NA QUALIDADE DO QUEIJO COALHO	27
2.6.1 Coliformes	28
2.6.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.6.3 <i>Salmonella</i> spp.	32
2.6.4 Bolor e leveduras	34
2.7 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO COALHO	35
2.8 ALTERNATIVAS PARA MELHORIAS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO COALHO TIPO B	37
2.8.1 Velame do campo	37
2.8.2 Coentro	39
2.8.3 Alho	41
2.8.4 Limão Tahiti	43
2.8.5 Laranja Pineapple	45

3. MÉTODO	49
4. ARTIGO 01 - EVALUATION OF THE INFLUENCE OF ORANGE AND LEMON ESSENTIAL OIL ON THE QUALITY OF TYPE B COALHO CHEESE.....	51
5. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT.....	89
APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH.....	107
APÊNDICE C – PATENTE COM NÚMERO DE PEDIDO: INPI – BR10 2020 020148 4.....	122

1 INTRODUÇÃO

Dentre os alimentos mais antigos do mundo destaca-se o queijo que, ao longo dos tempos, vem se diversificando em tipos e formas, tendo o leite como sua matéria prima. Na vasta gama de produtos desse concentrado lácteo, destaca-se o queijo de coalho, típico do Nordeste brasileiro, representando uma importante fonte de renda para os produtores artesanais e de pequeno e médio laticínios industriais, chegando a movimentar, mensalmente, milhões de reais, evidenciando, assim, a importância dessa atividade por estar interligada à sustentabilidade no campo produtivo e social (USDA 2019; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).

O queijo coalho é amplamente consumido no Nordeste, com as maiores produções ocorrendo nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. As suas características físicas peculiares, de queijo com uma massa branca, de formato retangular, consistência semidura, elástica; uma textura compacta e macia e de média à alta umidade, permitem a versatilidade no consumo, o qual pode ocorrer tanto na forma crua quanto assado ou frito, (REZENDE; WILKINSON, 2005; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).

Independentemente do método utilizado (industrial ou artesanal) a produção do queijo coalho é relativamente simples, não exigindo equipamentos sofisticados e caros. Porém, independentemente do processo aplicado ou classificação (Tipo A ou B), é importante que o produtor fabrique o queijo seguindo as normas de higiene-sanitária estabelecidas para que se possa oferecer ao consumidor maior segurança e qualidade alimentar.

A literatura apresenta trabalhos sobre a qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado nos diversos pontos do Nordeste, os quais ressaltam que a contaminação ocorre principalmente por coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras e *Salmonella spp.*. Os trabalhos são unânimes em afirmar que as contaminações por esses microorganismos se devem ausências de padrões de higiene na manipulação tanto do leite, durante a ordenha, quanto do queijo, na hora de sua produção. Outros fatores como o armazenamento, o transporte e a comercialização interferem bastante na sua qualidade (FEITOSA et

al., 2003; CAVALCANTE *et al.*, 2007; GOMES 2012; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).

Fica evidente que a avaliação microbiológica do queijo coalho é de suma importância para verificação da qualidade do alimento, pois apresenta dados do quanto é seguro ou não consumir o referido produto. De acordo com os autores Catao e Ceballos (2001); Feitosa *et al.*, (2003); Paquereau; Machado; Carvalho (2016), Araújo *et al.*, (2020) o queijo pode apresentar alto índice de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico (pasteurização). Neste sentido, é importante a adoção de métodos que controlem a carga microbiológica e aperfeiçoe a qualidade sensorial e físico – química do queijo coalho Tipo B.

Uma alternativa recente para o controle microbiológico em alimentos versa sobre o uso de produtos naturais, tais como o alho, o velame do campo, o coentro, as cascas da laranja e do limão (ARAÚJO, *et al.*, 2020). Estes produtos podem promover o aperfeiçoamento de produção em escala caseira ou industrial do queijo coalho, uma vez que já foram comprovadas suas ações antimicrobiológica e antifúngica em outros alimentos. Além disso, esses produtos contêm compostos ou elementos químicos que contribuem para diversas funções importantes para a saúde.

Com base no exposto, visando contribuir para um produto com maior segurança alimentar e com boa aceitabilidade pelos consumidores, os objetivos do presente trabalho são:

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

Promover a avaliação microbiológica, físico-química e sensorial da qualidade do queijo coalho tipo B (*in natura*), após a adição, separadamente, dos extratos de alho, coentro e dos óleos essenciais das cascas de laranja e limão.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a ação do extrato aquoso do velame do campo na qualidade microbiológica do queijo coalho do tipo B;
- Estudar os efeitos do extrato do coentro sobre a qualidade físico – química, microbiológica e sensorial do queijo coalho do tipo B;
- Avaliar a ação do extrato do alho na qualidade microbiológica e tempo de prateleira do queijo coalho tipo B;
- Avaliar a ação dos óleos essenciais de laranja Pineapple e limão Tahiti na qualidade microbiológica e sensorial dos queijos coalho do tipo B.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UM POUCO DE HISTÓRIA

O queijo é um alimento obtido por meio de diversas fontes de leite, podendo ser proveniente de vaca, cabra, ovelha ou búfala, o que dá origem a diferentes tipos de queijos, tais como Mussarela, Prato, Catupiry, Requeijão, Coalho, Minas Frescal, dentre outros.

Quanto à sua origem, não existe uma data precisa, segundo destaca Carvalho *et al.*, (2010) ao afirmarem que este produto “tem seu início perdido num passado de milhares de anos antes de Cristo”. Porém, Beux (2011) destaca que a produção dos primeiros queijos data de 8.000 a.C e de acordo com alguns relatos bíblicos surgiu há vários anos, como citado em Gênesis 18:8 (Capítulo e versículo da Bíblia Sagrada dos cristãos) que menciona, a visita do Senhor a Abraão, onde lhe foi oferecida a coalhada. No Antigo Testamento o queijo aparece como um dos alimentos mais nutritivos para os Hebreus (REZENDE *et al.*, 2005; MAMEDE, 2010; BRUNO *et al.*, 2017).

De acordo com o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2008) uma possível datação para origem do queijo remota a 11.000 a.C. possivelmente sendo descoberto pelos egípcios. Este era retratado em passagens históricas como um alimento dos deuses, oferecido no Monte Olimpo. Algumas correntes históricas atribuem aos povos que viviam na Grécia Antiga como os primeiros a criarem os rebanhos bovino e caprino. Na sua mitologia existe registro que destaca que Apolo, o deus do sol e da luz, teria confiado às Ninfas a ensinar ao seu filho Aristeu a arte de coalhar o leite. Existem relatos que o queijo era fonte alimentar do clero, juntamente com leite e ovos no período medieval (ALBUQUERQUE, 2002; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).

Assim, acredita-se que o consumo de queijo tem início na história no continente Europeu, primeiro na Grécia e, em seguida, sendo difundido pelos romanos à medida que foram expandindo o seu império. Neste continente, alguns dos seus países apresentava clima favorável para a criação do rebanho bovino e

caprino por ser propício para o desenvolvimento de pastagens (REZENDE *et al.*, 2005; MAMEDE, 2010).

Com o passar dos séculos o consumo do queijo vai se estendendo por outros continentes, graças aos diferentes tipos de clima e o surgimento de feiras e mercados, possibilitando a sua fabricação e comercialização em uma gama diversificada de tipos de queijos. Na obra o “Queijo Coalho em Pernambuco: Histórias e Memórias”, Paquereau; Machado; Carvalho, (2016) destacam que a produção do queijo tem como base três descobertas, a saber:

- A primeira foi a obtenção do leite que passou a ser utilizado pelo homem como um componente de sua alimentação desde que surgiu a ideia de ordenhar os animais para beber o líquido.
- Em segundo lugar, a descoberta da influência do fogo e do calor. O leite coalhava e solidificava, escorria um líquido e a coalhada ficava mais consistente. Para acelerar esse processo, mais tarde, se aquecia o leite.
- Na terceira descoberta é mencionado o surgimento do coalho, enzima coagulante que possibilita a transformação do leite em dois novos produtos a coalhada e o soro. Por meio deste processo diferentes tipos de queijo são produzidos.

A origem deste coagulante foi descoberta por acaso quando um viajante armazenou leite em um cantil confeccionado em couro, parcialmente seco, do estômago de carneiro. O viajante percebeu, quando foi tomar o leite, que este havia se transformado em um tipo de pasta com aspecto semelhante a gel. O leite, ao entrar em contato com o tecido estomacal do carneiro, sofreu em uma reação química que modificou as micelas de caseína, promovendo a concentração da proteína do leite e retendo a gordura. O fenômeno de coagulação contribuiu para o desenvolvimento e ampliação de técnicas que possibilitam, ao máximo, a conservação de nutrientes presentes no leite, que permanecerão na composição nutricional do queijo (FOX; BRODKORB, 2008; FERNANDES, 2013; BRASIL *et al.*, 2015).

2.2 COAGULAÇÃO DO LEITE

O processo de coagulação dar-se por meio de duas etapas, a saber:

Etapas I Acidificação

Nesta etapa a coagulação se divide em duas vias, podendo ser obtida por via biológica, fase na qual as bactérias realizam o processo fermentativo, produzindo ácido láctico, ou pode-se aplicar a segunda via que consiste na adição de ácidos orgânicos diretamente ao leite, apresentando como princípio básico a redução do pH devido a adição dos ácidos recorrentes de uma das duas etapas.

Com a diminuição de pH o meio torna-se ácido, sendo fator determinante para que ocorra a solubilização de sais de cálcio e fosfatos que estão presentes nas micelas de caseína, possibilitando a sua migração para a fase aquosa. Nesta etapa ocorre a desmineralização das caseínas, sendo o pH nesse processo de 4,6, ponto considerado isoelétrico para esta substância. Essa etapa é um processo limitado a tipos específicos de queijo (ANTUNES *et al.*, 2004; FIB, 2011; FERNANDES, 2013).

Etapas II: Ação enzimática

Consiste na adição de enzimas denominadas de coalho, que recebem este nome por ser um extrato obtido do quarto estômago de ruminantes. Este órgão contém duas principais enzimas, a quimosina e a pepsina, cujas quantidades variam de acordo com a idade do animal e o tipo de alimentação. Por exemplo, quando se tem um bezerro relativamente novo o teor de quimosina, varia de 80 a 90% enquanto que a pepsina de 10 a 20%. Por outro lado, quando se obtém por meio de um boi mais velho pode-se obter até 90% de pepsina, esta, por sua vez, é menos ativa como coagulante a pH superior a 6,68 e a temperaturas maiores que 44°C, possuindo um tempo de coagulação maior que os coalhos à base de quimosina (ANTUNES *et al.*, 2004; FERNANDES, 2013).

De modo geral, o coalho é obtido logo após o abate do animal. É extraído do abomaso com o auxílio de uma solução de cloreto de sódio (NaCl) de 12 a 20%, seguido por uma filtração e purificação da solução por precipitação salina e seu armazenamento pode ser feito em conserva por dois métodos: por adição de sal ou

de ácido bórico, quando não destinado ao consumo humano; e conservado com glicerina, quando for utilizado pelo homem. As demais etapas para a preparação, padronização e conservação do coalho são bastante diferenciadas a depender do fabricante (FERNANDES, 2013).

Em 1972 foi desenvolvido, nos Estados Unidos, o primeiro coagulante microbiano a partir de um fungo, sendo uma protease ácida. Posteriormente, em 1989 chega ao mercado o coagulante CHY-MAX®, sendo referência de inovação por ser um produto 100% à base de quimosina bovina obtido da fermentação por meio de um fungo. E em 2009, é lançada a geração de quimosina (CHY-MAX® M), superior às demais, por apresentar menor atividade proteolítica e ser bem mais específica para a coagulação. Por meio destes avanços na área de produção de coalhos e devido a diversos fatores, como a biodisponibilidade de coalho bovino, é que existe hoje no mercado coagulantes de origem vegetal, bacteriana e fúngica (FERNANDES, 2013; KETHIREDDIPALLI; HILL, 2015).

Os coalhos microbianos apresentam ação variada dependendo da faixa de pH e do sistema enzimático ou da adição de determinados sais, como por exemplo, NaCl ou cloreto de cálcio (CaCl_2) que adicionados ao leite podem retardar ou acelerar o período de coagulação, a depender de qual microrganismo encontra-se na composição do coalho (KETHIREDDIPALLI; HILL, 2015).

Os coalhos produzidos com extratos vegetais segundo Garcia *et al.*, (2015) não são muito utilizados na coagulação do leite. O extrato de *Cynara cardunculus* L. (cardo selvagem), vegetal mais utilizado na produção de coalho, tem em sua composição a enzima cinarase, sendo muito empregado na produção de queijos em Portugal, como destaca Antunes *et al.*, (2004), ao enfatizar que este é utilizado para coagular o leite para a produção de queijos como o Serra e o Serpa.

2.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO QUEIJO PARA O BRASIL

No Brasil, a produção anual de queijo e requeijão vem crescendo a cada ano. Comparando-se a produção de 2006 (99.329 toneladas) com 2017 (316.453 toneladas), observa-se o aumento significativo na produção. A Tabela 01 apresenta o crescimento da produção de queijo e requeijão.

Tabela 1 - Produção de Queijos e requeijão em toneladas por região do Brasil.

Produção anual em toneladas de queijo e requeijão		
Região	Ano de 2006	Ano de 2017
Nordeste	33 287	57 567
Norte	3 428	15 602
Sudeste	44 351	143 961
Sul	10 908	30 112
Centro – Oeste	7 355	6 9211

Fonte: (IBGE 2006, IBGE 2018).

Essa elevação na produção de queijo promoveu, conseqüentemente, maior geração de renda para o país, porém maior parte dos queijos produzidos ficam em nosso território. Conforme dados divulgados pelo instituto Data-Viva, as importações superam a exportação, sendo, portanto, a responsável pela maior movimentação financeira do setor.

Dentre os tipos de queijo produzidos em solo brasileiro, os do tipo artesanal são os que mais apresentam problemas na comercialização, tanto no próprio país quanto no exterior, devido a preocupações com a qualidade. Se tratando dos queijos artesanais, em 18 de julho de 2019 foram divulgadas as modificações do parágrafo 5º do art. 66 da Constituição Federal, da Lei nº 13.860, no qual consta que:

- *Art. 3º É permitida a comercialização do queijo artesanal em todo o território nacional, desde que cumpridas as exigências desta Lei.*
- *Parágrafo único. Para efeito de comércio internacional, deverão ser atendidos também os requisitos sanitários específicos do país importador.*

As exigências que são citadas na lei se mantêm as mesmas já vigentes desde 2001 para os parâmetros microbiológicos, por meio da RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) Nº 12.

2.4 QUEIJOS BRASILEIROS

Existem mais de setenta tipos de queijos produzidos no Brasil, os quais construíram, ao longo da variação geográfica, forte importância para o desenvolvimento socioeconômico do país.

De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que descreve sobre as normas de Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos no Brasil, é considerado como queijo o material oriundo da coagulação do leite por meio de coalho, podendo também serem aplicadas enzimas ou bactérias específicas, como também ácidos orgânicos, isolados ou combinados, resultando em dois subprodutos a coalhada de massa fresca ou maturada e uma fração de soro. No processo de produção podem ser adicionados corantes, especiarias, condimentos, substâncias aromatizadas, entre outros, desde que não ofereçam danos à saúde (BRASIL, 1996).

Os queijos, aqui no Brasil, passaram a ser produzidos no período colonial com a introdução do rebanho bovino pelos portugueses, ganhando uma modelagem característica, sem semelhança com os produzidos em Portugal. O material usado na coagulação também é diferente do de Portugal, sendo aqui usado o de origem animal (RIBEIRO, 1959; RESENDE, 2011; DALE, 2016).

A história enfatiza que o primeiro queijo artesanal produzido no Brasil foi o queijo Minas. Existe outra linha ideológica que aponta o queijo do Reino como o primeiro a ser produzido, porém era obtido seguindo um modelo industrial. O queijo Minas teve como modelo de inspiração o queijo Edam holandês, sendo elaborado inicialmente na Serra da Mantiqueira, na primeira fábrica de laticínios da América Latina (FOSCHIERA, 2004; FRACASSO; PFÜLLER, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

A Tabela 02 mostra alguns tipos de queijos artesanais brasileiros. Nesse contexto, é importante frisar a diferença entre queijo de origem artesanal e o de origem industrial. O queijo artesanal é visto como o queijo obtido de leite cru, desenvolvido por vias tradicionais, com vinculação e valorização de determinada região ou estado. Já o queijo de origem industrial utiliza metodologias seguras para que o leite a ser empregado na produção do queijo esteja livre de contaminações,

uma vez que o leite é submetido ao tratamento térmico, cujo processo é denominado pasteurização, método que visa destruir bactérias que oferecem risco à saúde humana (FOSCHIERA, 2004; FRACASSO; PFÜLLER, 2014; MARTINS *et al.*, 2015).

Tabela 2 - Exemplos de queijo artesanais de origem brasileira.

Tipos de Queijo	Origem
Queijo Minas Salitre	Serra do Salitre – MG
Queijo Minas Araxá	Araxá – MG
Queijo Minas Canastra	Serra da Canastra – MG
Queijo Minas Serro	Serro – MG
Queijo Colonial	Oeste Catarinense, Noroeste do Rio Grande do Sul e sudoeste Paraná
Queijo Serrano	Nordeste do Rio Grande do Sul e Santa Catarina
Queijos do Marajó	Ilha do Marajó - PA
Queijo Caipira	Mato Grosso do Sul
Queijo Manteiga	Agreste de Pernambuco
Queijo Coalho	Agreste e Sertão de Pernambuco

Fonte: Slow Food, 2015

2.5 QUEIJO COALHO

Dentre os queijos apresentados na Tabela 02, pode-se destacar o queijo coalho, (Figura 01), queijo oriundo da região Nordeste. Com a colonização dessa área geográfica o rebanho bovino foi introduzido na área litorânea, mas, inicialmente, estes animais eram criados apenas para fins de trabalho e fornecimento de carne. Com o crescente destaque da produção de açúcar no mercado externo, era necessária maior demanda de terra para plantio de cana-de-açúcar. Assim, o gado começa a migrar da região de Mata Atlântica para o sertão pernambucano (REIS-FILHO *et al.*, 2008; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).



Figura 1 - Queijo coalho

Fonte: <https://www.deskontao.com.br/queijo-coalho-ipojuca-kg-24594-1007>

A chegada do rebanho bovino ao sertão pernambucano, segundo fontes históricas, trouxe para essa região fonte de produção de riquezas e fator de diferença do contexto social, uma vez que de acordo com Reis-Filho (2013) o *“gado era sinônimo de “status” elevado, pois além de prover a casa-grande com carne vermelha e laticínios, todo o entorno (moradores, colonos e mercado local) também se beneficiava de tal meio de produção”*. Neste contexto, o gado passa a ser usado para a produção de leite a ser empregado para diversas finalidades, dentre essas a produção de queijo coalho, tendo sua origem em Pernambuco e se direcionando para os demais estados do Nordeste brasileiro, tornando-se típico desta região.

O queijo coalho movimenta significativamente a economia da região nordeste, com sua produção podendo ser realizada de modo artesanal, para consumo próprio ou como meio de subsistência familiar, ou de modo industrial, por fábricas que geralmente são de pequeno ou médio porte (ARAÚJO, *et al.*, 2020).

O queijo coalho tem o leite de vaca como sua matéria prima, sendo necessários de 7 a 10 litros de leite, a depender de fatores como temperatura, a alimentação do rebanho, dentre outros, para a produção de 1 kg desse queijo. O Nordeste, ao longo de uma extensão territorial de 1.554.000 km², possui produção anual de queijo coalho que varia de estado para estado (IBGE, 2013). Um dos

fatores que contribui para essa variação em sua produção ao longo do ano está relacionado com o fato de que 62% dessa região encontra-se na parte semiárida, área denominada de “polígono das secas”, ou seja, apresenta um déficit hídrico, acarretando redução no teor de leite produzido (VILELA *et al*, 2016).

Ao longo do percurso histórico de sua criação até os tempos atuais, o queijo coalho passou por diversas fases para se tornar um produto reconhecido até mesmo na própria região Nordeste. Inicialmente, era usado apenas para consumo da própria família ou para presentear pessoas queridas principalmente na semana santa (FRANCO; LANDGRAF, 2008; CARVALHO *et al*. 2010).

Quando o queijo coalho passou a ser trazido do sertão para as regiões que compreendem atualmente Recife e região metropolitana não foi muito bem quisto pela sociedade de elevado poder aquisitivo, ou seja, os senhores de engenho. Mas, alguns estudos apontam que esse, quando maturado, pela ação do próprio calor do sertão, era tão bom quanto os importados. Mas, a partir do século XX, esse produto lácteo passa a superar a concepção de que era um produto inferior. Nesse momento, os produtores passam a investir fortemente, unindo-se com autoridades do Estado de Pernambuco, ligadas à agropecuária, passando a cuidar melhor do gado com a finalidade de produzir leite e carne de boa qualidade (BRUNO, *et al*, 2005; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016).

Perry (2004) destaca que o valor nutricional deste concentrado lácteo é composto de proteínas, lipídios, sais minerais principalmente cálcio, fósforo e vitaminas, principalmente A e B. É caracterizado por apresentar uma massa branca, de formato retangular, consistência semidura, elástica; uma textura compacta e macia de média a alta umidade; de massa semicozida ou cozida, apresentando um teor de gordura entre 35,0 e 60,0%. Apresenta sabor levemente ácido e salgado ou condimentado; crosta fina e sem trincas. Pode ser consumido cru, assado, frito, puro ou como acompanhamento (DUARTE *et al.*, 2005; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016; SILVA *et al.*, 2018).

Antes de 1999, data na qual a Inspeção e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco criaram a legislação para o queijo coalho, este era produzido

artesanalmente, utilizando como matéria prima o leite cru, integral ou desnatado, massa crua prensada, ou não, e maturado. Posteriormente, com a adoção procedimentos industriais na fabricação do queijo, onde é utilizado o leite pasteurizado, integral ou desnatado, foi adotada uma classificação específica para o queijo coalho, sendo o queijo industrializado classificado como Tipo A e o queijo artesanal classificado como Tipo B (BRASIL, 2001; NASSU *et al.*, 2003; GOMES, 2012).

De modo geral, Rezende e Wilkinson (2005); Paquereau, Machado e Carvalho (2016) destacam que o método aplicado para a produção do queijo coalho é relativamente simples não exigindo equipamentos sofisticados. Este produto é um dos principais fatores socioeconômicos da região Nordeste, por ser uma das principais atividades da cadeia produtiva do setor leiteiro inserida na agricultura familiar.

As etapas para a produção do queijo coalho, descritas no fluxograma da Figura 02, são simples e são regulamentadas pelas normas de produção estabelecidas pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de queijo de coalho presente na Instrução Normativa nº 30 (BRASIL, 2001).

Na Etapa I, o leite é coado para remoção de partículas dispersas. Na Etapa II, ocorre a adição do coalho, essa etapa dura um período de 40 a 60 minutos para que a enzima presente realize a hidrólise das ligações peptídicas Phe105-Met106 presentes na k-caseína, originando a para-k-caseína que, por sua vez, liga-se a íons de Ca^{2+} , formando assim, a coalhada (Etapa III). Na Etapa IV, pode-se realizar o corte, para que haja a separação do soro e da coalhada (Etapa V). Aproximadamente 85% da quantidade de leite se transformará em soro, neste é retido aproximadamente 55% das proteínas, sais minerais e vitaminas presentes no leite (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; BRAZIL, 2011; BARROS, *et al.*, 2019).

Na Etapa VI, ocorre a filtração do soro restando apenas a coalhada que será colocada nas formas retangulares de tamanhos específicos. As formas geralmente são de metais, mas encontra-se também as de madeira e de plástico. Posteriormente, ocorre a prensagem para que ocorra a eliminação do soro restante,

essa pode ser feita manualmente, no qual as mãos aplicam uma dada pressão a massa ou pode ser feita em prensas coletivas ou individuais (FERREIRA, 2008; GOMES, 2012).

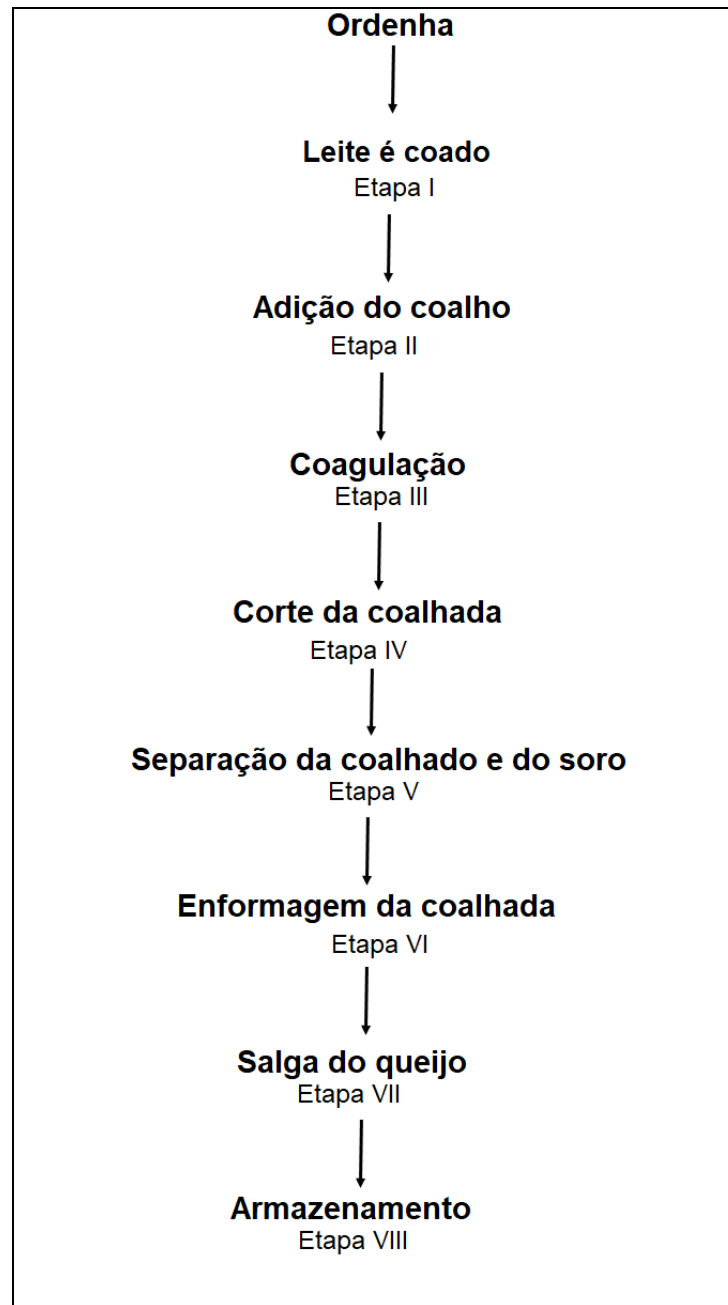


Figura 2 - Etapas envolvidas na produção do queijo coalho.

