

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

GABRIEL BORTOLOTTO CARNEIRO

**APLICAÇÃO DE QUITOSANA PARA CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM
QUEIJO COLONIAL ARTESANAL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

FRANCISCO BELTRÃO

2021

GABRIEL BORTOLOTTO CARNEIRO

**APLICAÇÃO DE QUITOSANA PARA CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM
QUEIJO COLONIAL ARTESANAL**

Application of chitosan for microbiological control in artisanal Colonial cheese

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Profa. Dra. Fabiane Picinin de Castro Cislaghi

Coorientadora: Profa. Dra. Andréa Cátia Leal Badaró

FRANCISCO BELTRÃO

2021

GABRIEL BORTOLOTTO CARNEIRO

**APLICAÇÃO DE QUITOSANA PARA CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM
QUEIJO COLONIAL ARTESANAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Alimentos da
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
(UTFPR).

Data de aprovação: 17/agosto/2021

Maria Helene Giovanetti Canteri
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Ellen Porto Pinto
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Fabiane Picinin de Castro Cislighi
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Andréa Cátia Leal Badaró
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

FRANCISCO BELTRÃO

2021

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo apoio financeiro, através dos Editais 2/2019 – Apoio à execução de Trabalhos de Conclusão de Curso e 05/2020 – Apoio a projetos Destaques da UTFPR, para a realização do presente trabalho.

Também sou grato ao produtor de queijo que disponibilizou seu tempo e espaço para que esse trabalho pudesse ser executado.

RESUMO

CARNEIRO, Gabriel B. **Aplicação de quitosana para controle microbiológico em queijo Colonial artesanal**. 2021. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2021.

A produção de queijo Colonial artesanal tem grande influência social e cultural na região Sul do Brasil. No entanto, a utilização do leite cru como matéria-prima e deficiências nas Boas Práticas de Fabricação podem contribuir para a ocorrência de contaminações por microrganismos como coliformes e *Staphylococcus* no produto. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade da quitosana incorporada à massa como controle microbiológico em queijo Colonial artesanal. Os queijos foram produzidos com leite cru em uma queijaria localizada na zona rural do município de Francisco Beltrão - PR. Após a etapa de dessora e salga, foram separados quatro quilos para as amostras controle, e nos outros quatro quilos foi adicionada quitosana (1%). Foram realizadas análises físico-químicas de umidade, sólidos totais e acidez, e microbiológicas de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais e termotolerantes e bactérias ácido lácticas. De acordo com os resultados, a adição da quitosana não interferiu nas características físico-químicas das amostras. Em relação à avaliação microbiológica, todas as amostras apresentaram valores baixos para *Staphylococcus* coagulase positiva, dessa forma não foi possível determinar a influência da quitosana no desenvolvimento desse microrganismo. A concentração de 1% de quitosana se mostrou ineficiente em inibir o desenvolvimento de coliformes totais. Também não foi possível avaliar a ação da quitosana sobre coliformes termotolerantes, pois todas as contagens foram baixas. Não houve interferência da quitosana no desenvolvimento de bactérias ácido lácticas.

Palavras-chave: Queijo Colonial artesanal. Quitosana. Ação antimicrobiana. Leite cru.

ABSTRACT

CARNEIRO, Gabriel B. **Chitosan application for microbiological control in artisanal Colonial cheese.** 2021. Course Conclusion Paper (Food Engineering). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2021.

The production of artisanal Colonial cheese has great social and cultural influence in the southern region of Brazil. However, the use of raw milk and deficiencies in Good Manufacturing Practices can contribute to the occurrence of contamination by microorganisms such as coliforms and *Staphylococcus* in the product. The aim of this study was to evaluate the applicability of chitosan incorporated into the curds as a microbiological control in artisanal Colonial cheese. The cheeses were produced with raw milk in a cheese factory located in the rural area of Francisco Beltrão - PR. After the step of draining and salting, four kilograms were separated for the control samples, and in the other four kilograms, chitosan was added. Physicochemical analyzes of moisture, total solids and acidity, and microbiological analyzes of coagulase-positive *Staphylococcus*, total and thermotolerant coliforms and lactic acid bacteria were performed. According to the results, the addition of chitosan did not interfere with the physicochemical characteristics of the samples. Regarding the microbiological evaluation, all samples showed low values for coagulase-positive *Staphylococcus*. Thus, it was not possible to determine the influence of chitosan in the development of this microorganism. The 1% concentration of chitosan is shown to be inefficient in inhibiting the development of total coliforms. It was also not possible to evaluate the action of chitosan on thermotolerant coliforms, as the count was low. There was no interference of chitosan in the development of lactic acid bacteria.