Fonte: Próprio autor

Na Etapa VII, é adicionado NaCl ao queijo coalho, que é uma etapa importante, por ter relação direta com a atividade de água, uma vez que o concentrado lácteo possui elevada umidade o que ocasiona uma interferência na atividade de água e, conseqüentemente torna-se vulnerável à proliferação de contaminantes microbiológicos. O sal é importante para redução da atividade da água e, conseqüentemente, para impedir maior contaminação do queijo. O teor médio de sal geralmente varia entre 0,5 a 2,5 g, desta quantidade aproximadamente 15% é dissolvido na umidade (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; BARROS, *et al.*, 2019).

O acréscimo de NaCl ao queijo coalho influencia na qualidade da textura, possibilitando melhorais significativas na percepção do gosto e aprimorando o sabor láctico da coalhada fresca. O sal ainda promove alterações na pressão osmótica, possibilitando a liberação do soro, reduzindo a sua umidade e atuando, também, no controle bioquímico da maturação (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009; COSTA *et al.*, 2012).

Após todas estas etapas, o queijo coalho estará pronto para o processo de maturação que consiste em armazená-lo em temperatura variando de 10 °C a 18 °C (Etapa VIII). Nesta fase ocorre o desenvolvimento de sabor, textura e aroma por meio de modificações microbiológicas, bioquímicas, físicas e químicas. Alguns pesquisadores como Cavalcante *et al.*, (2007) e Ferreira, (2008) chamam a atenção para o tempo de maturação do queijo que deve variar de 5 a 10 dias, porém muitos desses são comercializados após o segundo dia de produção e possui um período de validade de 15 dias.

Após sua produção o queijo coalho é comercializado em feiras livres, padarias, supermercados, dentre outros ambientes, podendo ser vendido pelo próprio produtor ou por atravessadores, que são compradores que adquirem o queijo diretamente do proprietário e os revende, comprando os mesmos por um valor discrepante quando comparado ao preço comercializado, principalmente nas capitais (ARAUJO *et al.*, 2020).

No Nordeste, as maiores produções do queijo coalho estão nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. Almeida, Júnior e Guerra (2010) enfatizam que este referido queijo é um patrimônio genuíno da tradição e cultura do estado de Pernambuco.

O queijo do Tipo B produzido com leite in-natura, vem ao longo dos tempos levantando diversas discussões sobre suas qualidades físico-químicas e principalmente biológicas. Um dos principais problemas é a contaminação tanto do leite a ser empregado no processo de produção do queijo quanto durante a sua produção, devido à falta de controle higiênico-sanitário no ambiente em que ocorre a ordenha e produção (PACHECO 2011).

De modo geral, os alimentos de origem animal são propícios a diferentes tipos de contaminação alimentar. Um dos principais fatores é forma inadequada como são manipulados e conservados. Dias e colaboradores (2015) destacam que dentre os produtos mais consumidos pela população, estão o leite cru e seus derivados e enfatizam que por estes terem um alto teor nutricional, estão propícios à proliferação exacerbada de microrganismos, se estes forem guardados de maneira imprópria.

Autores como Nassu, Macedo e Lima, (2006); Pintado *et al.*, (2008) e Dantas, (2012) chamam a atenção para a qualidade microbiológica, devido as condições higiênico sanitárias que, na maioria das vezes, não são levadas em consideração, podendo ocasionar danos à saúde do consumidor. Dentre os principais contaminantes destacam-se os Coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella spp*; *Salmon*, *Staphylococcus aureus*, *Rosenbach*, bolor e leveduras.

2.6 IMPORTÂNCIA HIGIÊNICO-SANITÁRIA NA QUALIDADE DO QUEIJO COALHO

Como já mencionado o queijo coalho tipo B pode ser contaminado facilmente por bactérias do grupo coliformes e *S. aureus*. Estes microrganismos estão presentes no úbere, por exemplo, passando a contaminar o leite durante o processo de ordenha. O estado de manipulação e condições de higiene dos instrumentos usados para obtenção da matéria prima e produção do queijo também são

destacados na literatura como fatores que agregam maior índice de contaminação deste produto (BORGES *et al.*, 2008; FREITAS, 2013).

Neste aspecto, a qualidade microbiológica é um indicador higiênico- sanitário que oferece dados necessários para indicar o quanto o queijo e demais alimentos estão dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para o consumo, prevenindo, assim, doenças veiculadas aos diferentes tipos de microrganismos.

Os coliformes pertencente à família Enterobacteriaceae classificam-se em Coliforme Fecal e Total, podendo estar presente em elevada quantidade por grama de queijo produzido (TORNADIJO *et al.*, 2001; SANTANA *et al.*, 2008).

2.6.1 Coliformes

O grupo de Coliformes, quando presentes em alimentos, é indicador de qualidade microbiológica, e, dependendo de sua concentração no alimento, pode ocasionar problemas à saúde. Dentre os Coliformes totais inclui-se as bactérias com bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que podem ser oriundos tanto do trato intestinal de humanos quanto de animais homeotermos, (sangue quente). Neste grupo encontram-se os gêneros *Escherichia* Castellani & Chalmers, *Enterobacter* Bergey, *Klebsiella* Trevisan, e *Citrobacter* existindo aproximadamente vinte espécies descritas. Estes possuem a propriedade de fermentar a lactose originando gás, quando em meio de cultura, no decorrer de um período de 24 a 48 horas quando mantidos a temperatura de 35 °C, possibilitando assim, em análise, a sua identificação (ETGES, 2011; DANTAS, 2012).

Os coliformes fecais assim, como os totais, são bactérias gram-negativas com estrutura de bacilos, oxidase-negativa *caracterizadas* pela atividade da enzima β -galactosidase. Com a resolução nº 375 apresentada em 17 de março de 2005 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) este grupo passa a se chamar também de Termotolerantes, uma vez que coliformes fecais se restringia apenas às enterobactérias de origem fecal, sendo a *Escherichia coli* a mais conhecida. Com isto, passa a fazer parte desse conjunto as bactérias não fecais, como as cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* (CASTANHEIRA, 2012).

Para identificação de coliformes termotolerantes usa-se o meio caldo EC (*E. coli*), possui a capacidade de fermentar a lactose, promovendo a formação de gás no decorrer de um período de 24 a 48 horas, a uma temperatura de 45 ± 1 °C.

É importante frisar que *E. coli*, quando presente no intestino, não ocasiona danos à saúde, por ser este órgão habitat normal para a mesma. No entanto, se estas bactérias estiverem presentes no queijo, irá promover a sua deterioração, promovendo mudanças visuais em sua estrutura devido ao processo fermentativo anormal, além de inchaço precoce (APOLINÁRIO *et al.*, 2014; O'BRIEN *et al.*, 2009).

Forsythe (2002) aponta os coliformes como indicador significativo da presença de contaminação em alimentos e água, salientando que estes podem ser eliminados sob ação do calor. Porém, nem sempre o processo de pasteurização do leite a ser usado na produção do queijo significa que ocorrerá a eliminação destes. Os autores Nunes, Mota e Caldas (2013) e Salotti *et al.*, (2006) relatam que durante a pasteurização podem ocorrer falhas no processo, erro na manipulação e a falta de procedimentos higiênicos, como não lavar as mãos de maneira correta.

Apolinário e colaboradores (2014), ao avaliarem 31 amostras de queijo Minas Frescal submetidos ao processo de pasteurização e produzidos por diferentes indústrias da região da Zona da Mata Mineira, comprovaram a presença de contaminantes microbiológicos como Coliformes Total e Termotolerantes. Os autores constataram que 77,4 % (24 amostras) estavam além do limite para coliformes totais e 54,8 % (17 amostras) apresentou valor superior ao determinado pela legislação para coliformes termotolerantes.

Em estudo desenvolvido por Santana *et al.*, (2008), que teve por finalidade avaliar a existência de contaminação por coliformes em 60 amostras de queijo coalho foi realizado, em um período de quatro meses, com queijos vendidos em quinze pontos comerciais no Mercado Central de Aracaju, SE. Os autores observaram que 90,0% das amostras apresentaram valor superior ao permitido pela legislação ($5,0 \times 10^2$ NMP/g) para coliformes termotolerantes e valores superior a 93,3 % para coliformes totais, evidenciando que os queijos comercializados são impróprios para consumo naquela localidade.

Alves (2009), analisou trinta (30) amostras de queijo coalho artesanal, obtidas no comércio informal de São Luís, MA. A quantificação de coliformes totais e termotolerantes evidenciou-se que dezenove amostras apresentaram valores acima de 10^3 NMP/g (número mais provável por grama), destas, duas apresentaram valor de NPM/g superior a ordem de 10^7 para coliformes totais. Já para os coliformes termotolerantes, constatou-se que vinte amostras estavam irregulares, das quais dez continham valores acima de 10^7 (ALVES, 2009).

Em estudo que teve por finalidade determinar a presença de coliformes totais e termotolerantes em vinte amostras de queijo coalho, produzido sem o processo de pasteurização, obtidas de cinco pontos coletadas semanalmente em Souza – PB, permitiu a Bezerra e colaboradores (2017) diagnosticar que das 20 análises realizadas apenas duas não apresentaram coliformes totais. Se tratando dos coliformes termotolerantes, foi encontrando sete (35 %) das amostras com contagem acima do limite permitido pela legislação brasileira (5×10^2 NMP/g). Escobar *et al.*, (2016) também observaram contaminação por coliformes termotolerantes em queijos artesanais produzidos no município de Zacazonapan, Estado do México.

2.6.2 *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884)

Dentre as trinta e três espécies que englobam o gênero *Staphylococcus* Rosenbach 1884, destaca-se o *S. aureus* bactéria, com formato esférico, é pertencente à família Micrococcaceae, grupo dos cocos gram-positivos. Esta bactéria é um contaminante bastante frequente em queijos e é extremamente prejudicial à saúde.

Apresenta grande interesse de estudo, principalmente na área da medicina e de alimentos, uma vez que essa bactéria pode tornar-se patogênica e consequentemente ocasionar uma dada variedade de infecções, mesmo estando presente naturalmente na pele humana e em outros sítios anatômicos. Quando estão presentes em quantidades elevadas, (10^5 - 10^6 UFC (Unidade de Formação de Colônia) por mL^{-1} ou g^{-1}), em temperatura, pH, atividade de água e O_2 dentro dos padrões adequados para a sua sobrevivência, começaram a produzir enterotoxinas estafilocócicas nos alimentos que, após a ingestão, provocarão intoxicação

(CASSETTARI *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2008; GELATTI *et al.*, 2009; SALES; SILVA 2012).

Segundo Santos (2007) os *S. aureus* podem ser responsáveis desde o surgimento de espinhas, furúnculos e celulites até o desenvolvimento de infecções como pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia, dentre outras. É importante frisar que essa bactéria pode ser encontrada em diversos locais podendo ser transportada por um prolongado tempo nas partículas de poeira, resistindo a dessecação e ao frio. Tem no homem seu principal abrigo, estando disponível em diversas partes do corpo (intestino, garganta, dentre outras), sendo as narinas seu local preferido. Pode estar presente em 40% da população adulta, seguido de hospitais e em uma gama vasta de alimentos (CASSETTARI *et al.*, 2005; KEKLIK *et al.*, 2009; SILVA, 2012).

Apesar de ser um microrganismo mesófilo, *S. aureus* pode apresentar temperatura de crescimento adequada entre 7 e 47,8 °C e o pH do meio para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5. Feitosa e colaboradores (2017) destacam que estes microrganismos em alimentos podem multiplicar-se em uma faixa de pH de 4,2 a 9,3. Estes podem apresentar-se resistentes a diversos antimicrobianos, tornando assim, mais difícil seu tratamento e sua eliminação nos alimentos antes de chegar à mesa dos brasileiros. Este microrganismo possui a característica de produzir exoproteínas que provoca o desenvolvimento de doenças no hospedeiro. Essa resistência aos antibióticos começou a ser identificada com o passar dos tempos e possibilitou aos estudiosos evidenciar mutações de seus genes ou a aderência de outros genes de bactérias oriunda do mesmo gênero que proporcionaram a sua sobrevivência (GILLET *et al.*, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2005).

A RDC de nº 146 estabelece como limite máximo aceitável para estafilococos coagulase positiva $1,0 \times 10^3$ UFC/g ou 3log UFC/g. De acordo com as pesquisas a serem apresentadas adiante, pode-se constatar preocupantes contaminações de amostras de queijos por este microorganismo. Como exemplos de casos de contaminações por queijo no Brasil, destaca-se o caso ocorrido em Ouro Preto, MG em julho de 1987 com o queijo Minas. Uma família composta por quatro membros lanchou em uma mercearia e apresentaram sintomas semelhantes aos ocasionados

por *S. aureus*. A avaliação do queijo pela Universidade Federal de Ouro Preto evidenciou contaminação da amostra com teor de $9,3 \times 10^7$ UFG/g, deste patógeno, sendo comprovando cepas produtoras de enterotoxinas do tipo A, B, D e E. Constatou-se também elevado número de coliformes fecais ($1,1 \times 10^5$ /g NMP) estando esse teor além do limite permitido (SABIONI *et al.*, 1988).

Outro caso, ocorreu em 1996 em uma confraternização de natal em um restaurante na cidade de Belo Horizonte, MG, no qual clientes que consumiram queijo e outros alimentos tiveram diagnóstico de intoxicação por *S. aureus*, sendo constatado um nível de contaminação superior a 10^6 UFCg⁻¹. Na cidade de Pará de Minas, MG, algumas pessoas foram diagnosticadas com toxinfecção alimentar ocasionado por ingestão de queijo tipo Minas frescal, ocasionado por *S. aureus* coagulase positiva, *Salmonella* e coliformes fecais (BARRETO; COSTA, 1998, FEITOSA *et al.*, 2017).

Alves, *et al.*, (2009) avaliaram 30 amostras de queijo coalho produzidos na cidade de São Luís do Maranhão de forma *in natura* e concluíram que sete amostras estavam com valores superiores ao estabelecido pela legislação. Bezerra *et al.*, (2017), realizaram um estudo, onde, no decorrer de um mês foram coletadas, semanalmente, cinco amostras de queijo coalho, produzidos de modo *in natura*, comercializados na feira livre da cidade de Souza, PB. Os autores observaram que 65 % (13) das amostras possuíam concentração de *S. aureus* acima de 5×10^3 NMP/g, ou seja, superior ao limite estabelecido pela legislação.

2.6.3 *Salmonella* spp.

Dentre os microrganismos que podem habitar os alimentos destacam-se o do gênero *Salmonella* responsável por transmitir a toxinfecção alimentar conhecida como Salmonelose, sendo essa vista como um dos mais importantes problemas de saúde pública em escala mundial. Este gênero é composto de duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Na primeira espécie, encontra-se a responsável por graves intoxicações alimentares (ORTOLANI *et al.*, 2007; SHINOHAR, 2008; DEMIRCI *et al.*, 2019).

A depender de fatores como pH, acidez, atividade de água, potencial de oxidação e da composição química dos alimentos, pode-se ter um excelente meio para crescimento e propagação de diversos microrganismos, principalmente quando o meio externo oferece condições adequadas de temperatura e umidade.

A RDC nº 12 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estabelece os parâmetros para os atributos microbiológicos dos alimentos e afirma que esse deve estar ausente nos produtos lácteos. Porém, a literatura relata a presença deste em amostras de queijo coalho como evidenciado por Mendes *et al.*, (2001), os quais constataram que 73,3 % das amostras, comercializadas na cidade do Recife, testaram positivo para o referido microrganismo.

Bezerra *et al.*, (2017) evidenciaram em amostras de queijo coalho comercializados em Souza, PB, a presença de *Salmonella* spp. em 40% das amostras avaliadas. Souza *et al.*, (2014) testaram 104 amostras de queijo coalho comercializado em diversas regiões do Nordeste e concluíram que apenas uma amostra estava contaminada. A presença dessa bactéria também foi constatada em outros tipos de queijo como queijo-de-minas comercializado nas feiras livres de São José do Rio Preto, SP (PERESI *et al.*, 2001).

Na avaliação realizada por Wolupeck *et al.*, (2012) com queijo Minas Frescal comercializados em Curitiba, observou-se ausência de *Salmonella* em todas as amostras. Isso foi constatado por Pereira *et al.*, (2017), que observaram a ausência desse microrganismo nas amostras de queijo coalho produzido artesanalmente em São Rafael, RN.

Evangelista-Barreto *et al.*, (2016) ao analisarem amostras de queijo coalho comercializado em Cruz das Almas, BA, não detectaram a presença de *Salmonella* nesse concentrado lácteo. Esses trabalhos evidenciam que quando há cuidados com as boas condições de higiene e sanitária no processo de produção, é possível se evitar a contaminação por esse microrganismo.

2.6.4 Bolor e leveduras

Dentre o grupo dos fungos, destaca-se as leveduras, com mais de 500 espécies identificadas. São seres eucarióticos, unicelulares, com forma variada, de esférica a ovóide, cilíndrica ou triangular, com tamanho variando de 1 a 5 μm de diâmetro e comprimento na faixa de 5 a 30 μm , podendo estas se reproduzirem de forma sexuada ou assexuada. São disseminadas por insetos vetores, ação dos ventos e com crescimento favorecido em meio ácido. Os bolores também inseridos neste grupo são microrganismos pluricelulares, filamentosos (suas hifas podem ou não conter septos), estão presentes na matéria orgânica em decomposição, no ar, solo e água (FRANCO; LANDGRAF, 2005; JAY 2005).

A legislação brasileira não estabelece um padrão normativo para o número de bolor e leveduras presente em amostras de queijo coalho, porém esse é um forte indicador de qualidade dos produtos alimentícios, pois são responsáveis pela promoção da deterioração e mudanças na aceitabilidade, não apenas do queijo como dos demais alimentos (KAMLEH *et al.*, 2012; BONY *et al.*, 2016).

Bony *et al.*, (2016) constaram que o queijo, durante o período de armazenamento, apresentou elevação no número de fungos e afirmaram que este fato também é devido ao valor de pH encontrado para as amostras analisadas. Feitosa *et al.*, (2003) determinaram uma variação de $1,9 \times 10^4$ e $4,8 \times 10^8$ UFC/g em amostras de queijos fabricados no Rio Grande do Norte, concentração esta muito alta, o que caracteriza que este queijo entrou em processo de deterioração em um período menor que o estabelecido para sua validade.

Em sua pesquisa, que teve por finalidade avaliar os bolores e leveduras presentes em 30 amostras de queijo de coalho comercializados em São Luís, MA, Alves *et al.*, (2009) concluíram que 76,6 % das amostras estavam com valores superior a 10^5 UFC/g evidenciando que esses queijos estavam com propriedades higiênico-sanitárias indesejáveis.

El-Bakry *et al.*, (2011) realizou um estudo que teve por finalidade avaliar a influência da adição de Cloreto de Potássio (KCl), ao invés de NaCl, no queijo coalho e sua relação com alguns fatores microbiológicos. Os resultados

possibilitaram a estes autores constatarem um aumento significativo na contagem de bolor e leveduras para aqueles com menor teor de KCl ao longo do processo de maturação.

Santos, Nogueira e Cunha (1995) encontraram um teor de bolor e leveduras variando de $1,4 \times 10^6$ a $5,2 \times 10^9$ UFC/g no queijo coalho produzido em Fortaleza, CE, e afirmaram que esses altos índices são fortes indícios de contaminações no queijo.

2.7 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO COALHO

O queijo coalho artesanal apresenta grande variação nas suas características físico-químicas, devido à falta de padronização e também pela composição do leite. Os principais fatores de maior influência para esses padrões são: pH, atividade de água, umidade e acidez titulável. Souza *et al.*, (2014) enfatizam que a legislação brasileira não preconiza valores de referência para tais parâmetros, porém estes são de suma importância, por ter relação direta como um dos fatores que contribuem para ocorrência da degradação microbiana do queijo.

O pH (potencial Hidrogeniônico) é um fator importante, pois dependendo de qual seja o seu valor irá influenciar no crescimento de microrganismos, devido as reações químicas decorrentes. Exerce relação direta na textura, no sabor e no aroma. Normalmente o queijo apresenta um pH levemente ácido com valor variando de entre 5 e 6, sendo assim, propício para a proliferação de microrganismos contaminantes (MUNCK, 2004; SOUSA *et al.*, 2014).

O pH e a acidez titulável são métodos físico-químicos de análise que possuem relação direta com a degradação microbiana do alimento, degradando a lactose que é metabolizada a ácido láctico. Esse é produzido a partir da degradação da lactose pelas bactérias, tendo assim interferência no pH, dessoragem da massa na produção do queijo e na expulsão de soro da massa. No queijo o teor de acidez pode variar em uma faixa entre 0,11 a 1,01 na maioria das vezes (FREITAS- FILHO *et al.*, 2009).

O queijo coalho é classificado como produto de média a alta umidade; será de média umidade quando apresenta variação de $39 \% < \text{umidade} < 46 \%$; e de alta

umidade quando se encontra em uma faixa de $46 \% < \text{umidade} < 55 \%$. Esse tem o seu teor variando muito de acordo com o tempo de maturação. Silva *et al.*, (2010) observaram que o queijo comercializado na cidade de Natal, RN, apresentou uma variação de umidade de 45,5% a 51,5%, estando esse na faixa entre média e alta umidade. Como já mencionado por não haver um padrão normativo em sua produção, em documento, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho preconiza que esse deve estar ao menos entre 35 a 60% (BRASIL, 2001).

Freitas - Filho *et al.*, (2009) pontuam que a umidade exerce relação direta com a atividade de água (Aa), sendo essa uma medida qualitativa que possibilita averiguar a disponibilidade de água livre suscetível a diversas reações, ou seja, é a quantidade de água presente no queijo que irá reagir com microrganismos: quanto maior o seu teor, mais propício ao desenvolvimento rápido dos microrganismos, como bactérias, leveduras e bolores, estará o queijo, estando esse parâmetro ligado diretamente com à conservação desse concentrado lácteo.

Como visto os fatores físico-químicos interferem na qualidade do queijo coalho exercendo influência na qualidade microbiológica, essa que por sua vez apresenta diversos fatores que contribui para deterioração do queijo e possíveis problemas de saúde para os consumidores. Diante disso são grandes as chances de existir alteração na carga microbiológica, o que implica em alterações físico-químicas e sensoriais do queijo coalho Tipo B, de acordo com autores como Catao e Ceballos (2011); Feitosa *et al.*, (2003) e Paquereau, Machado, Carvalho, (2016). Em consequência da necessidade de boas condições higiênico-sanitárias, o queijo pode apresentar alto índice de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico.

Neste sentido, é importante a adoção de métodos que controlem a carga microbiológica e aperfeiçoe a qualidade sensorial e físico-química do queijo coalho Tipo B. Assim, tem-se nos produtos naturais uma forma de promover o aperfeiçoamento de produção em escala caseira ou industrial.

Dentre os diversos Produtos Naturais destaca-se o Velame do Campo (*Croton campestris*), coentro, alho, o óleo da casca da laranja e do limão que apresentam

ação microbiológica em estudos realizados com outros produtos, além de conterem compostos ou elementos químicos que contribuem para a saúde, e outras diversas funções relevantes para a sociedade.

2.8 ALTERNATIVAS PARA MELHORIAS NA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO COALHO TIPO B

A seguir será apresentado algumas alternativas de produtos naturias que podem ser usados como alternativa para aprimorar a qualidade do queijo coalho.

2.8.1 Velame do campo

O velame do campo (*Croton campestris*) (Figura 03), pertence à família Euphorbiaceae e seu gênero apresenta entorno de 700 espécies. Planta nativa do Nordeste apresentando tamanho de 1 a 2 metros de altura, podendo também ser encontrada no Sudeste, porém seu crescimento é favorecido em regiões quentes e raramente se desenvolve em locais de clima frio (CORRÊA, 1975; HELUANI *et al.*, 2000; BRITO – JUNIOR *et al.*, 2015).

As folhas e as raízes do velame são submetidas em infusão ao longo dos tempos na medicina popular nordestina para o tratamento de distúrbios gástricos (gastrite), inflamatórios, respiratórios e no tratamento contra vermes intestinais. Porém, na literatura existem poucos estudos sobre as aplicações tanto das suas folhas quanto raízes voltadas para a área de conservação de alimentos (SANTOS *et al.*, 2010; BRITO - JÚNIOR *et al.*, 2015).



Figura 3 - Velame do campo (*Croton campestris*).

Fonte: https://www.programasaudetotal.com.br/plantas_deaaz/ler/velame-do-campo

Em estudo que tinha por finalidade avaliar a ação do extrato da raiz do velame do campo frente a atividade antiúlcera gástrica levou a Brito - Junior *et al.*, (2015) a concluírem que ocorreu uma redução significativa nas lesões gástricas ocasionadas em camundongos por etanol e etanol acidificado.

Mafra (2017) identificou os constituintes químicos e avaliaram a ação do óleo essencial das folhas frescas do velame do campo frente a células tumorais de mama (MCF-7) e cólon (HT-29). Os pesquisadores obtiveram na análise por cromatografia gasosa com espectrometria de massa, observando que os compostos (Z) – cariofileno e γ -elemeno são os componentes majoritários. Os autores concluíram que este óleo possui elevado potencial contra essas linhagens de células tumorais.

Tintino e colaboradores (2018) ao analisarem o potencial anti-inflamatório e a toxicidade do óleo essencial das folhas frescas do velame do campo observaram que estas não apresentaram toxicidade clínica relevante e que os principais constituintes químicos, são o β -cariofileno, seguido do 1,8-cineol e o germacreno-D.

O óleo dos ramos e das folhas frescas do velame foram extraídos por hidrodestilação e submetidos à análise fitoquímica. Constatou-se como principais componentes das folhas o β -cariofileno e biociclogermacreno e, para os ramos,

constatou-se o β -cariofileno e espatulenol em maior concentração. (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Coutinho *et al.*, (2011) evidenciaram atividade antibacteriana do extrato metanólico e hexanólico das folhas do velame do campo frente a cepa SA1199B produzida pelos *S. aureus*, tanto individualmente quanto combinados com o antibiótico Norfloxacino. Os autores ressaltam que dados mais significativos foram expostos a partir da combinação do extrato com o antibiótico com ressalva para a mistura hexano – norfloxacino.

2.8.2 Coentro

O Coentro (*Coriandrum sativum* L.) (Figura 04), é pertencente à família Apiaceae, com origem na região leste do mediterrâneo e oeste da Ásia. Planta anual, com propagação apenas por sementes, pode atingir até um metro de altura. Suas folhas são alternas (possui uma folha por nó), do tipo pinada, ou seja, formato de uma pena, de cor verde. Suas flores são pequenas e seu caule é ereto e os frutos são aquênios estriados (normalmente são secos e apresenta apenas uma semente) na fase madura são divididos em dois mericarpos (LORENZE; MATOS, 2002; WYK; WINK, 2004; WEI *et al.*, 2019).

O coentro tornou-se essencial na cozinha dos brasileiros como ingrediente principal de diversos pratos. Este invadiu esse espaço no dia a dia por ser uma erva com vasto benefício para saúde, apresentando propriedades antioxidante e antimicrobiano, favorecendo a digestão, redução de gases intestinais e cólicas. Atuando, como regulador do apetite e atua contra ansiedade e nervosismo e tem ação antidiabética. É rico em compostos químicos como taninos, pectinas, flavonóides (quercetina, apigenina, rutina e kaempferol), cumarinas e fenilpropanóides. Pesquisa evidencia sua ação como desintoxicante do metal pesado chumbo (LORENZI; MATOS, 2002; ZANUSSO - JUNIOR, 2004; SAHIB *et al.*, 2013; WEI, *et al.*, 2019).



Figura 4 - Coentro (*Coriandrum sativum* L.)

Fonte: https://www.freepik.com/free-photo/vegetable-green-bunch-parsley-background_1089474.htm.

Lopes *et al.* (2014) observaram que os seus compostos fitoquímicos são quercetina, ácido cafeico, cineol, geraniol, borneol, α -terpineno, β -caroteno, β -pineno, β sitosterol, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, γ -terpineno, campferol, limoneno, mirceno, ácido p-cumárico, p-cimeno, rutina e ácido vanílico. Autores como Wangensteen *et al.*, (2004) e Dias (2011) afirmam que essa hortaliça tem ação anti-inflamatório, anti-séptica e anti-diabética.

Diversos estudos vêm apontando a importância do coentro, como o realizado por Priyadarshi *et al.*, (2015) que evidenciaram maior atividade no combate de radicais livres para os extratos etanoicos de até $62,79 \pm 1,36\%$ a mais quando comparado com hidroxianisol butilado a 95%. Estes também realizaram a sua caracterização fitoquímica constando a presença de compostos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, clorofila A e B, dentre outros.

Em pesquisa que tinha por finalidade avaliar a ação do extrato do coentro frente a insuficiência cardíaca, induzida em ratos por meio da aplicação de isoproterenol, levou a Dhyani e colaboradores (2018) a concluírem que o referido extrato promoveu melhoras nas funções do ventrículo esquerdo (região que sofreu o

comprometimento) e nos parâmetros hemodinâmicos. Sendo assim, este atua significativa contra insuficiência cardíaca.

Resende, Ferreira e Souza (2015) encontraram os compostos (2E) -decenal e decanal como compostos em maior concentração presente nas folhas e caules do coentro. Delaquis *et al.*, (2002), na avaliação do óleo obtido da folha da referida planta, além dos dois compostos citados anteriormente, detectou o linanol como composto majoritário com porcentagem de 25,9%. Os autores também destacam que as folhas foram eficazes no controle de *Listeria monocytogenes*. Segundo Camargo e Vasconcelos (2014) o linanol na medicina popular possui efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, hipotensores, vasorrelaxantes, antinociceptivos e atividade antimicrobiana.

Freires *et al.*, (2014) investigaram a ação do óleo essencial do coentro contra o fungo cândida (*Saccharomycetales*), o causador da infecção fúngica da cavidade oral, e constaram uma possível atividade sinérgica. Nanopartículas de prata contendo extrato das folhas de coentro foram produzidas para avaliar a sua ação em conjunto na eliminação de algumas bactérias. Neste trabalho, constatou-se uma inibição dos *S. aureus*, *Pasteurella multocida* e *Enterobacter aerogenes* (ASHRAF *et al.*, 2018).

2.8.3 Alho

O alho (*Allium sativum* L.), (Figura 05), de origem Asiática, é uma hortaliça da família Alliaceae, as suas folhas são alongadas, estreitas e cerosas. Dependendo da forma que seja cultivado pode alcançar até 60 cm de altura. Durante o processo de plantio, ocorre a formação do bulbo, popularmente chamada de “cabeça de alho”, podendo produzir até 20 partes em um único bulbo. Este é amplamente conhecido no Brasil por sua aplicação na culinária e devido suas propriedades farmacológicas (BATATINHA *et al.*, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2017).



Figura 5 - Alho (*Allium sativum* L.)

Fonte: <https://drocha.com.br/alho/>

No Brasil, a sua introdução do alho remota ao descobrimento, pois, de acordo com os relatos, o *A. sativum* já fazia parte da culinária das caravelas portuguesas. O país vem se destacando nos últimos anos como um dos maiores consumidores per-capita de alho, aproximando-se de 1,5 Kg/habitante/ano. A maior produção deste (aproximadamente 95%) se concentra nos estados de Minas Gerais, Goiás, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Bahia, com exceção deste último, os demais possuem clima mais adequado para o crescimento. Porém, devido a aperfeiçoamento de técnicas de cultivo a Bahia consegue se destacar, sendo o maior produtor da região Norte e Nordeste. Devido à alta demanda de consumo, é necessário importar este produto de outros países com ênfase para China e Argentina (MASSON, 2007; CHOUDHARY; JANI; SHARMA, 2018; BURIAN; SACRAMENTO; CARLOS, 2017).

Na Índia quarenta pacientes com síndrome metabólica (conjunto de fatores que elevam o risco de doença cardíaca, acidente vascular cerebral e diabetes) passaram a ser tratados com 100 mg de alho cru por kg de peso corporal, 2 vezes ao dia por 4 semanas. Constataram-se efeitos benéficos sobre os componentes da síndrome metabólica com redução significativa para circunferência da cintura, pressão arterial sistólica e diastólica, triglicerídeos dentre outros fatores avaliados. Estes resultados levaram a Choudhary, Jani e Sharma (2018) concluírem que o alho

pode ser usado como medicamento, tanto na prevenção quanto no tratamento de portadores da síndrome em questão.

Estudos pontuam que o alho possui como princípio ativo a alicina, substância responsável pela maior parte das atividades biológicas que esse tempero possui, apresentando ações bactericidas, antifúngicas e antivirais. Trabalhos experimentais apontam que o alho apresenta potencial no tratamento da hipertensão leve, atua na redução da hipercolesterolemia e previne a aterosclerose (BURIAN; SACRAMENTO; CARLOS, 2017; GILENO, 2020).

A ação antifúngica do alho frente ao *Sporothrix schenckii*, micose que pode afetar animais e humanos, foi avaliada em camundongos suíços infectados e por meio do teste de concentração inibitória mínima e das unidades formadoras de colônias, pôde-se observar que os infectados que fizeram a ingestão do alho apresentaram melhoras significativas. Assim, os dados evidenciam que essa hortaliça possui potencial frente ao fungo estudado (BURIAN; SACRAMENTO; CARLOS, 2017).

O extrato metanólico do alho foi testado no tratamento de cistos hidáticos (doença parasitária causada pela larva do verme *Echinococcus granulosus*) em camundongos infectados. Chegou-se à conclusão de que o extrato apresentou ação benéfica no tratamento (HAJI-MOHAMMADI; HEIDARPOUR; BORJI 2018).

O extrato aquoso do alho, segundo Souza e Soares (2013), apresentou controle de 100 % para o crescimento micelial e a esporulação in vitro de *Aspergillus niger* nas concentrações a partir de 3000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Venturoso et al., (2011) aponta que o extrato aquoso de alho apresenta excelente atividade antifúngica principalmente frente *Penicillium* sp., *Colletotrichum* sp. dentre outros.

2.8.4 Limão Tahiti

O limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka), (Figura 06), é um híbrido da lima ácida, da família Rutaceae, gênero *Citrus* e recebendo esta denominação por ter sua origem nas ilhas do Tahiti. É uma planta de porte alto, com suas folhas de cor verde-escura. Seus frutos são ovais ou levemente elípticos, de base arredonda, com cascas geralmente fina, com superfície lisa e de coloração amarelo pálido na fase de

maturação, composta por duas frações distintas o “flavedo” ou epicarpo e o “albedo” ou mesocarpo. Estes se desenvolvem sem a produção de sementes, sendo raros as vezes em que produzem apenas uma (RAMOS *et al.*, 2002, KUMMER *et al.*, 2013).

O limão Tahiti destaca-se no Brasil pela sua contribuição econômica, por ter uma elevada produção, quando comparada com as demais frutas cítricas, decorrente de seu rápido desenvolvimento. Sendo assim, uma cultura rentável principalmente em regiões quentes, sendo o crescimento deste afetado pela temperatura; nas localidades frias seu desenvolver é mais lento que nas regiões quentes (IBGE, 2014; Carvalho *et al.*, 2016).

As aplicações do limão Tahiti são relativamente ligadas ao segmento alimentício e na medicina popular. No segmento alimentício, é usado na produção de massas, bolos, balas e sucos; já na medicina popular, é utilizado para redução de gordura, controle de reumatismo e de náuseas e no tratamento de gripes e escorbuto por ser uma excelente fonte de vitamina C, a qual, por sua vez, encontra-se presente nas diversas partes desse fruto, em concentrações variadas (MENDONÇA *et al.*, 2006; BRITO *et al.*, 2017).



Figura 6 - Limão Tahiti (*Citrus latifolia* Tanaka)

Fonte: <https://anba.com.br/com-vitamina-c-limao-taiti-lidera-exportacao-de-citricos/>

Em estudo com finalidade de avaliar a ação anti-inflamatória do óleo essencial do limão Tahiti, Kummer *et al.*, (2013) observaram uma ação positiva deste. O mesmo foi verificado por Amorim *et al.*, (2016) que também avaliaram a ação anti-inflamatória do óleo das cascas desse fruto e obtiveram resultados significativos.

O óleo essencial do limão contém em sua constituição os compostos β -pineno, γ -terpineno, citral e limoneno, alguns estudos atribuem a estes dois últimos a propriedade antibacteriana frente a *E. coli* Theodor Escherich e *S. aureus*.

Castro e Lima (2011) destaca que o óleo essencial do limão Tahiti possui expressivo potencial antifúngico e Ramos *et al.*, (2016) constataram que o óleo do limão apresentou ação fungicida frente a *Colletotrichum gloeosporioides* na concentração mínima de 6,25%.

2.8.5 Laranja Pineapple

O Brasil é reconhecido como um dos maiores produtores de laranja e de seu suco concentrado a nível mundial. Estudos apontam que essa é nativa da Ásia, contudo a região onde cresceu a primeira laranjeira é motivo de contradições entre os estudiosos na área. Pesquisas apontam que a mesma nasceu como uma fruta amarga na China, tendo como possível datação no período de 2500 A.C. Existem evidências de achados de raízes em Assam, na Índia e em Myanmar (NEVES *et al.*, 2010; ZULIAN; DÖRR; ALEMIDA, 2013; TORRE *et al.*, 2019).

As laranjas, no Brasil, chegaram pelas mãos dos portugueses que as obtiveram da Espanha, sendo essas inicialmente plantadas no território brasileiro com a finalidade dessa atuar no tratamento de escorbuto, justamente por ser excelente fonte de vitamina C. A laranja apresentou um excelente desenvolvimento no território brasileiro e estudiosos afirmam que a mesma foi confundida como planta nativa, originando a partir daí na cidade da Bahia uma variedade particular denominada de Laranja Bahia a qual deu início à citricultura na agricultura brasileira, sendo as suas mudas transportadas para os demais regiões (ANTONIOLLI; CASTRO; KLUGE 2003; NEVES *et al.*, 2010; TORRE *et al.*, 2019).

Existem no Brasil diversas variedades de laranja, tais como laranja-Bahia, laranja-pêra, laranja-lima, laranja-seleta, laranja Pineapple e laranja-da-terra, que proporcionou a introdução de alternativas que permitiram ampliar a sua faixa de uso na produção de sucos, doces, seu consumo in natura, dentre outros. É uma fruta que possui uma excelente biodisponibilidade de vitamina C, além de outras vitaminas tais como A, B1, B6 e B3, além de ácidos orgânicos, açúcares, carotenoides (xantofilas e carotenos) e diversos compostos aromáticos. Contribui para o desenvolvimento dos ossos e dentes, na cicatrização das feridas e queimaduras, ótima aliada do organismo na resistência às infecções (ANTONIOLLI; CASTRO; KLUGE, 2003; ASGARY; KESHVARI, 2013).

Dentre os diversos tipos de laranjas produzidas no Brasil destaca-se a laranja Pineapple (Figura 07) recebendo essa denominação uma vez que sua copa possui uma forma cilíndrica semelhante ao fruto do abacaxi, com um porte alto, sendo essa um clone nucelar oriundo da Flórida, EUA. As sementes foram trazidas para o Brasil pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) especificamente pela unidade “Embrapa Mandioca e Fruticultura” situada na cidade de Cruz das Almas – BA, obtidas em Riverside, Califórnia, EUA. Esse clone se revela com planta de maturação precoce, favorecendo-a como uma excelente fonte altamente produtiva, justamente por se desenvolver em um menor período que outras espécies de laranjas (EMBRAPA, 2018; TORRE *et al.*, 2019).



Figura 7 - Laranja Pineapple

Fonte: <https://loja.mondiniplantas.com.br/muda-de-laranja-pineapple-lanaamento>.

O cultivo da laranja Pineapple acontece amplamente no Nordeste brasileiro, e seus frutos são utilizados para consumo *in natura* e processamento de suco. Esse híbrido pode produzir em torno 40,0 t de frutos por hectare. Sua planta possui altura 7,3 m e diâmetro 7,8 cm com frutos de tamanho médio pesando em torno de 240g, cada unidade, podendo conter até 9 sementes por laranja. Sua polpa possui sabor doce, de cor laranja claro não uniforme e sua casca de cor e ligeiramente amarelo (EMBRAPA, 2018).

Autores como Espina *et al.*, (2011) e Min *et al.*, (2014) apontam que as cascas das laranjas possuem ação bacteriana. Por serem ricas em polifenóis, estes compostos podem penetrar a membrana celular reagindo com o citoplasma ou com as proteínas presente nas células.

Jabeen *et al.*, (2018) avaliaram a ação bacteriana do extrato metanólico oriundo da casca de laranja frente a 06 cepas obtidas de 20 pacientes que estavam com infecção na garganta e constataram ação positiva contra cepa de 03 bactérias, sendo elas a *Klebsiella* spp. Trevisan, *Salmonella* spp e *Lactobacillus* spp Beijerinck.

Yashaswini e Arvind (2018) avaliaram a capacidade antibacteriana da casca de laranja (*Citrus reticulata* var. Kinnow), frente as cepas de *S. aureus*, *E coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Schroeter, 1872 e *Klebsiella pneumoniae*, Trevisan. Neste estudo, foram aplicados quatro extratos sendo os solventes etanol, metanol, acetona e éter de petróleo. Os autores constataram que o extrato de acetona foi o que melhor resultado apresentou para os quatro microrganismos avaliados. De modo geral os autores pontuam a ordem de eficácia do extratos pode ser resumidos como: Acetona> Metanol> Etanol> Éter de Petróleo e que este último não apresentou ação inibitória frente *K. pneumoniae* e *Pseudomonas*.

Em trabalho que objetivava analisar a ação antifúngica do óleo essencial da casca de laranja, em diferentes concentrações, contra *Aspergillus flavus*, Heinrich Link, foi testado por dois métodos, a saber o da exposição por vapor e o pela adição direta, foi constatado inibição do crescimento deste fungo de forma proporcional a concentração crescente e que a adição direta do óleo da casca de laranja leva

menos tempo na redução do referido microrganismo quando comparada com ação dos vapores (NUÑEZ *et al.*, 2018).

Aziz *et al.*, (2019) constataram que os compostos presentes no óleo essencial obtidos da casca de tangerina possuem atividade antibiofilme contra o *Aspergillus niger*, van Tieghem, que atua no desenvolvimento de bolor negro em bulbos de cebola.

3 MÉTODO

O presente estudo foi dividido em 4 etapas, em todas essas foi utilizado queijo coalho tipo B, obtido da cidade de Venturosa localizada no interior do estado de Pernambuco, na região do agreste com latitude: **08° 34' 29" S** e longitude: **36° 52' 27" W**, com distância de 249 km da capital. As etapas foram divididas de acordo com os produtos naturais utilizados, sendo esses: coentro, velame do campo, alho, casca da laranja pineapple e casca do limão tahiti.

A etapa 01 resultou na publicação do trabalho intitulado **“Queijo coalho tipo B com adição de extrato aquoso de coentro”** (Apêndice A). Este foi submetido e aprovado para publicação pela revista **Research, Society and Development** no volume 9, n. 10, 2020. ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8855>. Revista QUALIS A3 DA CAPES.

A etapa 02 consistiu no desenvolvimento da aplicação do extrato aquoso do velame do Campo ao queijo coalho. Este estudo oportunizou a elaboração do artigo **“Microbiological evaluation of type B Coalho cheese with the addition of aqueous extract and hydrolat obtained from *Croton campestris*”**, (Apêndice B), o qual foi submetido à revista **European Academic Research**, sendo aprovado e publicado no volume 8, n. 6, disponível em: <http://euacademic.org/UploadArticle/4512.pdf>. Revista QUALIS A2 da CAPES.

Na etapa 03 o estudo visou avaliar a ação bacteriana do extrato aquoso de alho aplicado ao queijo coalho e sua aceitabilidade por parte dos consumidores. Essa pesquisa possibilitou a elaboração da patente intitulada de **“Queijo coalho com extrato de alho um excelente redutor microbiológico”** com **Número do Pedido:** INPI - BR 10 2020 020148 4, sendo depositada no dia 30/09/2020. Apêndice C.

A etapa 04 consistiu na comparação entre os óleos essenciais obtidos das cascas da laranja e do limão quanto suas ações microbiológicas e suas aceitabilidades pelo consumidor. O artigo correspondente (Artigo 01), intitulado **“Evaluation of the influence of orange and lemon essential oil on the quality of**

type B coalho cheese” foi submetido à revista International Journal of Gastronomy and Food Science, Qualis A2 da CAPES.

4 ARTIGO 01 - EVALUATION OF THE INFLUENCE OF ORANGE AND LEMON ESSENTIAL OIL ON THE QUALITY OF TYPE B COALHO CHEESE

Liderlanio de Almeida Araújo^{1a}, Edvane Borges da Silva^a, Júlio César Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar^a, Kamilla de Andrade Dutra^a, Lucia Fernanda C. da Costa Leite^b, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^a.

a. Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

b. Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

1. Author's email for correspondence: liderlanioalmeida@gmail.com. Mailing address: Rua Volutários da Pátria, 242. Campo Grande, Recife, Pernambuco, Brazil. CEP: 52040 – 150.

Abstract

Coalho cheese is a typical product of Northeastern Brazil, a dairy concentrate rich in proteins, lipids, mineral salts mainly calcium, phosphorus and vitamins, with emphasis on types A and B. This product is classified in Type A (produced with pasteurized milk) and B (with fresh milk), the latter is susceptible to several contaminations of microbiological origin and physical - chemical changes that promote changes in sensory quality and mainly in flavor. Therefore, it is important to develop alternatives that allow improvements in the referred product, so the objective of this work was to evaluate the profile of the microbiological characteristics and sensory of type B coalho cheeses produced with the addition of the essential oil of Pineapple orange peel and of the Tahiti lemon. The results showed a reduction in the contents of the tested microorganisms and in some even elimination, as in the *Staphylococcus aureus* test. Orange oil showed better results.

Keyword: Sensory analysis, Essential oil, Dairy product.

1 Introduction

Milk can be obtained from several sources such as goat, sheep, buffalo, cow, among others. When it comes to cow's milk, it is known that this compound is a

nutritious product formed by a range of molecules embedded in the solution. Its main components are water (86.0 to 88.0%), total solids (12.0 to 14.0%), fat (3.5 to 4.5%), protein (3.2 to 3.5% %), lactose (4.6 to 5.2%) and minerals (0.7 to 0.8%). This is used as a raw material for the production of various types of cheese spread across the land, in Brazil you may encounter a variation of these depending on the region (MUNIZ; MADRUGA; ARAÚJO, 2013; SILVA *et al.*, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2020).

In the Northeast of Brazil, a well-known cheese called “coalho cheese” is produced, typical of that locality, originating in the state of Pernambuco and branching out to the other states that make up this geographical demarcation. Its production is obtained in small and medium-sized cheese shops, in small and medium-sized rural properties or from family farming (PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016; SANTOS *et al.*, 2020).

Coalho cheese is characterized by its rectangular shape, white mass, semi-hard consistency, slightly acid and salty flavor, compact and soft texture, with a fat content of 35.0% to 60.0%. This milk concentrate is an excellent source of calcium and phosphorus, among other mineral salts, several vitamins, especially type A and B2, fat, it has all the essential amino acids, among others (CARVALHO *et al.* 2010; BARROS *et al.*, 2019).

The process for producing coalho cheese is simple, as shown in Figure 01, initially milking occurs, a process for obtaining milk. Then, the milk is strained (I) and the coalho (II) is added, after this step, it must be waited for 40 to 60 minutes for coagulation to occur (III). The next stage is cutting to obtain whey and curd (IV), the latter being used to produce cheese. Then, the curd and whey (V) are separated, then the curd is added to the rectangular shapes until it occupies the entire space, and the hangover takes place (VI). Once the cheese is ready, salting takes place, sodium chloride (VII) is added and it remains for a period of time depending on the producer so that residual whey is released. Finally, it is stored in a freezer or cold chamber (VIII) (SILVA *et al.*, 2010; BARROS, *et al.*, 2019).

Coalho cheese is classified into two types A and B, the latter being produced in the step mentioned above, receiving this designation for being produced with fresh milk and in type A, milk subjected to the pasteurization process is applied in

production. These two types are susceptible to contamination by some microorganisms such as total and thermotolerant Coliforms, mold and yeast, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella spp.* with emphasis on type B as highlighted by the authors Santana *et al.*, (2008); Dias *et al.*, (2015); Bezerra *et al.*, (2017); Silva *et al.*, (2018) in their studies.

Studies indicate that contamination of coalho cheese occurs mainly due to the lack of hygiene that can occur during cheese production or even before, during the milking stage, the stage in which milk is obtained, regardless of whether it occurs in milking or by hand. It is important that before starting any of these two phases that the cleaning, organization, cleaning and checking of the equipment and utensils to be used in these processes takes place, thus aiming to obtain the product with the lowest possible contamination index (EMBRAPA 2012; PAQUEREAU; MACHADO; CARVALHO, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2020).

Due to the possible microbiological contamination Oliveira *et al.*, (2010) when evaluating 42 samples, they found that 4 of them tested positive for the presence of *Salmonella spp.*, While 34 and 32 of these presented, respectively, a high index of thermotolerant coliforms and *Staphylococcus aureus*. In the case of the latter microorganism Bezerra *et al.*, (2017) obtained that 65% of the studied samples had a limit beyond the allowed.

Freitas, Travassos and Maciel (2013) point out that in the evaluation of samples of raw milk and coalho cheese from three different producers that all had a high index of thermotolerant and total coliform. These authors also showed that 33.3% of the samples contained *Salmonella spp.* Souza *et al.*, (2011) obtained high levels of mold and yeast, obtaining the highest determined value of 5.2×10^9 CFU/g. Dugat-Bony *et al.*, 2016 emphasize that Brazilian legislation does not recommend a limit for the number of molds and yeasts per sample of coalho cheese, but they are an indicator of the quality of food products, as they are responsible for promoting deterioration and changes in acceptability sensory.

It is important to develop alternatives that can establish criteria for the production of coalho cheese with better microbiological quality, as it is susceptible to various contaminations resulting from poor hygiene during milking and production.

Another factor that contributes to this phenomenon is its raw material, since the milk used in production is not subjected to the pasteurization phase, characterizing it as *natura* (Type B). In addition to these factors, there are also operational problems due to processing, storage, transportation and marketing. Thus, in the search for improvements for this product, the use of natural products such as orange and lemon peel oil stands out as an alternative.

Essential oils can usually be found in the bark, leaves, stems, roots, flowers, rhizome and seeds, are products that originate from the secondary metabolism of aromatic plants. These can exhibit antimicrobial, antioxidant and insecticidal activity, among others, being applied in several segments such as the food and pharmaceutical industry. The essential oil of orange peel can contain up to 300 types of compounds divided into non-volatile compounds comprising carotenoids, flavonoids and coumarins. And volatiles, which correspond to about 94 to 98% of the total oil, in this can be found the aldehydes, ketones, alcohols, hydrocarbons with emphasis on D-limonene, among others, (GOMES *et al.*, 2011; KULKARNI *et al.*, 2013).

Among the various types of oranges produced in Brazil, Pineapple orange, a nucellar clone from Florida USA, can be highlighted and its seeds were brought to Brazil by the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa). It has a height of 7.3 cm and a diameter of 7.8 cm with medium-sized fruits weighing around 240g each, it can contain up to 9 seeds per orange. Its name is due to the fact that its crown has a cylindrical shape similar to the pineapple fruit, has early maturation, which makes it a high production source, as it takes less time to develop compared to other species (EMBRAPA, 2018 ; TORRE *et al.*, 2019).

Tahiti lemon (*Citrus latifolia* Tanaka) originates in the islands of Tahiti, hence the name. In Brazil, it stands out for its economic contribution due to its shorter production time, when compared to other citrus fruits. Being widely applied in the food segments used in the production of pasta, cakes, meats, candies and juices. This is also used in folk medicine to reduce fat, fight rheumatism and nausea, rich in vitamin C also acts in the treatment of flu and scurvy (BASTOS *et al.* 1997; BRITO *et al.*, 2017).

The Tahiti lemon is a hybrid of the acid lime, of the family Rutaceae, subfamily Aurantioideae, genus *Citrus* and species *C. latifolia* (Tanaka), it grows more easily in hot climates when compared to cold places, having favorable conditions in the Northeast of Brazil development. This plant is tall, with dark green leaves and flowers containing five petals. Its fruits are oval, weighing 170g and with generally thin skins, with a smooth surface and a pale yellow color in the ripening phase, composed of two distinct fractions “flavedo” or epicarp and “albedo” or mesocarp (MENDONÇA *et al.*, 2006 ; RAMOS *et al.*, 2016).

There are no studies in the literature that address the relationship between the interaction of Pineapple orange peel essential oil and Tahiti lemon with coalho cheese from a sensory point of view, shelf life and especially its microbiological relationship, since quality microbiological is a predominant factor for the commercialization of this dairy product. Such parameter is a hygienic - sanitary indicator that provides the necessary information to indicate how much food is in correlation with the standards established by the legislation for consumption, thus preventing diseases transmitted to different types of microorganisms.