Keywords: Artisanal Colonial cheese. Chitosan. Antimicrobial action. Raw milk.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVOS	8
2.1	Objetivo Geral	8
2.2	Objetivos Específicos	8
3	REVISÃO DE LITERATURA	9
3.1	Queijo Colonial Artesanal	9
3.2	Microbiota em Queijos Artesanais	11
3.3	Quitosana	16
3.3.1	Ação antimicrobiana da quitosana	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Fabricação dos Queijos e Adição de Quitosana	22
4.2	Análises Físico-químicas	22
4.3	Análises Microbiológicas	22
4.4	Análise Estatística	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Análises Físico-químicas	24
5.2	Análises Microbiológicas	26
5.2.1	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	26
5.2.2	Coliformes totais e termotolerantes	26
5.2.3	Bactérias Ácido-Láticas	29
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

O queijo Colonial artesanal é um importante componente da cultura da região Sul do Brasil. Esse tipo de queijo, frequentemente produzido a partir de leite cru, necessita de cuidados na cadeia produtiva devido à grande incidência de microrganismos deteriorantes e patógenos que diminuem a qualidade do produto e oferecem riscos à saúde humana. Para que seja possível manter a tradição dos meios de produção do queijo Colonial artesanal, faz-se necessário desenvolver métodos eficientes de controle microbiológico.

A presença de microrganismos como *Staphylococcus* e coliformes em queijos é recorrente. O *S. aureus* pode estar presente no leite utilizado como matéria-prima, proveniente de vacas com mastite, mas também devido a deficiências na higiene do processo. Os coliformes são oriundos principalmente de água contaminada, deficiências de higiene na ordenha e na fabricação do queijo. Dessa forma, constata-se a importância das Boas Práticas de Fabricação para a produção desse tipo de alimento.

O uso de antimicrobianos em alimentos é necessário para conter a disseminação de doenças transmitidas por alimentos (DTA's). De acordo com o Ministério da Saúde (2018), houve um total de 12.503 mil surtos de DTA's entre 2000 e 2017, deixando 236.403 mil pessoas doentes. Muitos desses surtos são causados por bactérias como o *S. aureus*, capazes de produzir toxinas que causam náuseas, vômitos e diarreias em pouco tempo após a contaminação.

Atualmente a demanda por produtos livres de aditivos sintéticos cresce de forma acentuada entre os consumidores, baseada na busca por uma vida mais saudável. Dessa forma, as substâncias naturais podem ser empregadas na indústria alimentícia para fornecer ao consumidor um produto de qualidade. Dentre essas substâncias está a quitosana, um polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza e que pode ser utilizado como antimicrobiano natural.

Dessa forma, este trabalho visa produzir um queijo Colonial artesanal com quitosana dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação, indo ao encontro das tendências contemporâneas de alimentos "mais naturais", e também proporcionar nova alternativa de controle microbiológico aos produtores da região, que buscam oferecer um produto de qualidade a seus consumidores.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade da quitosana incorporada à massa para controle microbiológico em queijo Colonial artesanal.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir queijo Colonial artesanal com quitosana incorporada à massa.
- Determinar a influência da quitosana na umidade e acidez do queijo produzido.
- Analisar a ação da quitosana em inibir o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e coliformes.
- Avaliar a ação da quitosana nas bactérias ácido lácticas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Queijo Colonial Artesanal

O Brasil foi responsável pela produção de aproximadamente 34,84 bilhões de litros de leite em 2019, sendo 12,45% dessa quantidade proveniente da produção do estado do Paraná. A produção de queijos no Brasil se manteve forte, mesmo em meio às restrições devido ao Coronavírus. Foram utilizados 8,746 bilhões de litros de leite para a produção de queijos em 2020, ano em que também houve aumento na importação, com variação de 11,3% do ano anterior (EMBRAPA, 2021). Mesmo o queijo Colonial não sendo um dos principais tipos produzidos, sua importância cultural e econômica deve ser evidenciada.