There are studies with other types of oils, however few, such as the one carried out by Carvalho *et al.*, (2015) that evaluated the action of the essential oil of *Thymus vulgaris* L. (thyme) against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in samples of coalho cheese and found that it showed inhibitory activity against the pathogenic bacteria evaluated. Thus, the present study aims to evaluate the action of the addition of Pineapple orange essential oil and Tahiti lemon on microbiological and sensory quality of type B coalho cheese.

2 Methodology

Coalho type B cheese was obtained in the city of Venturosa, Pernambuco - Brazil, with 1 kg of it being produced with 8 liters of milk. For the present study, 1.5 kg of Pineapple orange houses and 1.5 kg of the Tahiti lemon peels were used, produced in the organic cultivar of the Agronomic Institute of Pernambuco (IPA) at the Brejão PE unit.

The essential oil of Pineapple orange and Tahiti lemon were obtained through the extraction process using the hydrodistillation technique in a modified Clevenger type device, condenser and heating blanket (160 °C - 170 °C) for a period of 3 h. Then, the oil was treated with anhydrous sodium sulfate P.A. to remove the remaining water and stored under refrigeration (-24 °C) until the experiment was carried out.

2.1 Addition of Pineapple orange peel and Tahiti lemon oil:

For the experiment, 2, 5, 7, 10, 12 and 15mL of each oil were added separately, thus composing two stages containing each 300 grams of coalho cheese separately, thus obtaining six groups for each stage of the study (300g of cheese plus the said concentration of added oil) plus a control group, using a total of 2.1 kg of type B coalho cheese, these different volumes being added to the different samples after 24 hours of production of the said milk concentrate.

The 7 groups of each of the two phases were analyzed at times 1, 5, 10 and 15 days after the addition of Pineapple orange peel oil and Tahiti lemon, followed by storage in containers (20 cm wide, 7.2 cm long). height and 12.5 in width) in a refrigerator at a temperature of 10°C.

The microbiological analyzes performed in the present study were mold and yeast, thermotolerant and total coliforms, *Salmonellas spp.* and *Staphylococcus aureus*. The methodological process being applied in accordance with Normative Instruction No. 62, of August 26, 2003, occurring as follows:

Coliform analysis: The inoculation occurred from the addition of 1mL of the initial 10^{-1} dilution in sodium lauryl sulfate broth solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in simple concentration. Then, the necessary inoculations were performed to obtain the 10^{-2} and 10^{-3} dilutions, all dilutions being prepared in triplicate. All tubes incubated at 35 ° C for 48 hours, then there was gas production in the Durham tubes, this being the parameter to consider positive for the analysis, which were submitted to confirmatory test for Total and Thermotolerant Coliforms, obeying the following criteria for:

- Total Coliforms: Each positive tube was repeated for a tube containing bright green bile broth 2% lactose (Merck, Darmstadt, Germany). Then, the tubes were incubated at 36 ± 1 ° C for 48 hours. After this period, a reading was performed to confirm or not the presence of total coliforms due to gas formation.

- Thermotolerant coliforms: Positive tubes from the confirmatory test were repeated for tubes containing EC broth (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, the tubes were incubated at 45 ± 0.2 ° C for 48 hours in a water bath with agitation. After this period, a reading was performed to confirm or not the presence of total coliforms due to gas formation.

The Count of Molds and Yeasts was performed in a Petri dish, containing three dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) for the seven groups analyzed, all of which were applied in triplicate. In this, the culture medium used was Agar potato dextrose 2% acidified with tartaric acid 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and incubated at 25 ± 1 °C for a period of seven days. After this time interval, the colonies present on the plates were counted and the result expressed in CFU.

The test for *Staphylococcus aureus* was carried out in a Petri dish, containing three dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) with inoculum of 0.1 ml of each sample, the dilutions in the respective plates being performed in triplicate. The inverted plates were incubated in B.O.D at 36 ± 1 °C for a period of 48 hours. Then, the colonies present on the plates were counted and the result expressed in CFU.

The analysis for identification of *Salmonella spp.* was performed in triplicate, confirm procedure: initially the pre-enrichment step was performed, 25 ± 0.2 g of each coalho cheese sample were used, with addition of each of the studied Canopy volumes (the control, 5 mL, 10 mL and 15 mL), which were added in 4 tubes containing 225 mL of 1% buffered peptide saline solution (ACUMEDIA, MI, USA). These mixtures were homogenized for 1 minute in the Stomacher (Model MA440, Piracicaba, Brazil) and, then, the tubes containing the mixtures were incubated at 36°C for 18 hours. In the selective enrichment stage, three 1 mL aliquots were removed from each of the 4 pre-enriched samples; 1 ml was added to a tube containing 10 ml of Rappaport Vassiliadis broth (ACUMEDIA, MI, USA); 1 mL added in a tube containing 10 mL of cystine selenite broth (ACUMEDIA, MI, USA), and; 1

mL added to a tube containing 10 mL of tetrathionate broth (ACUMEDIA, MI, USA), totaling 12 tubes. All of these tubes were incubated in a water bath, with shaking, for 24 hours at 41°C. Subsequently, isolation was carried out, where the selective enrichment broths were picked on the previously dried surface of plates containing the selective solid medium, streaking in order to obtain isolated colonies. These plates were incubated at 36 °C for 24 hours. After this period, the characteristic colonies were subjected to biochemical tests to assess the presence or absence of *Salmonella spp.*

For the realization of the **Sensory Analysis**, the project was submitted to the ethics committee of the Federal University of Pernambuco - Brazil, the same being approved with the Opinion number: 3,897,504. Thus, the acceptability test was applied with evaluation of the attributes of texture, color, flavor, appearance and global acceptance. The test was carried out with untrained tasters, a total of 155 people, including students and employees from the Catholic University of Pernambuco and the Federal University of Pernambuco. The analysis took place on the seventh day of storage and the participants signed a consent form granting permission to disclose the results. The tasters judged two samples, one containing the type B coalho cheese containing the essential oil and the other the cheese without the oil, each served in a white disposable dish and served with a glass of mineral water. The volunteers classified the samples according to a hedonic scale of nine points, anchored at the ends, the nine of which refer to “I liked it a lot” and a “I disliked it a lot”.

The **statistical analysis** applied in the present study used the BioEstat 5.3 program using the analysis of variance followed by the Tukey test, at 5%.

3 Results and discussions

Table 01 shows how efficient the essential oil of Pineapple orange can be in reducing and even eliminating both total and thermotolerant coliforms, depending on the day and the volume of oil applied, but being more active against this first microorganism. From the first day of evaluation for the volume of 5mL reaching the

last day of analysis for the volumes of 10, 12 and 15 mL no longer showing the presence of gas in the Durham tube for total coliform.

Table 01 - Results observed for total and thermotolerant coliform for samples containing different volumes of Pineapple Orange Oil.

Volume (mL)	Total Coliform				Thermotolerant Coliform			
	1° day	6° day	10° day	15° day	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	$4,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
2	$4,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
5	$9,2 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
7	$3,6 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	$5,0 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$
10	$9,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	$<3,0$	$<3,0$	$5,0 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$
12	$9,0 \cdot 10^2$	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$<3,0$
15	$9,0 \cdot 10^2$	$<3,0$	$<3,0$	$<3,0$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$	$<3,0$	$<3,0$
* Control sample								

In the case of Tahiti lemon peel essential oil, it was found that it promoted a reduction in the total coliform content present in the evaluated cheese samples (Table 02), in different concentrations. The sample with the addition of 2mL of oil kept the total coliform content stable until the 15th day and on the 15th day it showed a reduction. It can be seen that with the addition of 5 and 7mL a reduction started from the 6th day of evaluation, whereas the volumes of 10, 12 and 15 mL showed reductions since the first day of evaluation. In these same volumes, it can be seen that on the fifteenth day in the evaluation of the tubes, there was no gas formation inside the Durham tube, thus revealing a possible absence of this microorganism.

The values of thermotolerant coliforms for the control sample showed that there was an increase with the fifteenth day of evaluation. For the volume of 2 mL, the content of this microorganism remained constant throughout the analysis period with a content of $1,5 \cdot 10^4$. For the sample containing 5 mL from the sixth day of the study, it was observed that the value decreased ($5,0 \cdot 10^3$) compared to the first day.

For volumes of 12 and 15mL there was a reduction from the first day with values below that established by the legislation, showing that these volumes are effective for reducing this microorganism.

Table 02 - Results observed for total and thermotolerant coliform for samples containing different volumes of Tahiti lemon oil

Volume (mL)	Total Coliform				Thermotolerant Coliform			
	1° day	6° day	10° day	15° day	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	$4,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
2	$4,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^4$
5	$4,3 \cdot 10^4$	$2,3 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$	$9,2 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$
7	$4,3 \cdot 10^4$	$9,2 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$
10	$3,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	<3,0	$1,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$
12	$3,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	<3,0	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$
15	$3,6 \cdot 10^3$	$9,0 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	<3,0	$1,1 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^3$	$7,4 \cdot 10^2$	$7,4 \cdot 10^2$

* Control sample

In general, it can be evidenced that the essential oil of the Pineapple orange when compared with the oil of the Tahite lemon presented better results.

Mendes *et al.*, (2009) highlights that in the evaluation for identification of coliforms when high value is obtained, as can be seen in the present study for the control sample, it is usually due to the lack of basic hygiene conditions. In general, it is clear that the control sample, both for total coliform and thermotolerant, prevails with high values, thus indicating inadequate hygiene and sanitary conditions. Nunes *et al.*, (2013) and Duarte *et al.*, (2005) also state that coalho cheese is susceptible to various contaminations by microorganisms that indicate hygienic and sanitary conditions and contact in their research a high index of total and thermotolerant coliforms in samples of this product.

Silva *et al.*, (2010) showed the presence of total and thermotolerant coliforms in cheese samples produced in natura (type B) and with milk subjected to pasteurization (type A) beyond the limit established by the legislation ($\leq 5 \times 10^3$). Salotti

et al., (2006) point out that during pasteurization process failures, errors in handling and the lack of hygienic procedures can occur. This fact can occur not only in coalho cheese but also in other types such as Minas Frescal cheese, where Apolinário *et al.*, (2014) from 32 samples of cheese, produced with milk submitted to the pasteurization process, found that 77.4 % were beyond the limit for total coliforms and 54.8% with a value higher than that determined by the legislation for thermotolerant coliforms.

In the evaluation of coalho cheese sold in the two largest open markets in the city of Petrolina, Pernambuco – Brazil, Silva *et al.*, (2016) found high levels of contamination by total and thermotolerant coliforms in the samples, where they conclude that a product of poor hygiene and sanitary quality is being offered to the consumer. Silva *et al.*, (2018) when studying four samples of coalho cheese sold in Petrolina, Pernambuco – Brazil, found values higher than established by legislation with an index varying for thermotolerant coliform from 4.8×10^3 to 3.8×10^5 and for total coliforms of 6.3×10^5 at 1.1×10^6 MPN / g.

In a study carried out at fairs in the city of Bananeiras, Paraíba – Brazil, Andrade *et al.*, (2016) diagnose that all samples of coalho cheese studied had total and thermotolerant coliforms with a high level of contamination with a value above the order of $3.5 \cdot 10^5$ MPN/g for both. Thus, the Tahiti lemon peel essential oil showed good results for promoting the reduction of total and thermotolerant coliform and even elimination depending on the day and volume applied in the analysis.

Table 03 shows the results found for *Staphylococcus aureus* for samples containing Pineapple orange oil, it can be seen that since the first day of evaluation in volumes of 05, 07, 10, 12 and 15 mL it has already shown a reduction for load microbial evaluated. The control sample on all days of evaluation showed high amounts of this microorganism, being above the value established by the legislation ($5 \cdot 10^2$).

For the 2 mL volume, it was found that there was no variation in the content of *Staphylococcus aureus* evaluated, that is, possibly the oil acted preventing the elevation of this contaminant. Pineapple orange oil proved to be the best bactericide in volumes of 10, 12 and 15 mL, which for the first and fifth days of evaluation have

already shown significant reductions and that on the tenth and fifteenth day of evaluation this one managed to eliminate this microorganism from the sample of coalho cheese evaluated.

Table 03 - Values found for *Staphylococcus aureus* on the evaluation days for samples with and without Pineapple Orange essential oil.

Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^5$
02	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$
05	$2,1 \cdot 10^3$	$7,1 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^2$
07	$4,6 \cdot 10^2$	$7,1 \cdot 10^3$	$4,3 \cdot 10^3$	$5,5 \cdot 10^2$
10	$3,2 \cdot 10^2$	$5,7 \cdot 10^1$	0,00	0,00
12	$2,3 \cdot 10^2$	$3,2 \cdot 10^1$	0,00	0,00
15	$1,8 \cdot 10^2$	$2,5 \cdot 10^1$	0,00	0,00
* Control sample				

The essential oil of the Tahiti lemon showed a reduction ranging from $1,0 \cdot 10^4$ to $1,5 \cdot 10^1$ over the evaluation days according to table 04. For volumes 07, 10, 12 and 15 mL, a microbial reduction different from that of control sample from the first day of study, while for the same period of time 5 mL of orange oil has already shown an effect. Comparing the same volumes of both oils 10, 12 and 15 mL, it can be noted that they were the ones that presented the best results, however Pineapple orange oil proved to be more significant than Tahiti lemon oil, as it expresses a total reduction of *Staphylococcus aureus*. Further tests should be carried out at different volumes to assess the effectiveness of Tahiti lemon essential oil to ascertain the existence of a dose that is effective for eliminating the evaluated microorganism.

In a study carried out in seventeen municipalities in the State of Ceará, Brazil, it was found that 64.9% of the coalho cheese samples produced by artisanal and industrial form had *Staphylococcus aureus* beyond current standards, which shows us how important it is to have the development of a product that assists in the

elimination or reduction of this microorganism as presented in this work (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Table 04 - Values found for *Staphylococcus aureus* on the evaluation days for samples with and without Tahiti lemon essential oil.

Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	1,0 .10 ⁴	1,0 .10 ⁴	6,0 .10 ⁴	2,1 .10 ⁵
02	1,0 .10 ⁴	1,0 .10 ⁴	6,0 .10 ⁴	5,2 .10 ⁴
05	1,0 .10 ⁴	4,5 .10 ³	3,1 .10 ²	9,0 .10 ¹
07	6,8 .10 ³	4,2 .10 ³	2,9 .10 ²	6,1 .10 ¹
10	6,6 .10 ³	3,9 .10 ²	2,3 .10 ²	4,9 .10 ¹
12	5,5 .10 ³	3,6 .10 ²	1,6 .10 ²	3,6 .10 ¹
15	5,1 .10 ³	3,6 .10 ²	1,2 .10 ²	1,5 .10 ¹
* Control sample				

Souza *et al.*, (2014) point out that 95.2% of coalho cheese samples, sold in the Northeast region, had high levels of contamination by *Staphylococcus aureus*. In a study carried out in the city of Cabo de Santo Agostinho – Pernambuco, Brazil, Oliveira *et al.*, (2010) concluded that 76.19% of the coalho cheese samples had a high content of *Staphylococcus aureus* with a variation of 1.6 . 10³ to 2.0 . 10⁵ CFU/g.

Silva *et al.*, (2010) showed values above 1.1.10³ CFU / g for all studied samples concluded that all were outside the established standards, as described by the RDC (5x10² CFU / g) for *Staphylococcus* it is noted that most of the studies indicate that coalho cheese is above the permitted limit.

Studies such as the one developed by Bezerra *et al.*, (2017) found that 65% of the 20 samples evaluated for coalho cheese marketed in the city of Sousa, Paraíba - Brazil were values of the said microorganism beyond that limit. Santana *et al.* (2008) obtained 28 samples out of 40 evaluated with an index higher than that established by the norm with values of up to 3. 54 . 10⁵ CFU/g.

In a study carried out in seven artisanal cheese shops located in the city of São Rafael – Rio Grande Norte, Brazil, Pereira *et al.*, (2017) found that all samples had contamination by *Staphylococcus aureus*, with a count ranging from $8.0 \cdot 10^2$ to $1.2 \cdot 10^3$. In the same study, the authors evaluated the presence of *Salmonella spp.* and in all samples the absence was found in the present study, both for the control sample and for those that both Tahiti lemon and Pineapple orange oil were added, as Table 05, therefore, it is not possible to apply said statistical treatment.

Results for *Salmonella spp.* the same as that obtained in this study was evidenced by Sousa *et al.*, (2014) in which they obtained absence of this microorganism for both coalho cheese produced with inspection and without inspection according to ANVISA standard. Evangelista - Barreto *et al.*, (2016) also showed absence of *Salmonella* in samples sold in Cruz das Almas, Bahia - Brazil.

It is possible to find works in the literature that show the presence of *Salmonella spp.* in coalho cheese, as pointed out by Mendes *et al.*, (2001) that in the evaluation of this dairy concentrate marketed in the city of Recife obtained that 73.3% of the samples contained this microorganism. Oliveira *et al.*, (2010) found 4 samples from 42 analyzed with the presence of *Salmonella spp.* and Duarte *et al.* (2005) showed a percentage of 5.5% of the evaluated samples. Sousa *et al.*, (2014) found only a positive sample for that of 10^4 evaluated.

Table 05 - Values found for *Salmonella spp.* in the evaluation days for Pineapple Orange Oil and Tahiti Lemon Oil.

Pineapple Orange Oil				
Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	Absent	Absent	Absent	Absent
02	Absent	Absent	Absent	Absent
05	Absent	Absent	Absent	Absent
07	Absent	Absent	Absent	Absent
10	Absent	Absent	Absent	Absent
12	Absent	Absent	Absent	Absent
15	Absent	Absent	Absent	Absent
Tahiti Lemon Oil				

Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	Absent	Absent	Absent	Absent
02	Absent	Absent	Absent	Absent
05	Absent	Absent	Absent	Absent
07	Absent	Absent	Absent	Absent
10	Absent	Absent	Absent	Absent
12	Absent	Absent	Absent	Absent
15	Absent	Absent	Absent	Absent

* Control sample

Table 06 shows the values obtained in the Mold and Yeast count, for samples with the addition of Pineapple orange essential oil and for the control sample (without the addition of Pineapple Orange oil). It is possible to ascertain that for the sample containing 10, 12 and 15 mL that showed the best results since the first day of evaluation, promoting a total reduction on the tenth and fifteenth day of the study.

Table 06 - Values found for mold and yeast on the evaluation days for samples with and without Pineapple orange essential oil.

Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
00*	$8,8 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^5$
02	$8,8 \cdot 10^4$	$8,8 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^3$	$7,9 \cdot 10^2$
05	$8,8 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$4,1 \cdot 10^2$
07	$8,8 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^3$	$7,0 \cdot 10^2$	$4,1 \cdot 10^2$
10	$7,1 \cdot 10^3$	$8,5 \cdot 10^1$	0,00	0,00
12	$5,7 \cdot 10^2$	$6,2 \cdot 10^1$	0,00	0,00
15	$3,2 \cdot 10^2$	0,00	0,00	0,00

* Control sample

In assessing the influence of Tahiti lemon essential oil against mold and yeasts, it can be seen, according to table 07, that there was a reduction over the

evaluation days depending on the volume applied, with a varied content of $8.4 \cdot 10^5$ to $2.5 \cdot 10^1$. The control sample (without the addition of Tahiti lemon oil) can be observed that over the days there was an increase in the quantity of this contaminant, varying from $8.8 \cdot 10^4$ to $8.4 \cdot 10^5$. From the first day for volumes of 5, 7, 10, 12 and 15 mL, a reduction in these contaminants can be seen. The volumes of 10, 12 and 15 mL are the ones with the best results, mainly 15 mL.

In general, it can be seen that there was an increase in the content of said microorganism for the control sample (without adding both Pineapple Orange oil and Tahiti lemon oil). Although Brazilian legislation does not establish a limit count for mold and yeast in samples of coalho cheese Dugat-Bony *et al.*, (2016) highlights that their presence is indicative of the quality of this milk concentrate, as they are agents that promote deterioration and changes the degree of acceptability.

Table 07 - Values found for molds and yeasts on the evaluation days for samples with and without Tahiti lemon essential oil.

Volume (mL)	1° day	6° day	10° day	15° day
Control	$8,8 \cdot 10^4$	$9,7 \cdot 10^4$	$5,5 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^5$
02	$8,8 \cdot 10^4$	$5,1 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$
05	$8,7 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^3$	$3,3 \cdot 10^3$
07	$8,6 \cdot 10^3$	$4,2 \cdot 10^3$	$2,9 \cdot 10^3$	$5,3 \cdot 10^2$
10	$8,6 \cdot 10^3$	$5,1 \cdot 10^2$	$4,4 \cdot 10^2$	$3,1 \cdot 10^2$
12	$8,6 \cdot 10^3$	$3,0 \cdot 10^2$	$2,2 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^2$
15	$8,6 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^1$	$4,7 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^1$

* Control sample

Feitosa *et al.*, (2003) in a study, carried out in the state of Rio Grande do Norte – Brazil, evaluated samples of coalho cheese and obtained a mold and yeast count with a variation range of $1.9 \cdot 10^4$ to $4.8 \cdot 10^8$ CFU / g. Peixoto *et al.*, (2012) when analyzing 4 dairy products in the state of Paraíba and showed that most of the samples contained a content of 2.4×10^4 CFU / g. Souza *et al.* (2011), on the other hand, found a higher count of this microorganism with values reaching up to 5.2×10^9 CFU / g for the evaluated coalho cheese. Similar results were reported by Souza *et*

al., (2011) who obtained values up to 5.2×10^9 CFU /g in the samples of coalho cheese evaluated.

In one of the few studies reported in the literature with the addition of some natural product to coalho cheese, Ferreira - Neto *et al.*, (2017) observed that in matured coalho cheese produced with the addition of oregano (*Origanum vulgare*) and herbs. Sweet (*Foeniculum vulgare*) as well as in the control sample there was a thermotolerant coliform content below the limit established by the legislation. There was no *Salmonella spp* and *Staphylococcus aureus*, these authors attributed these good results to the pasteurization process used, however in the present study it can be noted that even coalho cheese did not undergo such a thermal process that the oils showed good results.

The sensory analysis for the attributes color, texture, flavor, appearance and global acceptance have their results described in table 08. The color parameter showed a significant difference ($p < 0.05$) between the control sample (without the addition of oil) with the sample containing the essential oil of the Tahiti lemon. Also, it can be seen that there was no significant difference ($p \geq 0.05$) between the control sample and the sample containing Pineapple orange oil.

Table 08 - Result of sensory analysis

Sample	Cor	Textura	Sabor	Aparência	Aceitação Global
00*	7,19 ± 1,57 a	7,20 ± 1,62 a	7,54 ± 1,59 a	7,34 ± 1,63 a	7,56 ± 1,48 a
TLO	6,55 ± 1,92 b	6,84 ± 1,79 a	5,28 ± 2,41 b	6,65 ± 1,80 b	5,88 ± 2,21 b
POO	6,94 ± 1,81 a	6,75 ± 1,94 a	5,88 ± 2,61 b	7,15 ± 1,80 a	5,91 ± 2,52 b

* = Control sample; TLO = Tahiti lemon Oil; POO = Pineapple Orange Oil

The texture attribute showed no significant difference between ($p \geq 0.05$) the control sample versus the coalho cheese sample containing Tahiti lemon oil, just as there was no difference in the comparison between the sample containing Tahiti lemon oil and the cheese with the addition of Pineapple orange oil. There was a

significant difference for the texture parameter between the sample containing Pineapple orange oil and the sample of rennet cheese without adding it.

In the evaluation of the flavor attribute, a significant difference ($p < 0.05$) was found between the control sample with oil of the Tahiti lemon and the control sample with the oil of the Pineapple orange. This significant difference observed in the evaluation of sensory stability is possibly due to the citrus aroma present in both oils. When comparing the cheese samples containing Tahiti lemon oil with Pineapple orange oil, the static evaluation showed that there was no significant difference ($p \geq 0.05$) in that comparison.

Studies indicate that the acceptability index in terms of flavor when adding a product to coalho cheese will present a significant difference in favor of cheese. Since it has a specific flavor that the population already knows, even coalho cheese made from pasteurized milk (rennet cheese type B) that has a long time on the market compared to other techniques. This type of cheese has as its only difference the processing with heated milk in order to reduce the microbial load, Araújo *et al.*, (2009) highlight in their research that 80% of the participants choose coalho cheese made with raw milk (in natura), which claim to be tastier than milk with pasteurization, 15% of them say they would think instead of coalho cheese in natura for type A.

In the present study, the acceptability index of coalho cheese produced without the addition of oil showed an acceptability index of 83.3%, whereas the sample of coalho cheese with the addition of Pineapple orange oil showed 65.6% acceptability and the rennet cheese produced with the addition of Tahiti lemon oil had a rate of 57.8%. Manguiera *et al.*, (2002) sensorially evaluated coalho cheese processed with skimmed and partially skimmed milk enriched with the addition of Iron (Fe) and showed an acceptability index of 63% for fully skimmed cheese and 56.8% for produced partially skimmed.

For the appearance parameter, the analysis showed no significant difference ($p \geq 0.05$) in the comparison between the control sample and the cheese produced with the addition of Pineapple orange oil. On the other hand, there was a significant difference ($p < 0.05$) in the evaluation between the control sample with the cheese

with the addition of Tahiti lemon oil and there was also a difference in the comparison between the cheese produced with both oils.

In the evaluation of the global acceptance parameter, there was a significant difference ($p < 0.05$) in the comparison between the control sample with both the cheese produced with the addition of Tahiti lemon oil and Pineapple orange oil. The same analysis revealed that there was no significant difference ($p \geq 0.05$) in the comparison with cheese containing oil from Tahiti lemon with cheese containing Pineapple orange oil.

4 Conclusion

Type B coalho cheese produced with the addition of Pineapple orange essential oil showed better reductions when compared to Tahiti lemon essential oil. The results presented for the evaluation of the tested microorganisms were generally satisfactory. In the evaluation of sensory attributes, he observed that there was a significant difference in the acceptability of the flavor due to the citrus aroma present in both oils and also because the consumer is already quite familiar with its natural flavor.

Acknowledgment: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

REFERENCES

ANDRADE, V. O.; BEZERRA, L. M. A.; ANDRADE, J. O.; NASCIMENTO, M. M. Qualidade microbiológica de queijo de coalho. I Congresso Internacional das Ciências Agrárias. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/326554679_QUALIDADE_MICROBIOLOGICA_DE_QUEIJO_DE_COALHO. Acessado em: 13 jun de 2020.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do Queijo Minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

ARAÚJO, L. A.; SILVA, E. B.; MARINHO, M. E.; MELO, A. P.; LUNA, J. M.; MELO, A. S.; LEITE, L. F. C. C.; NAVARRO, D. M. A. F. Microbiological evaluation of type B Coalho cheese with the addition of aqueous extract and hydrolat obtained from *Croton campestris*. **European Academic Research**. v.8, n. 6, 2020.