O queijo Colonial é um queijo artesanal produzido a partir da coagulação enzimática do leite cru ou pasteurizado, comercializado após poucos dias de maturação e culturalmente consumido na região Sul do Brasil. Devido a sua grande importância cultural, até os dias de hoje sua produção está atrelada às técnicas artesanais, carregadas por gerações em famílias que utilizam a produção do queijo Colonial como forma de complementar a renda. A valorização desse produto pelos consumidores contribui para a sua comercialização e mantém aquecida a economia das pequenas regiões interioranas. A grande variedade de queijos Coloniais se dá pela diversidade de técnicas empregadas pelos produtores. Essas técnicas foram desenvolvidas ao longo dos anos e transmitidas no âmbito familiar, agregando conhecimentos novos à cultura da região (CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2019; LAMPERT; AGNOL, 2019; BORDINI *et al.*, 2020).

O queijo Colonial é um queijo semigordo ou gordo, de umidade média entre 35 e 50%, variável de acordo com o tempo de maturação. Apresenta coloração amarelada uniforme, produzido sem o uso de corantes, sabor e odor característicos, brando, ligeiramente ácido, pouco desenvolvido a pronunciado de acordo com o grau de maturação. O formato típico é cilíndrico, mas alguns produtores elaboram o queijo Colonial retangular (paralelepípedo). Sua textura é compacta, podendo apresentar olhaduras. A consistência é semidura ou branda/macia, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação, de crosta fina ou de média espessura, sem trincas (CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2021; PEREIRA, 2021).

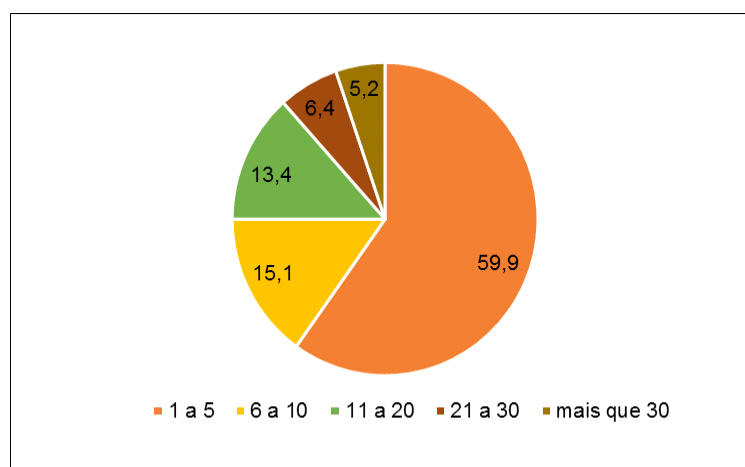
O termo “artesanal” refere-se à produção de forma tradicional, rústica, na maioria das vezes em pequena escala, por famílias. De acordo com o Decreto nº 9.918/2019 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), produtos artesanais são produtos comestíveis elaborados com matéria-prima de origem animal de produção própria ou de origem determinada, elaborados com técnicas predominantemente manuais por alguém que detenha o domínio integral do processo produtivo. Os queijos produzidos dessa forma possuem sabores e aromas característicos, principalmente originários da utilização do leite cru. A busca contínua por esses produtos está correlacionada com a confiança que cresce entre o consumidor e o produtor (SILVEIRA; TREVISAN, 2007; SEBRAE, 2008; BRASIL, 2019c).

Produtos alimentícios de origem animal fabricados de forma artesanal podem ser identificados pela utilização do selo ARTE, além do selo de inspeção oficial, quando serão reconhecidos e comercializados em todo território nacional. O selo ARTE contempla alimentos produzidos através de técnicas tradicionais, com vinculação cultural e emprego de boas práticas agropecuárias e de fabricação que garantem um produto seguro ao consumidor (BRASIL, 2019c; BRASIL, 2019e).

No entanto, algumas questões afligem os produtores. A comercialização do queijo Colonial muitas vezes ainda é clandestina, mas continua praticada por ser uma forma de garantir um destino diferente ao leite produzido pelos agricultores, contribuindo para a renda da família. Também existe a carência de assistência técnica para proprietários de pequenas empresas. Ainda, a falta de informação dificulta o aprimoramento da produção e acarreta em falhas no produto, ocasionando perdas econômicas (IDE; BENEDET, 2001; SILVEIRA; TREVISAN, 2007).

A região Sudoeste do Paraná é a principal bacia leiteira do estado, estando entre as dez mesorregiões de maior produção de leite do Brasil. As microrregiões de Francisco Beltrão, Capanema e Pato Branco tiveram destaque na produção de leite no ano de 2017 (EMBRAPA, 2019; EMBRAPA, 2021). A região conta com um grande número de municípios produtores de queijo Colonial. A Figura 1 mostra que a maioria dos pequenos produtores possuem cerca de 5 animais na produção de leite, fornecendo até 50 litros por dia (CASTRO-CISLAGHI *et al.*, 2019).

Figura 1. Percentual de propriedades em relação ao número de animais que possuem, região Sudoeste do Paraná, 2019.



Fonte: Castro-Cislaghi *et al.* (2019).

A demanda por um produto livre de contaminações é uma preocupação comum entre os produtores de queijo Colonial, visto que todos eles devem respeitar a legislação e fornecer um produto seguro e de qualidade para seus consumidores. Nesse caso, análises laboratoriais frequentes são requeridas e têm extrema importância. Embora a qualidade sanitária do queijo Colonial seja uma preocupação constante, o consumo desse produto tem caráter cultural e proporciona alegria, prazer e bem-estar aos consumidores (STEINBACH *et al.*, 2021).

3.2 Microbiota em Queijos Artesanais

A microbiota do queijo está associada aos microrganismos presentes no leite utilizado para sua fabricação, bem como os microrganismos obtidos por contaminação decorrente de falhas nas Boas Práticas de Fabricação (BPF). A Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) apresenta os parâmetros a serem respeitados acerca da quantidade de microrganismos presentes nos queijos comercializados. De acordo com a IN, o produto deve apresentar ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, além de respeitar os limites de tolerância para *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli*, de acordo com a umidade do queijo (BRASIL, 2019a).

Muitos produtores desejam produzir queijos utilizando leite cru, buscando um produto com características sensoriais superiores aos queijos de leite pasteurizado. A

produção de queijos com leite cru é permitida pela legislação brasileira, que estabelece um tempo de maturação mínimo de 60 dias, a uma temperatura maior que 5 °C. Para reduzir o tempo de maturação é necessário que análises feitas por órgãos reconhecidos no Sistema Brasileiro de Inspeção de Produtos de Origem Animal – Sisbi/POA comprovem que essa alteração no tempo não comprometerá a qualidade e inocuidade do produto. Essa possibilidade é restrita apenas a queijarias livres de tuberculose e brucelose de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose Animal (PNCEBT). Além disso, nessas queijarias devem ser implementados o Programa de Controle de Mastite (detecção de mastite clínica e subclínica), análises do leite (composição centesimal, Contagem de Células Somáticas – CCS e Contagem Bacteriana Total – CBT), o Programa de Boas Práticas Agropecuárias (BPA) e de Fabricação (BPF) (controle de operadores, controle de pragas e transporte adequado de produto). Também deve ser feito o controle de potabilidade da água utilizada na produção e implementada a rastreabilidade de produtos (BRASIL, 2013; BRASIL, 2017; BRASIL, 2019d).

O queijo Colonial artesanal apresenta uma população microbiana diversificada, devido ao fato de ser produzido a partir do leite cru e sem adição de um inóculo inicial reconhecido (cultura *starter*) (CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2021). As bactérias ácido-lácticas são encontradas no leite cru naturalmente, onde disputam desenvolvimento com microrganismos patógenos, auxiliando na redução da multiplicação celular e produção de toxinas. Além de contribuir como mecanismo de defesa contra os principais microrganismos que podem contaminar o queijo (*S. aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*), as bactérias ácido-lácticas são capazes de produzir substâncias que afetam as características sensoriais do queijo, como alguns ácidos e gás carbônico (JORDAN *et al.*, 2014; FUENTES FANEGAS *et al.*, 2017; VIÇOSA *et al.*, 2019).