ARAÚJO, M. C. G.; SANTOS, R. A.; SILVA, C. P. A.; CIRILO, R. L. Análise sensorial e teste de aceitação do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado na cidade de currais novos. **Holos**. v. 4, 2009.

BARROS, D. M.; MACHADO, E. C. L. MOURA, D. F.; FONTE, R. A. B.; FERREIRA, S. A. O.; BEZERRA, R. S. Aspects of coalho type cheese with emphasis on the importance of Good Manufacturing Practices in the production system. **Braz. J. of Develop**. v. 5, n. 1, p. 67-93, 2019.

BASTOS, T.X.; SÁ, T.D.A.; PACHECO, N.A.; CORRÊA, M.M.; VEIGA, J.A P; RIBEIRO W. M. N. Variabilidade hídrica espacial e temporal na Amazônia e implicações para a cultura do dendê. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROMETEOROLOGIA, 10, 1997, Piracicaba. Agrometeorologia, monitoramento ambiental e agricultura sustentável: Anais..., Piracicaba: ESALQ, Sociedade Brasileira de Agrometeorologia, p. 454-456, 1997.

BEZERRA, D. E. L.; SILVA-FILHO, C. R. G.; GOMES, D. J.; PEREIRA-JUNIOR, E. B. Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa – Paraíba. **Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**. nº 37, 2017.

BRITO, K. D.; SANTOS-FILHO, J. I.; OLIVEIRA, H. B. L.; ARAÚJO, B. G.; PAIXÃO-NETO, E.; LIMA, F. C. S. Estudo experimental do limão 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka): composição físico-química e de minerais da polpa in natura e do resíduo albedo. **Revista Principia**. n. 37, p. 64-70, 2017.

CARVALHO, L. M.; CARVALHO, H. W. L.; FILHO, W. S. S.; MARTINS, C. R.; PASSOS, O. S. Porta-enxertos promissores, alternativos ao limoeiro 'Cravo', nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.51, n. 2, p. 132-141, 2016.

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

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2010.

DIAS, J. N.; FORTINELE, L. L.; MACHADO, S. M. O.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. 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.

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 higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.72, p.297-302, 2005.

DUGAT-BONY, E.; GARNIER, L.; DENONFOUX, J.; FERREIRA, S.; SARTHOU, A.; BONNARME, P.; IRLINGER, F. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 265-273, 2016.

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. **Cienc. Tecnol. Alimentos**. v.23, p.162- 165, 2003.

FERREIRA – NETO, J. FEGUEREDO, M. J.; PEREIRA – JUNIOR, E. B.; LIMA – FILHO, P.; QUEIROGA, R. A.; LINS, A. C. Queijo tipo coalho defumado com

orégano (*Origanum vulgare*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*). **Divulgação Científica e Tecnológica Do IFPB**. N. 36, 2017.

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**. v.15, n.1, 2013.

GOMES, S.V.F.; NOGUEIRA, P.C.L.; MORAES, V.R.S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. *Eclética Química*, v.36, n. 1, p. 64-77, 2011.

KULKARNI, R.R.; PAWAR, P.V.; JOSEPH, M.; JOSHI, S.P. *Lavandula gibsoni* and *Plectranthus mollis* essential oils: chemical analysis and insect control activities against *Aedes aegypti*, *Anopheles sfttephensi* and *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Pest Science**, v. 86, n.4, p. 713-718, 2013.

LIMA, C. P.; DIAS, G. M. P.; SOARES, M. T. C. V.; BRUNO, L. M.; PORTO, A. M. F. Queijo coalho como fonte de bactérias ácido lácticas probióticas. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 8, p. 1-19, 2020.

MANGUEIRA, T. F.; TRAVASSOS, A.E.R.; MOREIRA, R.T. Teste de aceitabilidade sensorial de queijo de coalho com baixo teor de gordura e enriquecido com ferro. *B.CEPPA, Curitiba*, v. 20, n. 2, p. 279-290, 2002.

MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. N. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijo de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**. v.13, n.66/67, p.122-126, 2001.

MENDONÇA, L. M. V. L.; CONCEIÇÃO, A; PIEDADE, J.; CARVALHO, V. D.; THEODORO, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia*, Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

MUNIZ, L. C.; MADRUGA, S. W.; ARAÚJO, C. L. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. *Ciência & Saúde Coletiva*. v.18, n. 12, 2013.

NUNES, M. M.; MOTA, A. L. A. A.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**. v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013.

OLIVEIRA, F. I. P.; COSTA, M.T.P.; FRAGA, A.C.A.; OBERG, M.L.B.; VASCONCELOS, M.P.; COSTA, T. E. S.; PINTO, S. C. OCORRÊNCIA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM QUEIJOS TIPO COALHO. **Cadernos ESP**. v.13, n. 2, p. 82 – 93, 2019.

OLIVEIRA, K.A.; EVÊNCIO - NETO, J.; PAIVA, J.E.; MELO; L.E.H. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. Garanhuns: E. dos Autores. 2016.

PEREIRA, T.MF.F.; SOARES, K.M.P.; GÓIS, V. A; SOUZA, L.B. Staphylococcus aureus e Salmonella sp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.12, n.2, 2017.

RAMOS, K.; ANDREANI, J. R.; KOZUSNY, A. D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de Colletotrichum gloeosporioides. **Rev. Bras. Pl. Med., Campinas**. v.18, n.2, p.605-612, 2016.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

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, 2008.

SANTOS, W. B. M.; COSTA, W. S.; SOUZA, R. G.; FEITOSA, T. J. O.; PINTO, A. U.; OLIVEIRA, B. C. Análise das boas práticas de fabricação na produção de queijo de

coalho em laticínios artesanais localizados na Região Centro Sul do Ceará. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. 1-14, 2020.

SILVA, G.L.; COELHO, M. C. S. C.; COELHO, M. I. S; LIBORIO, R. C.; AMORIM, I. S.; SILVA, G. C. S. Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. **R. bras. Tecnol. Agroindustr. Ponta Grossa**. v. 12, n.1, p. 2613-2626, 2018.

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.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; 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. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.1, p. 30-35, 2014.

SOUZA, E. L.; COSTA, A. C. V.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, W. H.; OLIVEIRA, M. E. G. Qualidade do queijo de leite de cabra tipo Coalho condimentado com cumaru (*Amburana cearensis* A.C. Smith). **Braz. J. Food Technol.** Campinas, v. 14, n. 3, p. 220-225, 2011.

SOUZA, M. PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Sanitary quality and prevalence of serovars of *Salmonella* in handmade and inspected fresh pork sausages sold in western Paraná, Brazil. **Arq. Inst. Biol.** v.81, n.2, 2014.

TORRE, I.; DOMINGUES, V. M.; ACEDOS, M. G.; ESTEBAN, J.; SANTOS, V. E.; LADERO, M. Utilisation/ atualizandog de orange descascar redíduos de um biological perspectivas de biorrefinariave. **Mlini-Rewie**. 2019.

5 CONCLUSÃO

Com o presente estudo pode-se constatar que dos extratos aquosos avaliados o extrato do alho apresentou melhores resultados para a redução da carga microbiana, seguido pelo extrato do coentro e por último o extrato do velame do campo. Já dentre os óleos da casca da laranja Pineapple e limão Tahiti, o primeiro apresentou melhores resultados para promoção da redução dos contaminantes avaliados. Sensorialmente pode-se constatar que as amostras de queijo coalho tipo B com maior índice de aceitabilidade foram os do extrato aquoso do coentro e de alho, apresentando porcentagem superior a 70% quando comparado ao da amostra de queijo controle. É importante pontuar que mais estudos são necessários para efeitos de comparação para os dados aqui relatados, tendo em vista que esse é primeiro trabalho realizado com a adição destes produtos naturais ao queijo coalho tipo B.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, L. C. **Queijos no mundo**, vol I. Juiz de Fora: CT/ILCT/ EPAMIG, 2002.

ALMEIDA, T. S.; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Composição química, efeito antibacteriano e modulador de antibióticos dos óleos essenciais de *Croton campestris*. **Industria Crop Products**, v. 44, p. 630-633, 2013.

ALMEIDA, S. L.; JÚNIOR, P. G. F.; GUERRA, J. R. F. A estratégia de internacionalização de negócios na perspectiva da tradução cultural: o caso da indicação geográfica no agronegócio. **RIAE - Rev. IberoAmericana de Estratégia**, v.9, p.74-97, 2010.

ALMEIDA, M. BONAVENTURA, C.; LIMA, A. D.; AZAR, L. Alho. **Tecnologia em Gastronomia: Noções de Nutrição**. 2006.

ALVES, L. M. C.; AMARAL, L. A.; CORRÊA, M. R.; SALES, S. S. Qualidade microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís-MA. **Pesquisa em Foco**, v. 17, n. 2, 2009.

AMORIN, J. L.; SIMAS, D. L. R.; PINHEIRO, M. M. G.; MORENO, D. S. A.; ALVIANO, C. S.; SILVA, A. J. R.; FERNANDES, P. D. Anti-inflammatory properties and chemical characterization of essential oils from four citrus species. **PLoS One**, v.11, n. 4, 2016.

ANTONIOLLI, L. R.; CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. Prevenção da abscisão pré-colheita de frutos de laranjeira 'Westin'. **Cordeirópolis**, v. 24, n. 1, p. 83-94, 2003. ANTUNES, L. A. F.; VILELA S. C.; CAMPOS, S.; DUTRA, E. R. P.; MUNCK, A. V. Critérios para escolha de um coagulante. **Ha-la biotec: Chr Hansen**, n. 82, v. 4, 2004.

APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S.; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do Queijo Minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

ARAÚJO, L. A.; MARINHO, M. E.; MELO, A. P.; PAIVA, S. C.; LIMA, E. B.; NAVARRO, D. M. A. F.; LEITE, L. F. C. C. Queijo coalho tipo B com adição de extrato aquoso de coentro. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020. ASGARY, S.; KESHVARI, M. Effects of citrus sinensis juice on blood pressure. **ARYA Atheroscler**, v. 9, n. 1, p. 98-101, 2013.

ASHRAF, A.; ZAFAR, R.; ZAHID, K.; SHAH, M. Synthesis, characterization, and antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized from *Coriandrum sativum* L. **Jornal de Infecção e Saúde Pública**. v. 12, n. 2, 2018.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado queijo tipo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba, SP. **Scientia Agricola** v.53, p.159-163, 1996.

AZIZ, M.; EMAM, T. M. E.; ELSHERBINT, E. A. Effects of mandarin peel essential oil (*Citrus reticulata*) as a natural antibiofilm agent against *Aspergillus niger* in onion bulbs. **Biology and post-harvest technology**, v. 156, October 2019.

BARRETO, N. S. E.; SANTOS, G. C. F.; SOUZA, J. S.; BERNADES, F. S.; SILVA, I. P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, 2016.

BARRETO, S. M.; COSTA, M. F. L. Investigação de um surto de intoxicação alimentar em Belo Horizonte, Brasil. **Caderno Saúde Pública**, v.14, n.2, 1998.

BARROS, D. M.; MACHADO, E. C. L. MOURA, D. F.; FONTE, R. A. B.; FERREIRA, S. A. O.; BEZERRA, R. S. Aspects of coalho type cheese with emphasis on the importance of Good Manufacturing Practices in the production system. **Brazilian Journal of Develop**, v. 5, n. 1, p. 67-93, 2019.

BATATINHA, M. J. M.; BOTURA, M. B.; SANTOS, M. M.; SILVA, A.; ALMEIDA, M, G. A. R.; SANTANA, A. F.; BITTENCOURT, T. C. B. S. C.; ALMEIDA, M. A. O. Efeitos do suco de alho (*Allium sativum* Linn.) sobre nematódeos gastrintestinais de Caprinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1265-1266, 2004.

BEUX, S. Apostila de Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2011. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7PYAF/apostilatecnologia-leite>. Acesso em: 12 dez 2019.

BEZERRA, D. E. L.; SILVA-FILHO, C. R. G.; GOMES, D. J.; PEREIRA-JUNIOR, E. B. Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa – Paraíba. **Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, n. 37, 2017.

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. **Ciencia Rural [online]**, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Diário oficial da União, Brasília. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 11 mar, Seção 1, p.3977-3978, 1996.

BRASIL, R. B. NICOLAU, E.S. CABRAL, J. F. SILVA, M. A. P. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, n. 2, p. 71-80, 2015.

BRITO-JUNIOR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; BENTO, E. B.; LEMOS, I. C. S.; FIGUEIREDO, F. R. S. D. N.; MENEZES, I. R. A.; FERNANDES, G. P.; KERNTOPF, M. R. Investigação Etnofarmacológica dos Diferentes usos da Espécie *Croton campestris* A. St.-Hil: Estudo Comparativo na Biorregião do Araripe. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 19, n. 4, p. 150-156, 2015.

BRITO, K. D.; SANTOS-FILHO, J. I.; OLIVEIRA, H. B. L.; ARAÚJO, B. G.; PAIXÃO-NETO, E.; LIMA, F. C. S. Estudo experimental do limão 'Tahiti' (*Citrus latifolia* Tanaka): composição físico-química e de minerais da polpa in natura e do resíduo albedo. **Revista Principia**, n. 37, p. 64-70, 2017.

BRUNO, L. M.; MOREIRA, L. S.; SANTOS, A. S.P. Liofilização de *Lactobacillus* spp. Isolados de Queijos de Coalho Artesanal. **Embrapa, Fortaleza**, 2019.

BRUNO, L.M.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; CARVALHO, J.D.G.; ANDRADE, A.A. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.60, n.345, p.217-220, 2005.

BURIAN, J. P.; SACRAMENTO, L. V. S.; CARLOS, I. Z. Controle da infecção fúngica pelos extratos de alho (*Allium sativum* L.) e modulação da atividade de macrófagos peritoneais em modelo murino de esporotricose. **Brazilian Journal. Biology [online]**, v. 77, n.4, pp.848-855, 2017.

CAMARGO, S. M.; VASCONCELOS, D. F. S. A. Atividades biológicas de Linalol: conceitos atuais e possibilidades futuras deste monoterpreno. **Revista. Ciência Médicas**, v. 13, n. 3 – especial, p. 381-387. 2014.

CARVALHO, L. M.; CARVALHO, H. W. L.; FILHO, W. S. S.; MARTINS, C. R.; PASSOS, O. S. Porta-enxertos promissores, alternativos ao limoeiro 'Cravo', nos Tabuleiros Costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.51, n. 2, p. 132-141, 2016.

CARVALHO, I.; SOUZA, M.; WEBBER, R. N. M.; CONTINI, D.; PORCU, O. M. Queijo minas frescal adicionado de gergelim. In: Fórum das Américas: Leite e derivados; 8º Congresso Internacional do Leite. **Anais**. Embrapa - Junho, 2010. 1-CD ROM.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal Infection Disease**, v.9, n.1, p.70-6, 2005.

CASTANHEIRA, A. C. G. **Controle de qualidade de leite e derivados**. 2ª edição. Cap-Lab, São Paulo, 2012.

CASTRO, R. D.; LIMA, E.O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais. **Pesquisa Brasileira Odontopediatria Clínica Integrada**, v. 13, n. 3, p. 341-345, 2011.

CATAO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. Pesquisa de *Listeria spp.*, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciencia. Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 281-287, 2001.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L.; PINTO, C. L. O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura lática endógena. **Ciencia. Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.205-214, 2007.

CHOUDHARY, P. R.; JANI, R. D.; SHARMA, M. E. Effect of Raw Crushed Garlic (*Allium sativum* L.) on Components of Metabolic Syndrome. **Journal of Dietary Supplements**, v. 15, 2018.

CORREA, F. T.; SOUZA, A.C.; SOUZA-JÚNIOR, E.A.; ISIDORO, S. R. Effect of Brazilian green propolis on microorganism contaminants of surface of Gorgonzola-type cheese. **Journal of Food Science and Technology**. v.6, n 56, 2019.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1975.

COSTA, E. S. A.; LINO, A. T. S.; MEDEIROS, E. S.; SOARES, K. D. A.; PORTELA, O. C. Condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho comercializado em feira-livre do município de Viçosa Alagoas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 9, n. 18, 2012.

COUTINHO, H. D. M.; MATIAS, E. F. F.; SANTOS, K. K. A.; SANTOS, F. A. V.; BRAGA, M. F. B. M.; SOUZA, T. M.; ANDRADE, J. C.; SOUZA, C. E. S.; TINTINO, S. R.; GUEDES, G. M. M.; SILVA, V. S. F.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. COSTA, J. G. M. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Croton campestris* A. and *Ocimum gratissimum* L. **Biomédica**, v.31, n.1, p. 608-612, 2011.

DALE. J. Revolução láctea: o queijo artesanal brasileiro cresce e aparece. O Globo, 2016. Disponível em: <https://oglobo.globo.com/gastronomia/revolucao-lactea-queijo-artesanal-brasileiro-cresce-aparece-19524576>. Acesso em: 13 jan. 2020.

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

DELAQUIS, P. J.; STANICH, K.; GIRARD, B.; MAZZA, G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 101-109, 2002.

DHYANI, N.; PARVEEN, A.; SIDDIGI, A.; HUSSAIN, M. E. Supplements Cardioprotective Efficacy of Coriandrum sativum (L.) Seed Extract in Heart Failure Rats Through Modulation of Endothelin Receptors and Antioxidant Potential. **Journal of Dietary**. 2018.

DIAS, J. N.; FORTINELE, L. L.; MACHADO, S. M. O.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. 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.

DIAS, M. I. M. F. **Caracterização química e molecular de amostras de Coriandrum sativum L. obtidas in vivo e in vitro**. Dissertação. Escola Superior Agrária de Bragança. Bragança, 2011.

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 higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.72, p.297-302, 2005.

BONY, E. D.; SARTHOU, C.; PERELLO, M. C.; REVEL, G.; BONNARME, P.; HELINCK, S. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. **Journal of Dairy Science**, v.99, n.3, p. 2502–2511, 2016.

El-Bakry, M. Sodium in different cheese types: role and strategies of reduction. In: R. D. Foster (Ed.). Cheese: types, nutrition and consumption. **Nova Science Publishers**, p.105-118. 2011.

ESCOBAR, A.; FLORES, A.S.; QUIRASCO, M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. *Food Microbiology*, n. 57, 2016.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined proces. **Food Control**, v. 22, n. 6, p. 896-902, 2011.

FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M.; TORRES, E. A. T.; SILVA, J. F. M. Staphylococcus aureus em alimentos. **Revista Desafios**, v. 4, p. 1-17, 2017.

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. **Ciencia Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p.162-165, 2003.

FERNANDES, J. Produção de queijo origem dos coalhos. **AGROTEC**, n. 8, v. 3, 2013

FERREIRA, C.L. **Série Laticínios- Produção de queijo do reino, cottage, coalho e ricota**. CPT (Centro de Produções Técnicas), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

FIB – Food Ingredientes Brasil. **Dossiê enximas**. A evolução das enzimas coagulantes. n. 16, 2011.

FORSYTHE, S. J.; **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed. p. 216-211, 2002.

FOSCHIERA, J. L. **Indústria de Laticínios: industrialização do leite, análises, produção de derivados**. Porto Alegre: Ed. Suliani Editografia, 2004.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**. v. 18, p. 677-684, 2008.

FRACASSO, R.; PFÜLLER, E. Processamento do leite para a fabricação do queijo na indústria de laticínios Camozzato Ltda, SANANDUVA – RS. RAMVI, **Getúlio Vargas**, v. 01, n. 02, 2014.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, cap. 4, p. 48-60, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 2 ed. São Paulo: Editora: Atheneu. 2005.

FREIRES, I. A.; MURATA, R. M.; FURLETTI, V. F.; SARTORATTO, A. ALENCAR, S. M.; FIGUEIRA, G. M.; RODRIGUES, J. A. O.; DUARTE, M. C. T.; ROSALENP, L. *Coriandrum sativum* L. (coriander) Essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in the human whole-genome expression. **Plos One**, v. 9, n. 6, 2014.

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**, v.15, n.1, 2013.

FREITAS-FILHO, J. F.; SOUZA-FILHO, J. S.; OLIVEIRA, H. B.; ANGELO, J. H. B. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. *Extensio Revista Eletrônica de Extensão*, v. 81, n. 1, 2009.

FURTADO, M. M. **Queijos finos maturados por fungos**. São Paulo: Milkbizz, p.128, São Paulo, 2003.

GARCÍA, V.; ROVIRA, S.; BOUTOIAL, K.; ÁLVAREZ, D.; LÓPEZ, M. B. A comparison of the use of thistle (*Cynara cardunculus* L.) and artichoke (*Cynara*

scolymus L.) aqueous extracts for milk coagulation. **Dairy Science & Technology**, v. 95, p. 197-208, 2015.

GELATTI, L. C.; BONAMIGO, R. R.; BECKER, A. P. AZEVEDO, P. A. Staphylococcus aureus resistentes à meticilina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.5, 2009.

GILENO, M. C. Efeito do Allium Sativum L. sobre funções de neutrófilos humanos. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 21, n. 1, 2020.

GILLET, Y.; ISSARTEL, B.; VANHEMS, P.; FOURNET, J. C.; LINA, G.; BES, M.; VANDENESCH, F.; PIÉMONT, Y.; BROUSSE, N.; FLORET, D.; ETIENNE, J. Association between Staphylococcus aureus strains carrying gene for PantonValentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. **Lancet**, v. 359, n. 2, p. 753-9, 2002.

GOMES, R. A.; MEDEIROS, U. K. L. Caracterização físico-química dos Queijos de Coalho artesanal e industrial comercializados na cidade de Currais Novos/RN. In: **VII CONNEPI Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. 2012.

HAJI-MOHAMMADI, K H; HEIDARPOUR, M; BORJI, H. Allium Sativum Methanolic Extract (garlic) Improves Therapeutic Efficacy of Albendazole Against Hydatid Cyst: In Vivo Study. **Journal of Investigative Surgery**, v.32, n.8, p. 723-730, 2019.

HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N.; HERNÁNDEZ, L. R.; TAPIA, E. B.; NATAN, P.J. Three new diterpenoids based on novel sarcopetalene skeleton from Croton sarcopetalus. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 222-225, 2000.

IBGE-SIDRA. **Produção agrícola municipal**. 2014. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1612>. Acesso em: 23 mar. 2020.

JAY, J. M. **Microbiol de Alimentos**. 6 ed. Editora Artmed, Porto Alegre, p.711, 2005. KAMLEH, R.; OLABI, A.; TOUFEILI, I.; NAJM, N. E. O.; YOUNIS, T.; AJIB, R. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physico chemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.3, p.1146–1149, 2012.

KEKLIK, N. M.; ELIK, A.; SALGIN, U.; DEMIRCI, A.; KOÇER, G. Inactivation of Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157: H7 on fresh kashar cheese with pulsed ultraviolet light. **Food Science and Technology International**, v. 25, p. 680-691, 2019.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A. R. Rennet Coagulation and Cheesemaking Properties of Thermally Processed Milk: Overview and Recent Developments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 9389–9403, 2015.

KUMMER, R.; QUEIROZ, F. C. F.; SILVA, C. F. E.; GRESPAN, R.; SILVA, E. L.; AMADO, C. A. B.; CUMAN, R. K. N. Evaluation of Anti-Inflammatory Activity of Citrus

latifolia Tanaka Essential Oil and Limonene in Experimental Mouse Models. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

LOPES, A.; TEIXEIRA, D.; CALHAU, C.; PESTANA, D. **Ervas aromáticas – uma estratégia para a redução do sal na alimentação dos portugueses**. Programa Nacional para a Promoção da Alimentação Saudável, 2014.

LORENZI, H. MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa. Instituto Plantarum. 2002.

LPO, N. G.; ANWAR, F.; GILANI, A. H.; HAMID, A. A. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): A Potential Source of High-Value Components for Functional Foods and Nutraceuticals - A Review. **Phytotherapy Research**, v. 27, n.10, 2012.

MAFRA, P. A. M. **Croton campestris A.St.-Hil: atividades antitumoral e antiinflamatória**. 2017. Tese (Doutorado em m Biologia Celular e Estrutural) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. Campinas – SP. 2017.

MAMEDE M. E. O., VIANA, A. C., SOUZA, A. L. C., FARIAS, S.A.O, ARAUJO, P. A. 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.

MARTINS, J. M.; GALINARI, E. PIMENTEL-FILHO, N. J.; RIBEIRO-JUNIOR, J.I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n. 1. p. 219 – 230, 2015.

MASSON, C. O. Alho “Tecnoemioacional”. **Revista época**. 2007.

MENDES, E. S.; LIMA, E. C.; NUMERIANO, A. K. M.; COELHO, M. I. S. N. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijo de “coalho” comercializados em Recife. **Higiene Alimentar**, v.13, n.66/67, p.122-126, 2001.

MENDONÇA, L. M. V. L.; CONCEIÇÃO, A; PIEDADE, J.; CARVALHO, V. D.; THEODORO, V. C. A. Caracterização da composição química e do rendimento dos resíduos industriais do limão Tahiti (*Citrus latifolia*, Tanaka). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 4, p. 870-874, 2006.

MIN, K. Y.; LEE, K. A.; KIM, H. J.; KIM, K. T.; CHUNG, M. S.; CHANG, P. S.; PARK, H. PAK, H. D. Antioxidant and anti-inflammatory activities of Citrus unshiu bark extracts using a combined process of subcritical water extraction and acid hydrolysis. **Food Science and Biotechnology**. v.23, 2014.

MUNCK, A.V. Queijo de Coalho – Princípios básicos da fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. v.59, n.339, p.13-15, 2004.

NASSAR, K; LUNDIM, J; IORDACHE, F.D.; HAILU, Y.; KIDE, M.H. The production of Cheddar cheese. **Research**. 2015. Disponível em

https://www.researchgate.net/publication/282804567_The_production_of_Cheddar_cheese. Acesso em: 12 dez 2019.

NASSU, R.T.; LIMA, J.R.; BASTOS, M.S.R.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36, 2001.

NASSU, R.T.; MACEDO, B.A.; LIMA, M.H.P. Queijo de Coalho. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. Disponível em: <https://central3.to.gov.br/arquivo/228628/>. Acessado em: 12 dez. 2019.

NEVES, M. F. et al. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. In: NEVES, M. F. (Coord.). 1. ed. Ribeirão Preto: Markestrat, 2010.

NUNES, M. M.; MOTA, A. L. A. A.; CALDAS, E. D. Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. **Food Control**, v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013.

NUÑEZ, M. J. V.; SOSA, R. A.; PALOU, E.; MALO, A. L. Antifungal activity of orange peel essential oil (*Citrus sinensis* var. Valencia) applied by direct addition or contact with steam, **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2018.

O'BRIEN, M.; HUNT, K.; MCSWEENEY, S.; JORDA, K. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. **Food Microbiology**, v. 26, n. 8, p. 910-914, 2009.

ORTOLANI, M. B. T.; VIÇOSA, G. N.; BELOTI, V.; NERO, L. A. Screening and enumeration of lactic acid bacteria in milk using three different culture média in Petrifilm™ Aerobic Count plates and conventional pour plate methodology. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 74, n. 4, p. 387-391, jul. 2007.

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

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. **O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias**. Garanhuns: E. dos Autores. 2016

PARODIA, C. G. **Desenvolvimento de queijo Cottage simbiótico**. 2010. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2010.

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

PEREIRA, A. C. P. **Características físicas, químicas e microbiológicas de queijos tipo Brie e tipo Camembert produzidos no Brasil**. Dissertação (Mestrado

em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2014.

PEREIRA, T. M. F.; GOIS, V. A.; PAIVA, K. M.; SOUZA, L. B.; SOUZA, J. A. Staphylococcus aureus e Salmonella sp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde**, v.12, n.2, p.358-361, 2017.

PERESI, J.T.M.; GRACIANO, R.A.S.; ALMEIDA, I.A.Z.C. et al. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.15, p.63-70, 2001.

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

PINTADO AIE, PINHO O, FERREIRA IMPLVO, PINTADO MME, GOMES AMP, MALCATA FX. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, v.18. 2008.

PRIYADARSHI, S.; KHANUM, H. RAVI, R.; BORSE, B.B. Flavour characterisation and free radical scavenging activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) foliage. **Journal of Food Science and Technology – Mysore**. v. 53, n.3, 2015.

PRIYADARSHI, S.; KHANUM, H.; RAVI, R.; BORSE, B.B.; NAIDU, M.M. Flavor characterization and free radical scavenging activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) foliage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 3, p. 1670–1678, 2016.

RAMOS, K.; ANDREANI, J. R.; KOZUSNY, A. D. I. Óleos essenciais e vegetais no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais (RBPM)**, v.18, n.2, p.605-612, 2016.

REIS FILHO, R.J.C.; MEDEIROS, C. B. Região Nordeste: potencial de produção, fatores conjunturais, deficiências e expectativa do setor leiteiro. **Revista Balde Branco**, n. 524, p. 74-76, 2008.

REIS-FILHO, R. J. C. et al. **Cenários para o leite e derivados na Região Nordeste em 2020**. Editores, Recife: Sebrae, 2013.

RESENDE, A. L.; FERREIRA, R.B.; SOUZA, B. Atratividade de adultos de *Chrysoperla externa* (Hagen, 1861) aos compostos voláteis de coentro, endro e erva-doce (Apiaceae) em condições de laboratório. **Revista Ceres**, v.62, n.1, 2015.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.; NUNES, A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidoláticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, 2011.

REZENDE, D.C.; WILKINSON, J. Coordenação da qualidade em cadeias produtivas de alimentos: o caso dos queijos finos do Brasil. **Revista Econômica**, v. 7. 2005.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 113-117, 2005.

RIBEIRO, J.A. Queijos do Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 14, n. 86, p. 33-34, 1959.

SABIONI, J.G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L.; Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde pública**, v. 22, p. 458-461, 1988.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* metilina resistente: Um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, n.3, p. 1-13, 2012.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

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, 2008.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A., Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba**, v. 13, n. 1, p. 31-361, 1995.

SANTOS, K. B.; GOMES. J.M.A.; GOMES, R. L. F.; FIGUEREDO, L. S. O sistema de cultivo de alho (*Allium sativum* L.) na microrregião de Picos (PI). **Revista Espacios**. v. 38, n. 21, 2017.

SANTOS, K. K. A.; MATIAS, E. F. F.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Atividade antifúngica de extratos vegetais e animais da região do cariri. **Caderno de Cultura e Ciência, Crato-CE**, v.1, n. 1, p. 53-65, 2010.

SBAMPATO, C. G.; ABREU, L. R.; FURTADO, M. M. Gorgonzola type cheese manufactured with milk pasteurized by the HTST and steam ejector systems: Physico-chemical and sensory parameters. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, n. 35, v. 1, p. 191-200, 2020.

SEBRAE/CE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no Ceará**. Fortaleza: SEBRAE-CE, 2008.

SHINOHARA, N. K. S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R. A.F.; LIMA-FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência Saúde Coletiva**, v.13, n.5, 2008.

SILVA, G.L.; COELHO, M. C. S. C.; COELHO, M. I. S.; LIBORIO, R. C.; AMORIM, I. S.; SILVA, G. C. S. Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Ponta Grossa, v. 12, n.1, p. 2613-2626, 2018.

SILVA, J. F.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. **DESAFIOS Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, v. 4, n. 4, p.15-31, 2017.

SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S. V.; GURGEL, A. P. D.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista brasileira Farmacognosia**, v. 19, n. 3, 2009.

SILVA, M. C. D.; RAMOS, A. C. S.; MORENO, I.; MORAES, J. O. de et al. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; 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. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p. 30-35, 2014

SOUZA, L. S. S.; SOARES, A. N. F. Extrato aquoso de alho (*allium sativum* L.) no controle de *aspergillus niger* causador da podridão vermelha em sisal. **Revista Tecnológica**, v.17, n. 2, 2014.

SOUZA, M. PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; MOURA, A. C. Sanitary quality and prevalence of serovars of *Salmonella* in handmade and inspected fresh pork sausages sold in western Paraná, Brazil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.81, n.2, 2014.

TINTINO, C. D. M. O.; PESSOA, R. T.; FERNANDES, M. N. M.; ALCÂNTARA, I. S. Anti-inflammatory and anti-edematogenic action of the *Croton campestris* A. St.-Hil (Euphorbiaceae) essential oil and the compound β -caryophyllene in in vivo models. **Phytomedicine**, n. 41, 2018.

TORNADIJO, M. E.; GARCIA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALHO, J. Study of Enterobacteria ceaduring the mufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 499-509, 2001.

TORRE, I.; DOMINGUES, V. M.; ACEDOS, M. G.; ESTEBAN, J.; SANTOS, V. E.; LADERO, M. Utilisation/ atualizandog de orange descascar redíduos de um biological perspectivas de biorrefinariave. **Mlini-Rewie**. 2019.
USDA. Produção brasileira de lácteos deve crescer 2% em 2020, estima USDA, 2019. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/noticias-e-mercado/gironoticias/producao-brasileira-de-lacteos-crescera-2-em-2020-estima-usda216615>/Acesso em: 30 abr de 2020.

VILELA, D. et al., (2016) Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos – Brasília, DF: **Embrapa**. 2020.

WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**, v. 88, p. 293–297, 2004.

WEI, J. N.; LIU, Z. H.; ZHAO, Y. P.; ZHAO, L. L. Phytochemical and Bioactive Profile of *Coriandrum sativum* L. **Food Chemistry**, v. 286, 2019.

WOLUPECK, H. L.; RAKSA, H. C.; ROSSA, L. S.; BIASI, R.; MACEDO, R. E. F. Evolução da qualidade microbiológica de queijo Minas frescal comercializado em Curitiba (PR) no intervalo de 10 anos (1999 e 2009). **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 243-252, 2012.

WYK, B. E. V.; WINK, M. Medicinal plants. First edition. Portland, OR. **Timber Press**, 2004.

YASHASWINI, P.; ARVIND. Antimicrobial Properties of Orange (*Citrus reticulata* var. Kinnow) Peel Extracts against Pathogenic Bacteria. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 7, n.3, 2018.

ZANUSSO-JUNIOR, G; MELO, J. O; ROMERO, A. L; DANTAS, J. A; CAPARROZ-ASSEF, S. M; BERSANI-AMADO, C. A; CUMAN, R. K. N. Avaliação da atividade antiinflamatória do coentro (*Coriandrum sativum* L.) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.13, n.1, 2011.

ZULIAN, A.; DÖRR, A. C.; ALEMIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 11, n.11, 2013.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA RESEARCH, SOCIETY AND

Research, Society and Development, v. 9, n. 10, eXX, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8855>

Queijo coalho tipo B com adição de extrato aquoso de coentro

Type B coalho cheese with the addition of aqueous coriander extract

Queso de cuajo tipo B con la adición de extracto acuoso de cilantro

Recebido: 28/09/2020 | Revisado: 01/10/2020 | Aceito: 02/10/2020 | Publicado: 04/10/2020

Liderlânio de Almeida Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4081-4354>

Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

E-mail: liderlanioalmeida@gmail.com

Marcella Estanislau Marinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8237-349X>

Universidade Católica de Pernambuco, Brasil

E-mail: marcellaestanislau@yahoo.com.br

Alexciana Pereira Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7062-0024>

Universidade Católica de Pernambuco, Brasil

E-mail: alexylemelo@hotmail.com

Sergio Carvalho de Paiva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0934-7102>

E-mail: spaiva@unicap.br

Edna Barboza de Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3889-1051>

E-mail: ednabarbozalima@gmail.com

Edvane Borges da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7839-9945>

E-mail: edvborges@yahoo.com

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0158-7221>

E-mail: dmafn@ufpe.br

Lucia Fernanda C. da Costa Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6581-1275>

E-mail: lfernanda100@gmail.com

Resumo

O queijo coalho produzido com leite de vaca é um produto típico do Brasil, sendo considerado um patrimônio da região Nordeste, local de sua origem. Este agrega fonte de renda para seus produtores e comerciantes movimentando a economia de diversas cidades. Assim, este trabalho tem por finalidade avaliar a ação do extrato aquoso das folhas do coentro adicionado ao queijo coalho frente aos microrganismos *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* bem como analisar a qualidade sensorial deste produto após a adição do extrato e a sua influência em alguns parâmetros físico-químico. Pode-se observar que na avaliação sensorial o coentro promoveu pequenas alterações nos parâmetros avaliados, assim, como nos aspectos físico-químico, porém não foram significativos a nível estatístico. Na avaliação microbiológica constatou-se uma redução do teor de *S. aureus* para o queijo contendo o extrato. Concluiu-se que mais estudos são necessários para avaliar a redução microbiana na amostra contendo o extrato aquoso do coentro e que a aceitabilidade do queijo foi positiva.

Palavras-chave: Carga microbiana; Aroma; Análise sensorial.

Abstract

Coalho cheese produced with cow's milk is a typical product of Brazil, being considered a heritage of the Northeast region, where it originated. This adds a source of income for its producers and traders, moving the economy of several cities. Thus, this work aims to evaluate the action of the aqueous extract of coriander leaves added to rennet cheese against the microorganisms *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus* as well as to analyze the sensory quality of this product after the addition of the extract and its influence on some physical parameters - chemical. It can be observed that in the sensory evaluation, coriander promoted small changes in the evaluated parameters, as well as in the physical-chemical aspects, but they were not statistically significant. The microbiological evaluation showed a reduction in the content of *S. aureus* for the cheese containing the extract. We concluded that more studies are needed to evaluate the microbial reduction in the sample containing the aqueous extract of coriander and that the acceptability of the cheese was positive.

Keywords: Microbial load; Aroma; Sensory analysis.

Resumen

El queso coalho elaborado con leche de vaca es un producto típico de Brasil, siendo considerado patrimonio de la región Nordeste, de donde se originó. Esto agrega una fuente de ingresos para sus productores y comerciantes, moviendo la economía de varias ciudades. Así, este trabajo tiene como objetivo evaluar la acción del extracto acuoso de hojas de cilantro añadido al queso de cuajo contra los microorganismos *Salmonella spp.* y *Staphylococcus aureus* así como analizar la calidad sensorial de este producto tras la adición del extracto y su influencia en algunos parámetros físicos-químico. Se puede observar que en la evaluación sensorial, el cilantro promovió pequeños cambios en los parámetros evaluados, así como en los aspectos físico-químicos, pero no fueron estadísticamente significativos. La evaluación microbiológica mostró una reducción en el contenido de *S. aureus* para el queso que contiene el extracto. Concluimos que se necesitan más estudios para evaluar la reducción microbiana en la muestra que contiene el extracto acuoso de cilantro y que la aceptabilidad del queso fue positiva.

Palabras clave: Carga microbiana; Aroma; Análisis sensorial.

1. Introdução

O queijo coalho é um produto que tem como matéria prima o leite de vaca, sendo típico da região Nordeste do Brasil, tendo sua origem no estado de Pernambuco e em seguida passar a ser produzido nos demais estados (Santos, et al.,2020). Esse, é classificado em dois tipos A e B, o primeiro é fabricado com leite submetido ao processo de pasteurização e segundo é preparado com o leite *in natura*, sendo classificado como produto artesanal (Duarte et al.,2005; Silva et al.,2018).

Inicialmente o queijo coalho tipo B era empregado apenas para o consumo da própria família ou para presentear parentes ou amigos principalmente em festividades como a Semana Santa. Com o passar dos tempos começou a ser difundido por todo o Nordeste e em alguns casos é comercializado em outras regiões do Brasil. Este, pode ser encontrado em feiras livres, padarias, supermercados, sendo consumido cru, assado, frito, puro ou como acompanhamento de diversos pratos. É rico em vitaminas, com ênfases para tipo A e B, proteínas, lipídios e sais minerais. Se caracteriza por possuir formato retangular, massa branca, consistência semidura, sabor levemente ácido e salgado, textura compacta e macia, com teor de gordura de 35,0% até 60,0% (Carvalho, et al.,2005; Franco; Landgraf, 2008; Paquereau, Machado e Carvalho, 2016).

Os pesquisadores que trabalham com queijo coalho do Tipo B vem destacando em seus estudos a necessidade de aperfeiçoar os padrões de produção, ordenha, armazenamento e transporte, uma vez que evidenciam índices de contaminação por Coliformes Total e Termotolerantes, Bolor e Levedura, *Salmonellas spp.* e *Staphylococcus aureus*. Apesar deste produto ter sua origem há mais de cem anos ainda não existe uma padronização técnica eficiente para proporcionar maior segurança alimentar (Carvalho, 2007; Vidal, 2011; Silva, Furtado e Vargas 2017; Lima et al., 2020).

A qualidade microbiológica é muito importante para a comercialização do queijo coalho, pois atua como indicador higiênico-sanitário que proporciona as informações necessárias para indicar o quanto os alimentos estão em correlação com os padrões estabelecidos pela legislação para o consumo prevenindo assim, doenças veiculadas aos diferentes tipos de microrganismos. Dugat-Bony et al. (2016) enfatizam que a legislação brasileira não estabelece um padrão normativo, para o número de bolor e leveduras presente em amostras de queijo coalho, porem esse é um forte indicador de qualidade dos produtos alimentícios, pois são responsáveis pela promoção da deterioração e mudanças na aceitabilidade não apenas do queijo como dos demais alimentos.

A RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) de nº 146 estabelece como limite máximo aceitável para *S. aureus* é $1,0 \times 10^3$ UFC/g ou $3 \log$ UFC/g. Este microrganismo é responsável pelo surgimento de algumas doenças como pneumonia, meningite, endocardite, dentre outras. Bezerra et al. (2017) observaram em queijos coalho tipo B produzidos na cidade de Souza – PB que 65% das amostras apresentavam essa bactéria com valor acima do limite tolerável. Melo et al. (2009) ao avaliarem amostras de queijo coalho, oriundos de São Luís – MA, chegaram à conclusão de que 23,3% continham esse microrganismo.

Outro microrganismo que segundo a legislação brasileira não deve constar no queijo coalho é a *Salmonella ssp* que é responsável por transmitir a toxinfecção alimentar. Alguns estudos como o realizado por Bezerra et al. (2017) evidenciaram a presença dessa em 40% das amostras de queijo coalho comercializados em Souza – PB.

Alguns estudos vêm sendo desenvolvidos visando reduzir ou eliminar a carga microbiana presente nos queijos coalho com o intuito de promover maior segurança alimentar, uma alternativa é a adição de produtos naturais ao queijo. Uma possível alternativa seria adicionar ao queijo o extrato do coentro, uma vez que essa erva possui diversas propriedades como antimicrobiana e antifúngica, podendo ser adicionado aos alimentos como tempero ou para contribuir na redução ou eliminação de microrganismo.

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) tornou-se um tempero bastante presente na cozinha do brasileiro ao longo dos tempos. Sendo suas folhas e sementes empregadas no cozimento e decoração de pratos, com origem na área leste do mediterrâneo e oeste da Ásia a partir daí sendo difundido para as demais regiões do globo. Essa planta pode ter até um metro de altura, do plantio até estar pronto para comercialização leva um período de 40 a 55 dias. Suas folhas são alternas do tipo pinada ou pintada de cor verde, com caule ereto (Wyk e Wink, 2004; Borse e Priyadarshi 2014).

A erva coentro possui vasto benefícios para saúde, apresentando propriedades antioxidante e antimicrobiano, favorecendo a digestão, redução de gases intestinais e cólicas. Atuando também, como regulador do apetite e atuando contra ansiedade, antidiabéticos e nervosismo. Este é excelente fonte de cálcio, ferro, vitamina C e provitamina A, sendo uma planta aromática, com propriedades medicinais como anti-inflamatórios, analgésicos, hipotensores, vasorrelaxante, antinociceptivos possuindo também ação antimicrobiana, devido ao linalol (70%) presente em seu óleo essencial (Sahib et al.,2012; Ashraf, et al., 2018).

O coentro é um ótimo substituto do Cloreto de Sódio (NaCl), uma alternativa segura, uma vez que em muitos países o consumo de sal pela população é superior ao permitido pela Organização Mundial de Saúde (5g). Realinho (2007) enfatiza que essa erva pode ser usada como “aromatizante de pão, bolos, licores alcoólicos, vinagres, como condimento nos estufados e em saladas”.

Diversos estudos vêm apontando a importância do coentro nos diversos segmentos da área da saúde como na Fitoterapia, os frutos são usados como estimulantes do apetite e das secreções digestivas. O seu óleo essencial é usado no tratamento de inflamações osteoarticulares. Priyadarshi et al. (2016) afirmou que o seu extrato etanoico apresentou atividade significativa no combate de radicais livres. Na medicina popular atua no combate de hérnias, náuseas, febre, dores menstruais, sendo um excelente diurético (Sousa, et al.,2011).

Assim, o presente estudo tem por finalidade avaliar a ação do extrato aquoso das folhas do coentro adicionado ao queijo coalho frente aos microrganismos *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* bem como analisar a qualidade sensorial deste produto após a adição do extrato.

2. Metodologia

O queijo coalho tipo B foi obtido na cidade de Venturosa - PE, sendo 1kg do mesmo produzido com 8 litros de leite. 20 gramas das folhas de coentro obtidos em uma feira de produtos de cultivar orgânico foram pesados e lavados. Em seguida adicionou-se as folhas ao cartucho de papel filtro apropriado para o aparelho de Soxhlet. No balão de fundo redondo foram adicionados 250 mL de água destilada. A extração durou o tempo necessário para que a água passasse pelo Soxhlet por 3 vezes.

Em seguida o extrato aquoso foi adicionado ao queijo coalho após 24 horas de sua produção, esse intervalo de tempo foi escolhido porque ocorre durante esse tempo a liberação da maior porcentagem do soro residual da produção. 1,2kg do queijo foi dividido em 4 grupos contendo 300g cada, no primeiro adicionou-se 5 mL do extrato aquoso do coentro, no segundo 10 mL do extrato aquoso do coentro, no terceiro colocou-se 15 mL do extrato aquoso do coentro e o quarto compreende a amostra controle.

Os 4 grupos foram analisadas nos tempos 1, 5, 10 e 15 dias após a adição do extrato e armazenados, em recipientes (20 cm de comprimento, 7,2 cm de altura e 12,5 cm de largura), em refrigerador a uma temperatura de 10 °C.

2.1. Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas no presente estudo foram *Salmonellas spp* e *Staphylococcus aureus*. Sendo o processo metodológico aplicado de acordo com a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003 ocorrendo da seguinte forma:

A identificação do *Staphylococcus aureus* foram feitas em placa de Petri, contendo três diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) com inóculo de 0,1 mL da amostra para cada diluição em suas respectivas placas em triplicata. A incubação das placas invertidas foi em B.O.D a temperatura de 36 ± 1 °C por um período de 48 horas. Em seguida, realizou-se a contagem das colônias presentes nas placas e o resultado expresso em UFC/g.

Salmonella spp. a avaliação foi realizada em triplicata, confirme procedimento: inicialmente foi feito a etapa do pré-enriquecimento, foram utilizados $25 \pm 0,2$ g de cada amostra de queijo coalho, com adição de cada um dos volumes de Velame estudados (o controle, 5 mL, 10 mL e 15 mL), as quais foram adicionadas em 4 tubos contendo 225 ml de solução salina peptonada 1% tamponada (ACUMEDIA, MI, USA).

Essas misturas foram homogeneizadas por 1 minuto no Stomacher (Modelo MA440, Piracicaba, Brasil) e, a seguir, os tubos contendo as misturas foram incubados a 36 °C por 18 horas. Na etapa de enriquecimento seletivo, retiraram-se três alíquotas de 1 mL de cada uma das 4 amostras pré-enriquecidas; 1 mL foi adicionado em um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (ACUMEDIA, MI, USA); 1 mL adicionado em tubo contendo 10 mL de caldo selenito cistina (ACUMEDIA, MI, USA), e; 1 mL adicionado a um tubo contendo 10 mL de caldo tetrationato (ACUMEDIA, MI, USA), totalizando 12 tubos. Todos estes tubos foram incubados em banho-maria, com agitação, por 24 horas a 41 °C. Posteriormente, realizou-se o isolamento, onde, os caldos do enriquecimento seletivo foram repicados sobre a superfície previamente seca de placas contendo o meio sólido seletivo, estriando de forma a se obter colônias isoladas. Essas placas foram incubadas a 36 °C por 24 horas. Após este período, as colônias características foram submetidas a testes bioquímicos para avaliar a presença ou ausência de *Salmonella spp.*

2.2. Análises físico-química

As análises realizadas no referido estudo foram: pH, acidez titulável e umidade, todas foram realizadas em triplicata e determinadas de acordo com a instrução Normativa Nº 68 (BRASIL, 2006). Para a determinação da acidez total os ácidos graxos livres foram extraídos com água a 40 °C e neutralizados até o ponto de equivalência, que foi obtido por titulação com solução padronizada de NaOH 0,1 N e o resultado foi expresso em porcentagem de ácido láctico, para cada análise foram usados 10g. A Umidade foi encontrada por meio de estufa de circulação de ar contínua, a 105 °C, por 6 horas. E o pH foi determinado utilizando um pHmetro modelo Qualxtron model 8010, onde 10g das amostras foram trituradas e adicionou-se em seguida 20 mL de água destilada. Após homogeneização o pH foi medido diretamente.

Para a realização da **análise sensorial** foi solicitado, inicialmente, aprovação do comitê de ética, sendo o projeto aprovado com número do Parecer: 3.897.504, do Comitê de Ética da UFPE. Essa análise deu-se por meio da aplicação do teste de aceitabilidade com avaliação dos atributos de textura, cor, sabor, aparência e aceitação global. O teste foi realizado com provadores não treinados, um total de 155 pessoas, dentre estes alunos e funcionários da Universidade Católica de Pernambuco e da Universidade Federal de Pernambuco. A análise ocorreu no sétimo dia de armazenamento e os participantes assinaram um termo de consentimento concedendo a permissão para divulgação dos resultados.

Os provadores julgaram duas amostras uma continha o queijo coalho com o extrato aquoso do coentro e o outro o queijo sem o extrato (amostra controle), cada uma servida em prato descartável branco e servido juntamente com um copo de água mineral. Os voluntários classificaram as amostras segundo uma escala hedônica de nove pontos, ancorada nos extremos, cujo nove refere-se a “gostei muitíssimo” e um “desgostei muitíssimo”.

2.3. Tratamento estatístico

O tratamento estatístico aplicado para os dados sensoriais e físico-químico foi a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey (5% de significância), por meio do programa MINITAB 19.

3. Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os valores obtidos na análise para *S. aureus* pode-se observar que a amostra controle para os dois primeiros dias de avaliação se manteve constante, porém a partir do decimo dia de avaliação estes valores foram aumentando, estando acima do limite estabelecido pela legislação que é de 1.10^3 UFC/g. Em se tratando da amostra em contato com o extrato aquoso do coentro verifica-se que a partir do 5º dia de análise este passou a apresentar uma redução para as amostras contendo o extrato. De modo geral, ao aumentar a concentração do extrato ocorre redução microbiana com os dias de armazenamento. Na literatura não existe relato da interação entre o extrato aquoso do coentro com o queijo coalho frente a *S. aureus*, sendo assim, importante o desenvolvimento de mais estudos para avaliar tal interação.

Dua et al. (2014) o extrato metanólico das sementes de coentro apresentou concentração inibitória mínima 4,16 mg/mL frente aos microrganismos *Escherichia coli.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus pumilus*. Molina et al. (2020) evidenciaram forte atividade antibacteriana contra *S. aureus* do antibiofilme produzido com o extrato hexano do coentro. Isão et al. (2004) pontuam que o óleo essencial do coentro possui uma gama vasta de compostos, apresentando ação antibacteriana como destaca Matasyoh et al. (2009) evidenciaram a ação do óleo essencial frente as bactérias *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *P. aeruginosa*.

Autores como Fan e Sokorai (2002) e Kubo et al. (2004) relatam que as folhas frescas do coentro possuem alguns compostos que estão se revelando como antibacteriano. Saeed e Tariq (2007) estudaram a ação antibacteriana do extrato aquoso do coentro preparada por decocção e por infusão frente a 6 gêneros de bactérias Gram negativas presentes no sistema urinário e concluíram que o extrato aquoso não foi eficaz para a eliminação por completo das bactérias avaliadas. O mesmo ocorreu no presente estudo, no qual o extrato aquoso do coentro não foi capaz de eliminar os *S. aureus*, porém promoveu uma redução na presença deste, apesar de haver mais estudos para comprovar se foi ou não este responsável por tal variação no presente estudo.

Tabela 1 - Resultados das análises microbiológicas para *S. aureus* (UFC/g) por dia de avaliação para a amostra controle e as amostras contendo extrato aquoso do coentro.