A maturação é uma etapa de grande importância para o queijo Colonial, pois garante proteção e características sensoriais ao produto. É durante essa etapa que os microrganismos endógenos desejáveis se desenvolverão para disputar contra os patógenos e deteriorantes (indesejáveis). Alterações físico-químicas como redução de pH e umidade também auxiliam no controle microbiano devido à dificuldade que os microrganismos têm em se desenvolver em ambientes impróprios. As modificações sensoriais desenvolvidas nessa etapa são oriundas de transformações bioquímicas e

proporcionam sabores e aromas característicos que são desejados pelos consumidores (CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2019).

A contaminação microbiológica é responsável por afetar economicamente a indústria, e causar inúmeras doenças em consumidores. Mesmo com a utilização de leite pasteurizado, o queijo é regularmente associado a doenças transmitidas por alimentos, pois até chegar à mesa do consumidor, diversos estágios do processamento são suscetíveis à contaminação (FEITOSA *et al.*, 2003; QUEIROZ *et al.*, 2018). Os microrganismos contaminantes mais prevalentes nos queijos artesanais brasileiros são coliformes e *Staphylococcus* (SOBRAL *et al.*, 2017; CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2019; CASTRO-CISLAGHI; BADARÓ, 2021).

Oliveira, Bravo e Tonial (2012) estudaram a sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e fizeram uma avaliação microbiológica de queijos Coloniais da região Sudoeste do Paraná. As amostras foram coletadas de quatro produtores diferentes, em supermercados e feiras livres. O resultado das análises microbiológicas mostrou que das 32 amostras, metade delas apresentaram coliformes termotolerantes fora do padrão estabelecido pela legislação, todas apresentaram *Staphylococcus* coagulase positiva e 12,5% apresentaram *Salmonella* sp. A partir desse resultado, pode-se considerar as amostras como impróprias para o consumo.

Antonello, Kupkovisk e Bravo (2012) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos Coloniais comercializados em Francisco Beltrão – PR. Quatro marcas de queijo Colonial comercializadas em supermercados foram escolhidas aleatoriamente. Dentre as 28 amostras analisadas, 17,85% apresentaram contaminação por *Salmonella* sp. e 82,14% apresentaram contagem acima de $5,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para *S. aureus*. Houve presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em 50% das amostras.

Da Silva *et al.* (2015) estudaram a qualidade microbiológica e físico-química de queijos Coloniais com e sem inspeção, comercializados no Sudoeste do Paraná. Para a execução do estudo oito amostras foram coletadas, sendo duas de cada serviço de inspeção (municipal, estadual e federal), e duas sem inspeção. Os resultados mostraram que 50% das amostras estavam com contagem acima do permitido pela legislação para coliformes totais e termotolerantes, sendo caracterizadas como impróprias para o consumo. Para *S. aureus*, todas as amostras

apresentaram valores inferiores a $1,0 \times 10^1$ UFC.g⁻¹, estando em conformidade com a legislação.

Garcia *et al.* (2016) avaliaram a qualidade microbiológica de 18 queijos frescos artesanais comercializados na região norte de Minas Gerais. Resultados apontam que foi constatado contagem elevada de coliformes totais e termotolerantes em 89% das amostras. Ao comparar resultados com a legislação, 94% dos queijos analisados não estavam de acordo com os valores estipulados pela lei, não sendo aptos a serem comercializados e/ou consumidos. Todas as amostras apresentaram valores de contagem de *S. aureus* superiores ao estipulado pela legislação.

Eckert e Webber (2016) analisaram o controle de qualidade microbiológico de queijos Coloniais artesanais maturados, comercializados na feira do pequeno produtor da cidade de Cascavel – PR. Das cinco amostras coletadas, apenas uma das amostras não apresentou conteúdo de coliformes termotolerantes. Para *S. aureus*, todas as amostras obtiveram resultado positivo.

Ribas (2019) analisou a qualidade microbiológica de 8 queijos Coloniais produzidos por diferentes produtores do município de Roque Gonzales-RS. De acordo com os resultados, três amostras apresentaram contagem de coliformes totais superior ao previsto por lei, e apenas uma amostra apresentou contagem de coliformes termotolerantes superior ao previsto por lei. Todos os queijos apresentaram quantidade expressiva de microrganismos mesófilos aeróbios, bolores e leveduras, indicando falhas nas Boas Práticas de Fabricação.