Volume (mL)	1º dia	5º dia	10º dia	15º dia
00*	$1,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^5$
05	$1,0 \cdot 10^4$	$3,8 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^2$	$1,8 \cdot 10^2$
10	$1,0 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^2$	$2,3 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^2$
15	$1,0 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^2$	$2,1 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$

* Amostra controle (ausência do extrato aquoso do coentro).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Sousa et al. (2014) constaram que 99 de 104 amostras de queijo coalho obtidas de diversos estados do Nordeste brasileiro estavam com contaminação elevada para *S. aureus* destacando valores obtidos até a ordem de $2,5 \cdot 10^5$ UFC/g. Na avaliação de três laticínios de cidades do estado da Paraíba levou Freitas, Travassos e Maciel (2013) constatarem uma taxa com variação de $4,0 \cdot 10^2$ a $1,2 \cdot 10^6$ UFC/g para *S. aureus*, concluindo que apenas um laticínio estava dentro dos padrões estabelecidos para o referido microrganismo.

Silva et al. (2010) evidenciaram elevados índices de contaminação em amostras de queijos de coalho, para as três amostras avaliadas os valores foram superiores a $1,1 \cdot 10^3$ UFC/g para *S. aureus* inclusive para o queijo produzido com o leite submetido ao aquecimento. Em estudo que avaliou 24 amostras de queijo coalho tipo B produzidos no estado de Rio Grande do Norte foi possível constatar que

72,7% estavam contaminados por *S. aureus* com taxa de contagem variando de $7,0 \cdot 10^4$ a $1,3 \cdot 10^8$ (Feitosa et al., 2003).

Na Tabela 2 pode-se constatar que tanto para a amostra controle quanto para as contendo o extrato aquoso do coentro que houve ausência de *Salmonellas spp.* por 25g de queijo avaliado.

Tabela 2 - Valor obtido nos dias de análise para *Salmonella spp.* 25g.

Volume (mL)	1º dia	5º dia	10º dia	15º dia
00*	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
05	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
15	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

* Amostra controle.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Resultados para *Salmonella spp.* igual ao obtido neste estudo foi evidenciado por Sousa et al. (2014) no qual obtiveram ausência deste microrganismo tanto para o queijo coalho produzido com inspeção como para o sem inspeção de acordo com padrão da ANVISA. Evangelista-Barreto et al. (2016) também evidenciaram ausência de *Salmonella spp.* em amostras comercializados em Cruz das Almas, Bahia. Sousa et al. (2020) em estudo com queijo coalho produzido na zona rural do município de Soledade, Paraíba também constataram ausência desse microrganismo.

É possível encontrar na literatura trabalhos que evidenciam a presença de *Salmonella spp.* em queijo coalho como aponta Mendes et al. (2001) que na avaliação deste concentrado lácteo comercializado na cidade do Recife obtiveram que 73,3% das amostras continha esse microrganismo. Oliveira et al. (2010) encontram 4 amostras de 42 analisadas com presença de *Salmonella spp.* e Duarte et al. (2005) evidenciaram uma porcentagem de 5,5% das amostras avaliadas. Souza et al. (2014) constataram apenas uma amostra positiva para esse de 104 avaliada.

A adição desse extrato ao queijo não promoveu alterações bruscas na avaliação físico-química para os padrões de pH, acidez titulável e umidade como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores encontrados na análise físico-química para os dias avaliados.

Concentrações	Dias	Umidade	pH	Ac. titulável
0 mL E.C	1	43,10 ^a	5,57 ^a	0,38 ^a
	5	42,50 ^a	5,55 ^a	0,43 ^a
	10	41,00 ^a	5,42 ^a	0,47 ^a
	15	38,60 ^a	5,43 ^a	0,52 ^a
5 mL E.C	1	43,10 ^a	5,60 ^a	0,38 ^a
	5	42,60 ^a	5,56 ^a	0,44 ^a
	10	41,00 ^a	5,45 ^a	0,49 ^a
	15	38,60 ^a	5,41 ^a	0,54 ^a
10 mL E.C	1	43,50 ^a	5,65 ^a	0,38 ^a
	5	43,00 ^a	5,60 ^a	0,44 ^a
	10	41,10 ^a	5,52 ^a	0,48 ^a
	15	38,60 ^a	5,45 ^a	0,56 ^a
15 mL E.C	1	43,50 ^a	5,65 ^a	0,41 ^a
	5	43,30 ^a	5,61 ^a	0,46 ^a
	10	41,20 ^a	5,55 ^a	0,53 ^a
	15	38,70 ^a	5,46 ^a	0,57 ^a

*Amostra controle; Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Fonte: Elaborado pelo autor.

O queijo coalho é classificado como queijo de média a alta umidade, geralmente este teor irá variar de 36 até 54,9% do seu peso, quando apresenta média umidade este irá variar de 39% < umid < 46% e alta quando for de 46% < umid 55%. É importante pontuar que a umidade é um fator que possui relação direta com o desenvolvimento do sabor e a textura. No presente estudo observou-se para as amostras (controle e com os volumes adicionados) que o queijo em avaliação é de media umidade. Também pode-se constatar que houve uma pequena variação no teor de umidade para o queijo com o extrato do coentro, principalmente nos volumes de 10 e 15 mL este fato, pode ser devido a influência exercida pelo extrato, segundo Santos (2012) o coentro possui alta umidade.

Na referida análise ao longo dos dias os teores de umidade (Tabela 03) foram sendo reduzidos, uma vez que o queijo dessora perdendo água no decorrer desse processo, em todas as amostras, no total a variação foi de 4,9% ao longo dos 15 dias. A avaliação estatística evidenciou segundo teste de Tukey não haver diferença significativa ($p > 0,05$) na comparação entre a amostra controle com os três volumes adicionados por dia de análise.

Resultado diferente do presente estudo foi encontrado por Freitas-Filho et al. (2009) com valor de umidade variando com faixa de 46,91 a 60,48%. Silva et al. (2010) encontram valores (44,50 a 46,80 %) próximos ao encontrado nessa pesquisa. Já Souza et al (2014) fizeram os testes e encontraram valores em uma faixa que os classificam como queijos de coalho de baixa umidade ($< 36\%$).

A acidez conforme tabela 03 foi apresentando um aumento com o passar dos dias. Na amostra controle percebeu-se que houve uma variação de 0,38 até 0,52%, enquanto que para a amostra contendo 15 mL do extrato essa variação foi de 0,38 a 0,57%. A avaliação estatística para a acidez na comparação entre os volumes com a amostra controle ao longo de cada dia de análise não evidenciou valor significativo ($p > 0,05$). Essa elevação no teor de acidez possivelmente é devido às folhas do coentro, uma vez que essas possuem elevada acidez (Santos, 2012).

Resultados semelhantes ao achado na presente pesquisa foram apresentados por Silva et al. (2010) que encontram um percentual de acidez variando de 0,34 a 0,44%. Sendo semelhante também ao evidenciado no estudo de Souza et al. (2014) com taxa de acidez para os queijos com inspeção com teor de 0,16 a 0,74% e para os queijos de coalho produzido de modo artesanal uma variação com faixa de 0,12 a 1,01%.

A acidez tem influência direta no pH e na expulsão de soro da massa do queijo, no referido estudo o pH apresentou uma leve redução para as amostras nas quais foram adicionadas o extrato aquoso do coentro esse fenômeno pode ter ocorrido devido a interação com o extrato. A avaliação estatística segundo o teste de Tukey constatou não haver diferença significativa ($p > 0,05$) por dia avaliado na comparação entre a amostra controle com os volumes de 5, 10 e 15 mL.

Nassu et al. (2001) ao avaliarem 43 amostras de queijo coalho produzido no estado do Ceará constatou uma variação de pH entorno de 5,30 a 6,64 sendo esses valores mais próximo aos do presente estudo. pH semelhante também foi encontrado por Sousa et al. (2014) que encontram valores de 5,18 a 6,02.

Valores diferentes para pH dos obtidos no presente estudo foram relatados por Silva et al. (2010) para as três amostras de queijo coalho em ordem 7,13, 6,23 e 5,98. O valor sete, maior encontrado, estando acima do limite geralmente encontrado, pode ter acontecido tal fenômeno em decorrência do teor de bolores e leveduras, uma vez que esse são capazes de metabolizar ácido láctico.

Os resultados da análise sensorial, de acordo com a Tabela 4, evidenciou que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) para os atributos textura e aparência. Porém, houve diferença significativa ($p > 0,05$) para os atributos cor e sabor, se tratando deste último parâmetro para a amostra contendo o extrato aquoso do coentro verificou-se que 78,2% dos participantes aprovaram o referido produto, enquanto que para a amostra controle o índice de aceitabilidade foi de 83,7%, apresentando assim, uma leve diferença de 5,5% entre as amostras avaliadas.

De modo geral, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as duas amostras avaliadas para a aceitação global de ambos os produtos. Pode-se assim, atribuir que o queijo com extrato aquoso de coentro apresentou índice de aceitabilidade de 80,1%. Se tratando de avaliação sensorial de queijo Manguiera et al. (2002) testaram a aceitabilidade de queijo coalho produzidos com leite parcialmente desnatado e desnatado e em ambos os tipos foram adicionados Ferro (Fe). Estes constataram índice de aceitabilidade de 63% para o queijo totalmente desnatado e 56,8% para o produzido parcialmente desnatado, sendo o queijo com adição do extrato aquoso do coentro apresentando maior índice de aceitabilidade.

Tabela 4 - Média das notas atribuídas pelos provadores na análise sensorial.

Amostra	Cor	Textura	Sabor	Aparência	Aceitação Global
Controle	7,19 ± 1,57 a	7,20 ± 1,62 a	7,54 ± 1,59 a	7,34 ± 1,63 a	7,56 ± 1,48 a
Teste	6,76 ± 1,90 b	7,25 ± 1,58 a	7,04 ± 1,97 b	7,04 ± 1,66 a	7,21 ± 1,78 a

Média das notas atribuídas. Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem entre si significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Santos et al. (2011) avaliaram a intenção de compra e a preferência entre o queijo coalho produzido com leite 100% de cabra versus o fabricado com o leite de vaca, assim como as concentrações variando do leite de cabra com vaca. E evidenciaram maior aceitação global para o queijo coalho com 100% de leite de cabra (39,4%), sendo a aceitação do presente estudo maior.

4. Considerações Finais

A produção do queijo de tipo coalho a partir da adição do extrato aquoso de coentro comparado com o queijo produzido sem adição de extrato proporcionou variações na composição físico-química avaliada, porém não havendo diferença significativa segundo a estatística aplicada. Na avaliação dos atributos sensoriais observou que houve uma diferença significativa na aceitabilidade do sabor, porém não houve diferenças significativas na aceitação global desse produto. Quanto a avaliação microbiológica estudos são necessários para compreender o mecanismo de interação entre o extrato aquoso do coentro com o queijo coalho para a promoção da redução dos *S. aureus* nas amostras estudada ao longo dos 15 dias de teste.

Referências

- Ashraf, A.; Zafar, S.; Zahid, K.; Shah, M. S. (2018). Synthesis, characterization and antibacterial potential of silver nanoparticles synthesized from *Coriandrum sativum* L. *Jornal de Infecção e Saúde Pública*.
- Bezerra, D. E. L.; Silva-Filho, C. R. G.; Gomes, D. J.; Pereira-Junior, E. B. (2017). Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa – Paraíba. *Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB*. n 37.
- Borse, B. B.; Priyadarshi, S. (2014). Effect of the environment on content and composition of essential oil in coriander. *International Journal of Scientific e Engineering Research, India*, v.5, n.2, p.57-65.
- Carvalho, J. D. G. (2007). Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 154f. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas.
- Carvalho, J. D. G.; Bruno, L. M.; Nassu, R. T.; Lima, C. P.; Vasconcelos, N. M.; Kuaye, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, v. 60, n. 345, p. 221-224.
- Dua, A.; Garg, G.; Kumar, D.; Mahajan, R. (2014). Polyphenolic composition and antimicrobial potential of methanolic coriander seed extract (*Coriandrum sativum*). *Int J Pharm Sci Res*; v. 5, n. 6.

Duarte, D.A.M.; Schuch, D.M.T.; Santos, S.B.; Ribeiro, A.R.; Vasconcelos, A.M.M.; Silva, J.V.D.; DA Mota, R.A. (2005). Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.72, p.297-302.

Dugat-Bony, E.; Garnier, L.; Denonfoux, J.; Ferreira, S.; Sarthou, A.; Bonnarme, P.; Irlinger. (2016). F. Highlighting the microbial diversity of 12 French cheese varieties. *International Journal of Food Microbiology*, v. 238, p. 265-273.

Fan X, Sokorai K. J. B. (2002). Changes in volatile compounds of g-irradiated fresh cilantro leaves during cold storage. *J Agric Food Chem*. v. 50.

Feitosa, T.; Borges, M.F.; Nassu, R.T. (2003). Pesquisa de *Salmonella spp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Cienc. Tecnol. Aliment*, v.23, p.162- 165.

Franco, B. D. G de M.; Landgraf, M. (2008). Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, cap. 4, p. 48-60.

Freitas, W. C.; Travassos, A. E. R.; Maciel, J. F. (2013). Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande- PB, v.15, n.1.

Freitas-Filho, J.F.; Souza-Filho, J.S.; Oliveira, H.B.; Angelo, J.H.B. (2009). Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. *Extensio Revista Eletrônica de Extensão*

Kačániová, M.; Galovičová, L.; Ivanišová, E. Vukovic, N. L.; Stefanikova, J. Valkova, V. Borotova, P.; Ziarovska, J.; Terentjeva, M.; Felšöciová, S.; Tvrda, E. (2020). Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of coriander essential oil (*Coriandrum sativum* L.) for its application in food. *Foods*, v. 9, n. 3, p. 282.

Kubo I, Fujita KI, Kubo A, Hihei KI, Lunde CS. (2003). Modes of antifungal action of (2E) -alkenals against *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem*. v. 51, n. 14, p.3951-3957.

- Lima, C. P.; Dias, G. M. P.; Soares, M. T. C. V.; Bruno, L. M.; Porto, A. M. F. (2020). Queijo coalho como fonte de bactérias ácido lácticas probióticas. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 8, p. 1-19.
- Mangueira, T. F.; Travassos, A.E.R.; Moreira, R.T.; (2002). Teste de aceitabilidade sensorial de queijo de coalho com baixo teor de gordura e enriquecido com ferro. *B.CEPPA*, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 279-290.
- Matasyoh, J.C; Maiyo, Z.C, Ngure, R.M; Chepkorir, R. (2009). Composição química e atividade antimicrobiana. *Food Chem.* v. 113, p. 526–529.
- Melo, A.C.M.; Alves, L.M.C.; Costa, F.N. (2009). Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo minas padrão comercializado na cidade de SÃO LUIS, MA. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v.76, n.4, p.547-551, out. /dez.
- Molina, R. D. I.; Silva, R.C.; Macedo, J.; Blázquez, M.A.; Alberto, R. Arena, M.E. (2020). Antibiofilm activity of coriander (*Coriander sativum* L.) grown in Argentina against food contaminants and human pathogenic bacteria. *Industrial crops and products*. v. 151.
- Nassu, R.T.; Lima, J.R; Bastos, M.S.R.; Macedo, B.A.; Lima, M.H.P. (2001). Diagnóstico das condições de processamento de queijo de coalho e manteiga da terra no estado do Ceará. *Higiene alimentar*, São Paulo, v.15, n.89, p.28-36.
- Paquereau, B.; Machado, G.; Carvalho, S. (2016). O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias. *Garanhuns*: E. dos Autores.
- Priyadarshi, S.; Khanum, H.; R. Ravi, B;B; Borse. (2015) Flavour characterisation and free radical scavenging activity of coriander (*Coriandrum sativum* L.) foliage. *Journal of Food Science and Technology* . v. 53. n.3.
- Realinho, R. M. M. (2007). Avaliação Agronômica de Coentro (*Coriandrum sativum* L.. Relatório do Trabalho Final de Curso de Engenharia Agronômica, Escola Superior Agrária de Elvas.
- Saeed, S, Tariq, P. (2007). Antibacterial activities of *Embllica Officinalis* and *Coriandrum sativum* against gram negative urinary pathogens. *Pak J Pharm Sci.*v. 20. n.1.
- Sahib N.G, Anwar F, Gilani, A.H, Abdul hamid A, Saari N, Alkharfy Khm. (2013). Coriander (*Coriandrum sativum* L): A potential source of high-value components for functional and nutraceutical foods. *Phytother Res.* v. 27

Santos, B.M.; Oliveira, M.E.G; Sousa, Y.R.F; Madureira, A.R.M.F.M; Pintado, M.M.E; GOMES, A.M.P. (2011). Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo, v. 70, n. 3, p. 302-310.

Santos, K.A.; Medeiros, J. E.; Pedrosa, E.M.R.; Carvalho - Filho, J.L.S. (2012). Reação do coentro (*Coriandrum sativum* L.) ao nematoide das galhas *Meloidogyne enterolobii*. *Tropical plant Pathology*. v. 38. p. 268.

Santos, W. B. M.; Costa, W. S.; Souza, R. G.; Feitosa, T. J. O.; Pinto, A. U.; Oliveira, B. C. (2020). Análise das boas práticas de fabricação na produção de queijo de coalho em laticínios artesanais localizados na Região Centro Sul do Ceará. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 7, p. 1-14.

Silva, M. C. D.; Ramos, A. C. S.; Moreno, I.; Moraes, J. O. (2010). 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.

Silva, A. S., Furtado, S. C., Vargas, B. L. (2017). Avaliação microbiológica do queijo coalho produzido com leite pasteurizado sob refrigeração. *Revista Nanbiquara*, v. 6, n.1.

Silva, G.L.; Coelho, M.C. S.C.; Coelho, M.I.S; Liborio, R.C.; Amorim, I.S.; Silva, G.C.S. (2018). Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. *R. bras. Tecnol. Agroindustr*, Ponta Grossa, v. 12, n.01: p. 2613-2626, jan./jun.

Sousa, T.V.; Alkimim, E.R.A; David, A.M.S.S.; SÁ, J.R.; Pereira, G.A.; Amaro, H.T.R.; Mota, W.F. (2011). Época de colheita e qualidade fisiológica de sementes de coentro produzidas no Norte de Minas Gerais. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s, Botucatu, v.13, especial, p.591-597.

Sousa, A. Z. B.; Abrantes, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B.A.; LIMA, P. O.; LIMA, R. N.; ROCHA, M. O. C.; PASSOS, Y. D.B. (2014). Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.81, n.1, p. 30-35.

Sousa, M. L. F.; Sousa, M. M.; Paz, E. O.; Cavalcanti, M. S. (2020). Avaliação microbiológica do queijo artesanal produzido e comercializado em uma cidade do interior da Paraíba. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 8, p. 1-13.

Souza, M. Pinto, F.G.S.; Bona, E.A.M.; Moura, A.C. (2014). Sanitary quality and prevalence of serovars of *Salmonella* in handmade and inspected fresh pork sausages sold in western Paraná, Brazil. *Arq. Inst. Biol.* v.81, n.2.

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://bdtd.bczm.ufrn.br/tesesimplificado//tde_arquivos/12/TDE-2012-04-10T054117Z-4054/Publico/RogeriaHLV_DISSERT.pdf>. Acesso em: 10 de julho de 2020

Wyk, B.E.V.; Wink, M. (2004). Medicinal plants. Timber Press. Portland.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Liderlano de Almeida Araújo – 30%

Marcella Estanislau Marinho – 10%

Alexciana Pereira Melo – 10%

Sergio Carvalho de Paiva – 10%

Edna Barboza de Lima – 10%

Edvane Borges da Silva – 10%

Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro – 10%

Lucia Fernanda C. da Costa Leite – 10%

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH



ISSN 2286-4822
www.euacademic.org

EUROPEAN ACADEMIC RESEARCH
Vol. VIII, Issue 6/ September 2020

Impact Factor: 3.4546 (UIF)
DRJI Value: 5.9 (B+)

Microbiological evaluation of type B Coalho cheese with the addition of aqueous extract from *Croton campestris*

LIDERLÂNIO DE ALMEIDA ARAÚJO

Academic Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

EDVANE BORGES DA SILVA

Academic Center of Vitória, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

MARCELLA ESTANISLAU MARINHO

Academic Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ALEXCIANA PEREIRA MELO

Academic Catholic University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

JULIANA MOURA DE LUNA

Teacher of the Department of Biological Sciences at the Catholic University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

ADRIENE SIQUEIRA DE MELO

Teacher of the Department of Biological Sciences at the Catholic University of Pernambuco Recife, Pernambuco, Brazil

LUCIA FERNANDA C. DA COSTA LEITE

Teacher at the Science and Technology Center of the Catholic University of Pernambuco, Recife Pernambuco, Brazil

DANIELA MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO

Teacher at the Chemistry Department of the Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Abstract

Coalho cheese is a typical product of the Northeast region of Brazil, presenting significant importance in the economy of the nine states that make up this geographical area. This dairy concentrate of animal origin has cow's milk as its raw material and, when it is artisanal produced, can transmit pathogenic microorganisms to the consumer. The aim of the present work is to propose the evaluation of the use of aqueous extract of Croton campestris leaves, against of microorganisms common to the milking environment and Coalho cheese production environment, such as the total and

thermotolerant coliforms, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, mold and yeast. All samples were not contaminated by Salmonella sp. However, it was possible to observe that the extract, in the different applied volumes, was able to promote the reduction of microbial loads for total and thermotolerant coliforms, Staphylococcus aureus and mold and yeasts. It is important to note that only for Staphylococcus aureus, the leaves aqueous extract of Velame managed to reduce the microbial load to the values below the limits established by RDC no. 12/2001 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA).

Keywords: rennet cheese, natural product, microbiology, plant, sertão

INTRODUCTION

The origin of cheese dates to centuries before Christ. Some authors, such as Beux (2011), point out that the first cheeses were produced around 8000 BC, using cow, goat, sheep, buffalo milks as raw material. Various cheese types are produced worldwide, such, as Camembert and Roquefort of French origin, the English Cheddar and Cottage and the Canastra, Minas and Coalho cheeses, produced in Brazil.

Brazilian cheeses gain flavor and specific characteristics of their regions, totaling more than seventy types. Among them, the Coalho cheese stands out having its origin in the northeast region. Initially produced in the State of Pernambuco, reached the other states of the northeast region and becoming one of the main socioeconomic factors in the region as it is one of the main activities of the productive chain of the dairy sector, inserted in family farming. (PACHECO, 2011). Today, Coalho cheese is already produced in some northern states and sold in some cities in the southeast region of Brazil.

The production method is simple and does not require sophisticated equipment, in addition to having a low investment cost in its manufacture. Coalho cheese is produced by fermentation and coagulation of cow's milk from addition of specific enzymes or bacteria as well as isolated or combined organic acids, resulting in two by-products: fresh or smear-ripened dough curd and a fraction of serum. This product is divided into two categories: A and B; the first is subjected to the pasteurization process and the second

does not go through the thermal process, being, therefore, a artisanal and natural product (GOMES, 2012; PAQUEREAU, et al., 2016).

This milk concentrate has a white color, semi-hard and elastic consistency, rectangular shaped, compact and soft texture, medium to high humidity, its mass can be raw, semi-cooked or cooked, with fat content between 35.0% and 60.0%. It has a slightly acidic and salty or spicy taste; thin, crack-free crust. It can be consumed raw, roasted, fried, pure or as a garnish (DUARTE et al., 2005; SILVA et al., 2012; PAQUEREAU, et al., 2016).

The microbiological parameters of Coalho type B cheese vary during milking and during manufacturing process. This is due to the lack of hygienic-sanitary care, ineffective conservation methods and the presence of microorganisms common to the milking and production environments, such as total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, mold and yeast, these being the main contaminants of this product (DANTAS, 2012; SILVA et al., 2018).

The bacteria from the coliform groups and *Staphylococcus aureus* stand out as the microorganisms most easily present in Coalho cheeses, as they can be found naturally in the cow's udder and can already contaminate the milk during the milking process. The group of coliforms belonging to the *Enterobacteriaceae* family classified as total and thermotolerant Coliforms, may be present in high quantity per gram of cheese produced depending on this value, may or may not cause damage to health. The Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA) through Resolution of the Collegiate Board (RDC) No. 12 of January 2, 2001 [RDC nº 12/2001], does not establish to total coliforms limits for Coalho cheese, however, for thermotolerant coliforms, the limit is 5×10^2 (MPN/g) (Most Probable Number per gram) (BRASIL, 2001).

The *Staphylococcus aureus* bacterium, of the *Micrococcae* family, has a spherical structure, from the group of gram-positive cocci. When present in larger quantities and if in favorable conditions of temperature, water and gas activity, oxygen and pH (Hydrogenionic potential), they will possibly produce taphylococcal enterotoxins in food that, after ingestion, will cause intoxication (SANTANA et al. 2008; ETGES 2011).

The RDC nº 12/2001, establishes a growth tolerance for coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus*) of a maximum of 5×10^2 CFU/g (Colony Forming

Units per gram), with moisture content greater than 55%, including Coalho cheese with corresponding moisture.

Salmonella sp. (Salmonellose) is a bacterium that, like coliforms, also belongs to the *Enterobacteriaceae* family, being responsible for causing serious infections and even death by ingestion contaminated food and water (FEITOSA et al., 2003). According to the RDC no. 12/2001, there are no tolerable limits for the presence of *Salmonella* sp. in food, being classified as inappropriate for consumption the food that presents this bacterium (BRASIL, 2001).

The group of molds and yeasts constitutes a significant evaluation standard as an indicator of the quality of dairy products, especially Coalho cheese, since their presence is causally linked to deterioration and changes in the acceptability profile, for altering the flavor. It is important to point out that there is still no normative standard that emphasizes a limit profile for the its presence in the product (KAMLEH et al., 2012).

In general, the presence of *Salmonella* sp., or the presence of other microorganisms in quantities above the permitted limits, makes foods unfit for consumption (BRASIL, 2001). However, several studies have shown that these limits are not respected during the manufacture of artisanal Coalho cheese, mainly due to the lack of adoption of good hygienic practices during the milking and manufacturing process (Borges et al., 2003; Santana et al., 2008; Sousa et al., 2014; Bezerra et al., 2017; Dias et al., 2015).

Given this, it is evident the need for new alternatives, such as use products of plant origin, to reduce the microbiological contamination of Coalho cheese artisanal, since it does not undergo a pasteurization process to eliminate microorganisms. One suggestion would be to use products origin natural (as such plants), aims to minimize changes in visual and sensory characteristics, in addition to changes in white mass and rectangular shape. It is not new in Brazil, to add of natural products, such as “cumaru” and “pequi” (fruits originating in northern Brazil) or other condiments, to Coalho cheese. However, this occurs with the purpose of expanding supply to the market with new flavors and winning new consumers and the possibility of improving producers’ income, and not for sanitary purposes.

The aim of the present work is to propose the evaluation of the use of aqueous extract of *Croton campestris* leaves, against of microorganisms common to the milking environment and Coalho cheese production environment, such as the total and thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, mold and yeast.