Tavares *et al.* (2019) estudaram a qualidade de queijos Coloniais artesanais produzidos e comercializados no Sul do Rio Grande do Sul. Das 30 amostras avaliadas, apenas quatro estavam dentro dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação. De 26 amostras consideradas fora do padrão, 24 apresentaram contagem acima do permitido para *Staphylococcus* coagulase positiva. Em relação aos coliformes termotolerantes, 13 amostras estavam fora do padrão.

Bordini *et al.* (2020) fizeram uma avaliação microbiológica de queijo tipo Colonial mediante presença ou ausência de certificação comercial no Sul do Brasil. As 18 amostras foram coletadas simulando situação real de compra, sendo 12 em feiras livres e 6 no comércio varejista, em Pelotas – RS. Uma das amostras do comércio varejista não estava sob refrigeração e todos os queijos das feiras livres estavam expostos ao ambiente e sem controle de temperatura. Dentre as amostras das feiras livres, apenas duas possuíam embalagem. As análises mostram que 66,6%

dos queijos do comércio varejista e 100% dos queijos de feiras livres apresentaram contagens acima de $1,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para coliformes totais. Para coliformes termotolerantes, 16,6% das amostras do comércio varejista e 75% das feiras livres apresentaram contagem acima do limite estipulado pela legislação. Todas as amostras do comércio varejista apresentaram contagem dentro do padrão para *Staphylococcus* coagulase positiva, enquanto 7 das 12 amostras das feiras livres apresentaram valores acima do recomendado, sendo consideradas impróprias para o consumo. Ao fim do estudo, 11 das 18 amostras foram caracterizadas como impróprias para o consumo.

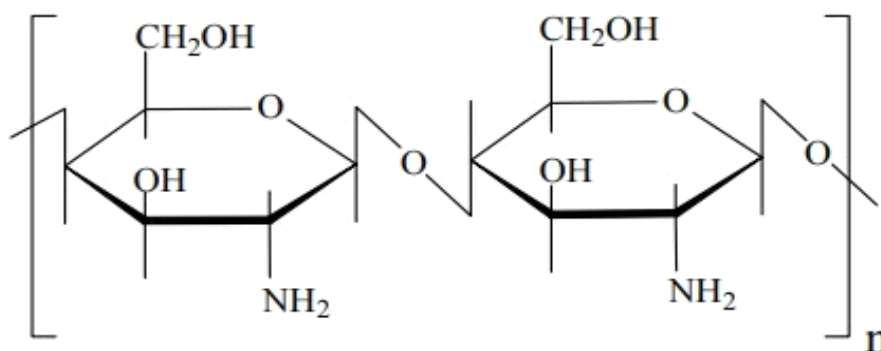
A contaminação de *S. aureus* no gado leiteiro é responsável pela grande quantidade de animais com mastite bovina, e que produzem leite de baixíssima qualidade. Além de causar doença em animais, o *S. aureus* está fortemente relacionado aos surtos provocados por microrganismos estafilococos em humanos. Quando em condições adequadas, o *S. aureus* é capaz de produzir enterotoxinas estafilocócicas resistentes ao calor, inutilizando o efeito do tratamento térmico empregado como barreira tecnológica ao leite. É importante ressaltar que o microrganismo não é capaz de produzir toxinas quando está no organismo do ser humano, apenas no alimento. As doenças relacionadas a essas toxinas causam sintomas como febre, diarreia, vômito e em casos extremos, a morte. Esses sintomas ocorrem quando a quantidade de enterotoxinas atinge 100 ng, produzidas por populações de microrganismos maiores que 10^5 UFC.g⁻¹ (BELOTI, 2015; JOHLER; ZURFLUH; STEPHAN, 2016; MESQUITA *et al.*, 2019).