METHODOLOGY

Plant material: Leaves of "Velame do Campo" (*Croton campestris*) were collected from the base of the tree top of six specimens at The municipality of Venturosa (latitude 08°34'29" south and at longitude 36°52'27" west), located in the Mesoregion of Agreste, Microregion of Vale do Ipanema, Pernambuco, Brazil. Only whole leaves, without signs of insects, herbivory, fungi, or sunburns, were used in this study. Metabolite changes due to climate, temperature, and seasonality were not part of this study. A specimen voucher was sent to the Herbarium IPA (Agronomic Instituto of Pernambuco - IPA).

Obtaining the aqueous extract: The collected leaves were washed with distilled water and dried with paper. To obtain the aqueous extract, 20 grams of *Croton campestris* leaves were used, which were placed in the appropriate filter paper cartridge for the Soxhlet apparatus (Merck, Darmstadt, Germany). Then, 250 mL of distilled water were added to the round-bottom flask. The extraction lasted as long necessary, for the water to pass through the Soxhlet 3 times. At the end of the process, 250 mL of aqueous extract of leaves were obtained, at a concentration of 80 g/mL.

Addition of aqueous extract I to fresh Coalho cheese type B

Before the process of adding the aqueous extract is described, it is necessary to understand the production process of Coalho cheese. The process goes through seven stages, described below: (i) straining the milk to remove macro-impurities; (ii) adding rennet to promote coagulation (duration 40 to 60 minutes); (iii) separation of the whey of the curds; (iv) put up, to its edge, the curd in rectangular shapes, for the pressing processe, so that the maximum possible elimination of the serum occurs (duration of 5 to 10 minutes); (vi) removal of the shapes and process of salting with table salt, for a period of 1 to 5 h. (vii) After this period, the cheese is left at room temperature, for a period ranging from 2 to 5 hour and then stored in a freezer or cold chamber at a temperature ranging from 10°C to 18 ° C, for 24 h.

The chosen moment for the addition of the aqueous extract was one day after its manufacture (after the step vii), time was the release of the highest percentage of the residual whey from the production occurs. In total, 1.2 kg of cheese was separated into 4 samples of 300 g, each put up in trays with dimensions of 200 mm x 72 mm x 125 mm. Each tray was identified according to the volume of aqueous extract, at a concentration of 80 g/mL, added to the cheese, as follows: Tray A, addition of 5 mL; Tray B, addition of 10 mL; Tray C, addition of 15 mL, and; Tray D, without to adding extract (control sample). All samples were stored in a refrigerator at 12°C and analyzed at 1, 5, 10 and 15 days after the addition of the aqueous extract.

Microbiological Analysis: The analyzes carried out in the present study allowed the identification of the concentrations of mold and yeast, Coliforms and *Staphylococcus aureus* and presence or absence of *Salmonella* sp.. The methodological process was applied in accordance with Normative Instruction No. 62, of August 26, 2003, as described below:

Coliform Analysis: The inoculation occurred from the addition of 1mL of the initial 10^{-1} dilution in sodium lauryl sulfate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) broth solution in simple concentration. Then, 1 ml of the 10^{-1} dilution was inoculated into three tubes to obtain the 10^{-2} dilution and from this 1 ml was inoculated in a series of 3 tubes to obtain the 10^{-3} dilution. All dilutions were prepared in triplicate and in test tubes containing inverted Durham tubes.

Then the tubes were incubated at 35°C for 48 hours, after which time it was checked whether there was gas production in the Durham tubes. Once positive, the number of tubes in each dilution series was recorded and the confirmatory test was carried out for Total and Thermotolerant Coliforms, according to the following criteria:

i. Total Coliforms: Each positive tube was peaked into a tube containing 2% lactose bile bright green broth (Merck, Darmstadt, Germany). Then, the tubes were incubated at $36 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 hours. After this period, a reading was performed to confirm or not the presence of total coliforms due to gas formation. Thus, the MPN (Most Probable Number) method was used for the probabilistic counting of the result.

ii. Thermotolerant Coliforms: With the aid of a loop, positive tubes from the confirmatory test were peaked to tubes containing EC broth (Merck, Darmstadt, Germany). Subsequently, the tubes were incubated at $45 \pm 0.2^\circ\text{C}$ for 48 hours in a water bath with

agitation. After this period, the reading was carried out, giving a positive result to those who presented gas formation in the Durham tube, thus noting the result obtained for each tube in order to calculate the MPN.

Mold and Yeast Count: The counting was performed in a Petri dish, containing three dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) for the four groups analyzed, all being applied in triplicate. In this, the medium of culture Agar potato dextrose 2% acidified with tartaric acid 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used to reduce the pH until close to 3,5. The plates were incubated at a temperature of $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for a period of seven days. After this time interval, the colonies present on the plates were counted and the result expressed in CFU/g (Colony Forming Units per gram).

***Staphylococcus aureus*:** The four analyzes for the four groups were done in Petri dish, containing three dilutions (10^{-1} , 10^{-2} and 10^{-3}) with inoculation of 0.1 mL of the sample for each dilution in their respective plates, in triplicate. These was prepared in Baird-Parker agar culture medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The inverted plates were incubated in C.O.D at $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ for a period of 48 hours. In the next stage, the colonies present on the plates were counted and the result expressed in CFU.

***Salmonella sp*:** The evaluation, performed in triplicate, followed the following procedure: in the pre-enrichment stage, 25 ± 0.2 g of each sample of Coalho cheese were used, with the addition of each of the volumes of aqueous extract studied (the control, 5 ml, 10 ml and 15 ml), which were added in 4 tubes containing 225 ml of 1% buffered peptide saline solution (Acumedia, MI, USA). These mixtures were homogenized for 1 minute in the Stomacher (Model MA440, Piracicaba, Brazil) and, then, the tubes containing the mixtures were incubated at 36°C for 18 hours. In the selective enrichment stage, three aliquots were removed from each of the 4 pre-enriched samples for simultaneous inoculation in the selective liquid meday as shown below;

- 0.1 mL was added to a tube containing 10 mL of Rappaport Vassiliadis broth (Acumedia, MI, USA);

- 1 ml added in a tube containing 10 ml of cystine selenite broth (Acumedia, MI, USA), and;

- 1 mL added to a tube containing 10 mL of tetrathionate broth (Acumedia, MI, USA), totaling 12 tubes.

All these tubes were incubated in a water bath, with shaking, for 24 hours at 41°C. Subsequently, isolation was performed, where, from the selective enrichment broths, the previously dried plate surfaces, two for each solid medium, were sown and streaked in order to obtain isolated colonies. These plates were incubated, inverted, at 36 °C for 24 hours. After this period, the characteristic colonies were subjected to biochemical tests to assess the presence or absence of *Salmonella* sp in 25 g of food.

Statistical analyses: The Lilliefors test was employed to evaluate the normality of the data. The Mann - Whitney test was employed for comparison of two independent samples. Values for $p \leq 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Table I presents the values of the Most Probable Numbers per gram (MPN/g) of total and thermotolerant coliforms found in the samples of Coalho cheese analyzed in the present work, over the 15 days of analysis.

Table I: Total and thermotolerant coliforms values for Coalho cheese samples.

Total Coliform (MPN/g)**				
Observation day***				
Volume (mL)	1º	5º	10º	15º
00*	4.3×10^4	4.3×10^4	1.2×10^5	1.2×10^5
05	4.3×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4
10	4.3×10^4	1.5×10^4	1.5×10^4	9.2×10^3
15	4.3×10^4	9.2×10^3	9.2×10^3	9.2×10^3
Thermotolerant Coliforms (MPN/g)**				
Observation day***				
Volume (mL)	1º	5º	10º	15º
00*	2.3×10^4	2.3×10^4	4.3×10^4	4.3×10^4
05	2.3×10^4	2.3×10^4	4.3×10^4	4.3×10^4
10	2.3×10^4	9.2×10^3	9.2×10^3	9.2×10^3
15	2.3×10^4	9.2×10^3	6.1×10^3	6.1×10^3

* Control sample; ** (MPN/g) = Most Probable Number per gram (BRASIL, 2001);

***After the add the aqueous extract.

When evaluating the relationship between the different volumes of the aqueous extract of leaves from *Croton campestris* A. St. Hill added to Coalho cheese, a reduction was verified from the sixth day of analysis, for total coliforms, especially when comparing the control

group to the group containing 15mL of the extract. It was also observed that on the fifteenth day of storage, there was a variation from 1.2×10^5 to $9,2 \times 10^3$ (MPN/g).

It can be evidenced that this natural product applied in the cheese promoted a lower microbiological load for total coliform when compared with cheeses analyzed by Silva et al. (2018) who evaluated 36 samples obtained from four open markets in the city of Petrolina - PE and found a value above the order of 105 for all samples. However, comparing our values with those found by Santana et al. (2008), Dias et al. (2015) and by Bezerra et al. (2017), it is possible to observed a higher level of contamination for the samples analyzed here, although, as previously informed, the MPN/g limits for total coliforms in Coalho cheese are not yet recommended by RDC no. 12/2001. It is observed, from the counting data for thermotolerant coliforms, that the contamination values are one to two orders of magnitude higher than those of Santana et al. (2008), Dias et al., (2015) and by Bezerra et al. (2017), but smaller than that observed by Silva et al., (2018). The statistical analysis indicated that, for total and thermotolerant coliforms, there is no influence of the exposure time in the reduction of the microbiological count (p-value = 0.2482). However, there is an indication of the influence of the applied aqueous extract volumes (p-value = 0.0152) on the decrease in the total coliform count. For the thermotolerant coliforms, the volume applied only allowed the microbial load to decrease, from the volume of 10 mL (p-value = 0.0217), however, there was no statistically significant difference (p-value = 0,3865) between 10 mL and 15 mL volumes. So, the values obtained in that study for samples of Coalho cheese with the addition of the different volumes of the aqueous extract leaves of *Croton campestris*, show that the extract promoted reductions in the total and thermotolerant coliform counts, when compared with the control sample, despite these data being beyond the limit established by the RDC No. 12, for thermotolerant coliform.

Table II presents the results for the analysis of mold and yeast, over the 15 days of analysis. From the analysis of the data presented, it is possible to observe concentrations in the order of 10^4 (CFU/g) in the control sample, throughout the observation period. The order of magnitude of mold and yeast concentrations only starts to decrease after the sixth day of observation, for the concentration of 10 mL of aqueous extract.

Peixoto *et al.*, (2012) evaluated 4 dairy products in the state of Paraíba (Northeast region of Brazil) and showed that all of them had a high mold and yeast count and that most samples had a value of $2,4 \times 10^4$ CFU/g. Souza et al., (2011) stand out in their research that the

content of mold and yeast reached $5,2 \times 10^9$ CFU/g configuring according to the same an elevated contamination index of Coalho cheese.

Silva, Furtado and Garcia (2016) when evaluating the growth of molds and yeasts in Coalho cheese produced with pasteurized milk sold in a public market in Manaus - AM, found a count ranging from 2.88×10^5 to 1.33×10^7 CFU/g showing that the pasteurization process it is not enough to eradicate or reduce these microorganisms. However, in the present study, the data found are lower than those evidenced in the study by Silva, Furtado and Garcia (2016) for the treatments carried out and without the milk having gone through the pasteurization process.

Table II: Mold and yeast values for Coalho cheese samples: control and with add extract aqueous of *Croton campestris*.

Volume (mL)	Mold and yeast (CFU/g)**			
	Observation day***			
	1 ^o	5 ^o	10 ^o	15 ^o
00*	$>1.0 \times 10^4$	$>1.0 \times 10^4$	$>1.0 \times 10^4$	$>1.0 \times 10^4$
05	6.0×10^3	3.2×10^3	1.6×10^3	9.0×10^2
10	3.3×10^3	2.4×10^3	1.6×10^3	5.0×10^2
15	3.1×10^3	1.0×10^3	8.0×10^2	3.0×10^2

*Control sample; ** (CFU/g) = Colony Forming Units per gram; ***After the add the aqueous extract.

The statistical analysis indicates that there was no influence of the exposure time in the reduction of the mold and yeast count (p-value = 0.3123). However, the influence of applied volumes was observed (p-value = 0.0105); the greater the volume, the less the load of mold and yeast. The volumes of 5 ml, 10 ml and 15 ml did not differ from each other (p-value = 0.2482).

Thus, the aqueous extract promoted decrease in the colony forming units per gram of mold and yeast in Coalho cheese. Although there is not yet a limit pre-established by Brazilian legislation, these microorganisms are configured as an indicator of contamination. DUGAT-BONY *et al.*, (2016) stand out that these microorganisms, depending on the quantity, can produce a diversified number of enzymes that, in turn, will promote the faster deterioration of the cheese.

Table III presents the values for the count of *Staphylococcus aureus* in the samples of Coalho cheese. The values determined here to the control sample, are one order of magnitude lower than those reported by SANTANA et al (2008), that evaluated the occurrence of *Staphylococcus aureus* in Coalho cheese sold in Aracaju city, Sergipe state (Northeast Region of Brazil). Their results showed that 46.7% of the analyzed samples were positive for coagulase-positive staphylococci, with mean values of $6,30 \times 10^5$ (CFU/g).

Table III: Values of *Staphylococcus aureus* for Coalho cheese samples: control and with add extract aqueous of *Croton campestris* A. St. Hill leaves.

Volume (mL)	<i>Staphylococcus aureus</i> (CFU/g)**			
	Observation day***			
	1 ^o	5 ^o	10 ^o	15 ^o
00*	1.0×10^4	1.3×10^4	1.6×10^4	1.0×10^5
05	1.0×10^4	1.0×10^3	7.1×10^2	6.7×10^2
10	1.0×10^4	4.8×10^2	3.1×10^2	1.9×10^2
15	1.0×10^4	3.5×10^2	2.0×10^2	1.6×10^2

*Control sample; ** (CFU/g) = Colony Forming Units per gram; ***After the add the aqueous extract.

Sousa *et al.* (2014), evaluated the microbiological profile of Coalho cheeses marketed in six states (Pernambuco, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Sergipe and Paraíba) in northeastern Brazil. The authors found that 96.15% of samples analyzed were outside the recommended limits for coagulase-positive staphylococci. Bezerra *et al.* (2017), in a study that aimed to identify the presence of this bacterium in samples of Coalho cheese produced in the city of Souza, Paraíba state (Northeast region of Brazil),

showed that 65% of the analyzed samples were outside the recommended limits for coagulase-positive staphylococci, with values above 10^3 (CFU/g). Pereira *et al.* (2017), investigated the presence of this bacteria in samples of artisanal Coalho cheese, produced in São Rafael, Rio Grande do Norte (Northeast Brazil) and concluded that all samples presented high *Staphylococcus aureus* counts. Oliveira *et al.* (2019), investigated the occurrence of coagulase-positive staphylococci in Coalho cheeses (artisanal and industrial) produced in seventeen municipalities in the State of Ceará. It was observed that 64.9% of artisanal cheese samples showed growth for coagulase-positive staphylococci outside the current microbiological standards, while it was observed that 31% of industrialized samples were outside these standards.

According to Carmo and Bergdoll (1990), foods with counts in the range between 10^4 to 10^8 (CFU/g) will produce enterotoxins. Forsythe (2000), Carmo et al., (2002) and Picoli et al., (2006) stand out that if these enterotoxins develop a count from 10^5 (CFU/g) they can cause intoxication in consumers, thus pointing out that the extract are efficient to provide greater security to the cheese, mainly in the volumes of 10 and 15mL.

It is possible to observe (Table III) that the aqueous extract reduced the bacterial load already from the sixth day of evaluation, for the volume of 10 mL, to values lower than the limits established by RDC no. 12/2001. On the fifteenth day, there was a marked decrease from 10^5 (CFU/g) (control sample) to 1.2×10^2 (CFU/g) (sample added with 15 mL of aqueous extract). The statistical analysis indicated that this decrease did not occur due to the influence of the observation time (p value = 0.2482), but due to the volume of aqueous extract added (p value = 0.0152).

Microbiological analyzes indicated the absence of *Salmonella* sp. for all samples of Coalho cheese evaluated. This observation is in line with the work of Pereira et al. (2017), who reported the absence of *Salmonella* sp. in all samples of Coalho cheeses artisanal produced in the city of São Rafael, Rio Grande do Norte (Northeast Brazil), and in accordance with the result found by Sousa et al. (2014), who reported that only in one of the 104 samples of Coalho cheese collected in several states in the Northeast of Brazil, the presence of *Salmonella* was detected. However, some studies have reported the presence of this bacterium, such as Santana et al. (2008), who reported the presence of *Salmonella* sp. in 73.33% of the Coalho cheese samples collected at the Central Market in the city of Aracaju, SE, from August to November 2007. Oliveira et al. (2010) reported that 9.52% of the Coalho cheese samples collected in the municipality of Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brazil, showed the presence of *Salmonella* sp. Bezerra et al. (2017), reported that in 40% of the cheese samples analyzed, was detected the presence of *Salmonella* sp.

CONCLUSION

Since the control samples were not contaminated by *Salmonella* sp., It was not possible to evaluate the influence of the aqueous extract of *Velame* leaves on the contamination of Coalho cheese for these microorganisms. However, it was possible to observe that the extract, in the different applied volumes, was able to promote the reduction of microbial loads for

total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* and mold and yeasts. It is important to note that only for *Staphylococcus aureus*, the leaves aqueous extract of *Velame* managed to reduce the microbial load to the values below the limits established by RDC no. 12/2001 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA).

REFERENCES

- BEUX, S. 2011. Apostila de Tecnologia de Leite e Derivados. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7PYAF/apostilatecnologia-leite-derivados>. Acessado em: 23 de Julho de 2020.
- BEZERRA, D.E.L.; SILVA-FILHO, C. R.G.; GOMES, D. J.; PEREIRA-JUNIOR, E. B. 2017. Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa – Paraíba. Divulgação Científica E Tecnológica do IFPB | nº 37. Joao Pessoa.
- BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. 2003. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v.21, n.1, p.31- 40.
- BRASIL. 2001. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Diário oficial da União, Brasília.
- CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S.. 1990. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte, MG (Brazil). Rev. Microb., 21(4):320-323.
- CARMO, L.S. et al. 2002. 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,
- DANTAS, D. S. 2012. Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande,
- DIAS, J. do N. et al. 2015. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. Revista Saúde e Pesquisa, Piauí, v. 8, n. 2, p. 277-284 maio/ago,

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B.; Ribeiro, A.R.; Vasconcelos, A.M.M.; Silva, J.V.D.; DA MOTA, R.A. 2005. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênicosanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. *Arquivo do Instituto Biológico*, v.72, p.297-302.

DUGAT-BONY E. et al. 2016. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. *Journal of Dairy Science*. v.99, n.3, p. 2502–2511.

ETGES, J. C. 2011. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo mussarela fatiado à granel e embalado à vácuo. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. et al. 2003. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.23, p.162- 165,

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T. et al. 2003. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, v.23, p.162- 165,

GOMES, R. A.; MEDEIROS, U. K. L. 2012. Caracterização físico-química dos Queijos de Coalho artesanal e industrial comercializados na cidade de Currais Novos/RN. In: VII CONNEPICongresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação.

KAMLEH, R. et al. 2012. The effect of substitution of sodium chloride with potassium chloride on the physico chemical, microbiological, and sensory properties of Halloumi cheese. *Journal of Dairy Science*, v.95, n.3, p.1146–1149,

OLIVEIRA, F. I. P.; COSTA, M.T.P.; FRAGA, A.C.A.; OBERG, M.L.B.; VASCONCELOS, M.P.; COSTA, T. E. S.; PINTO, S. C. 2019. OCORRÊNCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM QUEIJOS TIPO COALHO. *Cadernos ESP*. Ceará., jul. dez; 13(2): 82 – 93.

OLIVEIRA, K.A.; EVÊNCIO - NETO, J.; PAIVA, J.E.; MELO; L.E.H. 2010 Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set.

PACHECO, M. de S. 2011. Leite cru refrigerado do Agreste Pernambucano: Caracterização da Qualidade e do Sistema de Produção. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Ciências Domésticas, Recife,

PAQUEREAU, B.; MACHADO, G.; CARVALHO, S. 2016. O queijo de coalho em Pernambuco: histórias e memórias. Garanhuns: E. dos Autores,

PEIXOTO, J. P. N.; FURTADO, D. A.; OLIVEIRA, C. J. B.; GOMES, J. P. 2012. Qualidade do ambiente e níveis de contaminação por micro-organismos em queijarias, no Agreste Paraibano. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.14, n. 2, p. 177-183,

PEREIRA, T.M.F.F.; SOARES, K.M.P.; GÓIS,V.A; SOUZA, L.B 2017. Staphylococcus aureus e Salmonella sp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável 12(2):358.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V. CARSOSO, M. 2006. Quantificação de coliformes, staphylococcus aureus e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(1): 64-69, jan.-mar.

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

SILVA, G.L.; COELHO, M.C. S.C.; COELHO, M.I.S; LIBORIO, R.C.; AMORIM, I.S.; SILVA, G.C.S. 2018 Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. R. bras. Tecnol. Agroindustr., Ponta Grossa, v. 12, n.01: p. 2613-2626, jan./jun.

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

SOUZA, E. L.; COSTA, A.C.V.; GARCIA, E. F.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUZA, W.H; QUEIROGA, R. C. R. 2011 Quality of Coalho-like goat's milk cheese with added coumarou (Amburana cearensis A.C. Smith) Braz. J. Food Technol., Campinas, v. 14, n. 3, p. 220-225, jul./set.

APÊNDICE C – PATENTE COM NÚMERO DE PEDIDO: INPI – BR10 2020 020148**4****QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR
MICROBIOLÓGICO**

[01] A presente invenção refere-se ao queijo tipo coalho formulado com adição de extrato de alho para que este apresente redução da carga microbiana, elevado teor nutricional e ampliação do tempo de prateleira.

[02] No corrente estado da técnica, têm-se o processo de fabricação de um queijo coalho com adição de extrato aquoso de alho representando um alimento tipicamente da região Nordeste do Brasil incrementando maior segurança alimentar devido à redução microbiana, oferecida pelo referido produto adicionado.

[03] O extrato de alho adicionado ao queijo contribui para redução dos principais fungos e bactérias, atuando no combate a deterioração do queijo coalho, evitando infecções gastrointestinais causadas por esses microrganismos, além de ser um potencial antioxidante e excelente fonte de fibra alimentar, minerais e vitaminas.

[04] No corrente estado da técnica verificou-se que existem utensílios, como diversos tipos de embalagens, conservantes e parâmetros de refrigeração que oferecem conservação de suas características alimentares, ampliando o seu prazo de validade, porém não foi encontrado qualquer produto com características semelhantes a presente invenção.

[05] Para elaboração do referido produto foram utilizados os seguintes ingredientes: leite bovino in natura, coalho líquido, cloreto de sódio e extrato aquoso de alho.

[06] A elaboração do queijo tipo coalho proposto é melhor compreendida com a explanação do processo de fabricação, seguindo as etapas: coação do leite para remoção de partículas indesejadas, em seguida é adicionado o coalho para promover a coagulação do leite, essa etapa dura de 40 a 60 minutos.

[07] Em seguida, ocorre a separação entre soro e coalhada, sendo essa última posta em formas retangulares até completo preenchimento, seguida de prensagem manual por um intervalo de tempo entre 5 a 10 minutos, para que ocorra a máxima eliminação do soro possível e formação do queijo.

[08] Após prensagem o queijo é retirado das formas e permanece em repouso, à temperatura ambiente, por um intervalo de tempo que varia entre 3 e 4h, para que ocorra maior dessoragem.

[09] Em seguida, o queijo é imerso numa solução de extrato aquoso a base de alho por um período de 5h.

[10] Por fim o queijo segue para armazenamento em freezer à temperatura de 12 ± 2 °C.

[11] Após 24h de refrigeração o queijo produzido poderá ser embalado e comercializado.

[12] O extrato aquoso é obtido por extração em aparelho de Soxhlet usando 50 g de alho.

[13] Testes microbiológicos de *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas* s.p.p, Coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras foram realizados nos queijos produzidos seguindo a Instrução Normativa de nº 62 de 26 de agosto de 2003.

[14] Os dados obtidos nas análises microbiológicas, conforme Figura 1, mostraram que o extrato do alho promoveu uma redução significativa na contagem do número de microrganismos, *Staphylococcus aureus*, Coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras.

[15] Na avaliação de *Salmonellas* s.p.p tanto o queijo puro quanto o queijo contendo o extrato de alho apresentaram ausência deste microrganismo.

[16] A validade do queijo puro é de 15 dias, de acordo com legislação vigente, e a do queijo com adição de extrato de alho foi de 31 dias.

REIVINDICAÇÕES

[01] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO, caracterizado pela formulação contendo leite bovino in natura, coalho líquido, cloreto de sódio e extrato aquoso de alho.

[02] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo processo de fabricação usando as etapas iniciais de coação do leite para remoção de partículas indesejadas e adição de coalho para promover a coagulação do leite.

[03] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1 e 2, caracterizado pelo processo de separação entre soro e coalhada realizado através de filtração.

[04] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1, 2 e 3, caracterizado pela produção do queijo propriamente dito, através da adição da coalhada as formas retangulares seguida por prensagem manual.

[05] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado pela remoção das formas seguida de armazenamento a temperatura ambiente para eliminação de um maior teor de soro residual.

[06] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4 e 5, caracterizado pela imersão do extrato aquoso de alho no queijo coalho produzido.

[07] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1, 2, 3, 4, 5 e 6, caracterizado pelo armazenamento do queijo em ambiente refrigerado para posterior comercialização.

[07] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por

reduzir carga microbiológica de *Staphylococcus aureus*, *Salmonellas* s.p.p, Coliformes totais e termotolerantes, bolores e leveduras.

[08] QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO de acordo com as reivindicações 1 e 7, caracterizado pelo aumento de 16 dias no tempo de prateleira do produto final.

RESUMO

QUEIJO COALHO COM EXTRATO DE ALHO UM EXCELENTE REDUTOR MICROBIOLÓGICO

A presente invenção, refere-se à adição de extrato de alho ao queijo coalho, tendo como principal característica inovadora a utilização do extrato como agente redutor da carga microbiana e elevação do tempo de prateleira. Se destaca na área de tecnologia de laticínios do setor de alimentos, com ênfase para a garantia de segurança alimentar e fortalecimento da economia local e regional.

Vale enfatizar que a metodologia de preparo pode ser facilmente executada, além de apresentar baixo custo, sendo uma alternativa altamente viável.

O processo de fabricação do queijo, segue as etapas: coação do leite, adição do coalho, coagulação, separação do soro da coalhada, enforme da coalhada, adição de cloreto de sódio, repouso para eliminação de soro residual, imersão do queijo em extrato aquoso de alho, armazenamento, embalagem e comercialização.