Os coliformes podem ser divididos entre coliformes totais (capacidade de fermentar a lactose e produção de ácido e gás a 30 °C) e termotolerantes (capacidade de fermentar a lactose e produção de ácido e gás a 45 °C). Durante a ordenha, a contaminação por coliformes pode ocorrer em diversas situações, pois podem estar presentes nas mãos dos trabalhadores, na superfície de equipamentos e do úbere da vaca, na água e nos tanques de armazenamento. É possível reduzir a contaminação durante a ordenha com a higienização adequada e a utilização de agentes desinfetantes. Os principais sintomas relacionados aos coliformes são dores abdominais, diarreia, náusea e vômito. Alguns casos mais severos podem ocasionar diarreia com sangue e problemas no fígado, podendo levar pessoas idosas em risco à morte (MULINARI; ROSOLEN; ADAMI, 2017; WANJALA; NDUKO; MWENDE, 2018; CALS, 2021).

3.3 Quitosana

A quitosana é um heteropolissacarídeo obtido naturalmente ou a partir da desacetilação da quitina, sendo um dos mais abundantes na natureza, encontrado majoritariamente no exoesqueleto de crustáceos, como camarão e caranguejo, e na parede celular de alguns fungos. Sua estrutura é composta por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-acetoamido-2-desoxi-D-glicopiranosose conectadas a partir de ligações glicosídicas β -1,4 (Figura 2). A matéria-prima utilizada, juntamente com diferentes binômios de tempo/temperatura, interferem diretamente nas características físico-químicas da quitosana, afetando suas propriedades funcionais. Diferente da quitina, a quitosana é solúvel em soluções ácidas diluídas. Em situações em que o pH é maior que 6,0, a quitina perde sua carga pela desprotonação das aminas presentes em sua estrutura, perdendo sua capacidade de solubilização nesse meio (GUERRA-SÁNCHEZ *et al.*, 2009; AHMAD SHIEKH *et al.*, 2013; FONSECA, 2016).

Figura 2. Representação da estrutura da quitosana.



Fonte: Santos (2004).

O processo de obtenção da quitosana ocorre após a desproteinização e desmineralização da quitina. A desacetilação é realizada em altas temperaturas, com a utilização de hidróxido de amônia. Quando a desacetilação é realizada com a matéria-prima em estado sólido, a estrutura molecular cristalina possibilita a formação de irregularidades na estrutura da quitosana (AZEVEDO *et al.*, 2007; WESKA *et al.*, 2007; FONSECA, 2016).

A massa molar média, disposição dos grupos reagentes e o grau médio de acetilação são exemplos de elementos que interferem em propriedades físico-

químicas como solubilidade e viscosidade. A quitosana possui grande capacidade de formação de gel, umedecimento e enrijecimento e pode ser usada como auxiliar na flocculação de proteínas. Por ter grupos amino bem reativos pode ser utilizada no tratamento de águas residuais como quelante de metais pesados. Em comparação com membranas de acetato de celulose, as membranas de quitosana são mais eficazes em bloquear a passagem de oxigênio, nitrogênio e dióxido de carbono auxiliando no prolongamento da vida de prateleira de alimentos (PETER, 1995; SANTOS, 2004).

Por ser um polímero natural, não-tóxico e de grande biodegradação, a quitosana é aplicada em áreas da biomedicina, agricultura, veterinária e em alimentos, como exemplo, em revestimento para garantir ao produto maior qualidade e vida-de-prateleira. Por ter capacidade de interferir nas propriedades da membrana de microrganismos e alterar o balanço osmótico de dentro da célula, a quitosana tem grande potencial como agente bactericida e bacteriostático (GOY; BRITTO; ASSIS, 2009; LARANJEIRA; FÁVERE, 2009).

3.3.1 Ação antimicrobiana da quitosana

A demanda pela utilização de ingredientes naturais em alimentos propulsiona os estudos sobre a ação antimicrobiana da quitosana. Os mecanismos de atividade antimicrobiana da quitosana podem diferir em bactérias gram-positivas e gram-negativas. Para as gram-positivas, como o *S. aureus*, a quitosana de médio a alto peso molecular tende a se acumular e formar uma superfície polimérica em volta da célula, bloqueando a passagem de substâncias. Já para as gram-negativas, a quitosana de menor peso molecular penetra na célula e altera as condições fisiológicas. Como alternativa, a utilização de nanopartículas de quitosana se torna notável devido à superfície de carga negativa da célula bacteriana reagir com as nanopartículas carregadas positivamente, sendo elas absorvidas, assim rompendo a membrana e matando a célula bacteriana (ZHENG; ZHU, 2003; QI *et al.*, 2004).

Pesquisa realizada por Guerra-Sanchez *et al.* (2009) mostrou que a quitosana, em baixas concentrações (até 3,0 mg.mL⁻¹), pode inibir o crescimento micelial de fungos *Rizhopus stolonifer*. O tipo e a concentração de quitosana são fatores que afetam a ação inibitória em microrganismos, como citado por Lou *et al.* (2011), em um estudo sobre a ação antimicrobiana da quitosana em *Burkholderia seminalis*.

Em alimentos, Silva *et al.* (2019) estudaram a viabilidade do revestimento de quitosana de alto peso molecular como controle antimicrobiano em carnes *in natura*, onde foi constatado que o revestimento de quitosana a 2% foi eficaz em diminuir a quantidade de células de *S. aureus* e *Salmonella enterica*. O emprego da quitosana como revestimento também foi eficaz em cerejas (TOKATLI; DEMIRDÖVEN, 2020), peixe sargo japonês (EBADI *et al.*, 2019) e em maçãs minimamente processadas e resfriadas (KARAGÖZ; DEMIRDÖVEN, 2019).

Casemiro *et al.* (2019) avaliaram a aplicabilidade da quitosana pura e associada a extratos vegetais para o controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão formosa. Os resultados mostraram que, para esse microrganismo, a quitosana associada ao extrato aquoso de cravo-da-índia ou canela foi mais eficaz que a quitosana pura. A junção do óleo essencial de cravo com nanopartículas de quitosana também reduziu a ocorrência de contaminação fúngica em arilos de romãs, além de preservar características físico-químicas como peso, pH, sólidos solúveis totais e atividade antioxidante (HASHEMINEJAD; KHODAIYAN, 2019).

Franco *et al.* (2020) estudaram a influência da quitosana na ação antimicrobiana e nas propriedades mecânicas e de barreira da blenda polimérica amido/quitosana/fibra de cana-de-açúcar contra *E.coli*. Os filmes foram preparados utilizando a técnica de "casting" com 3 g de amido/100 g de solução filmogênica, 30 g de glicerol/100 g de amido, 15 g de fibra de cana-de-açúcar/100 g de amido e com concentração de quitosana variando entre 0,0 (controle), 0,25, 0,5 e 1,0 g/100 g de solução filmogênica. Resultados mostram que a adição da quitosana até a concentração de 0,5 g/100 g de solução filmogênica aumentou as propriedades mecânicas, tendo uma queda na eficácia na concentração de 1,0 g/100 g de solução filmogênica. Em contrapartida, o aumento da concentração piorou as propriedades de barreira, aumentando a permeabilidade de vapor d'água, quando comparado ao controle. Em relação a atividade antimicrobiana, quanto maior a concentração da quitosana no filme, menor a multiplicação de células de *E.coli*.

Silva *et al.* (2020) analisaram a eficácia do revestimento de monocamada de quitosana contra patógenos em carne bovina fresca. Os filmes foram preparados com concentrações de quitosana de 1,0, 1,5 e 2,0%. A atividade microbiana da quitosana foi observada pela formação de halos de inibição, sendo o melhor resultado escolhido para ser aplicado como revestimento nas amostras de carne. Na carne, foram

separados os grupos de cada microrganismos (*E.coli*, *Salmonella enteriditis* e *L. monocytogenes*) e o grupo controle. Resultados mostram que o halo de maior inibição foi o de 2,0% de quitosana, variando de 16 a 22 mm. O revestimento com 2,0% de quitosana foi eficaz na redução da multiplicação dos três patógenos estudados.

O estudo realizado por Brazeiro *et al.* (2018) teve como objetivo observar a ação antimicrobiana de filmes de gelatina com quitosana contra *S. aureus* em tilápia obtida em mercado local. Os filmes sem adição de quitosana (controle) e com adição de quitosana foram produzidos utilizando a técnica de “casting”. Resultados indicam que não houve multiplicação de *S. aureus* nas amostras, concluindo que a quitosana é um agente de ação antimicrobiana satisfatória.

Em queijos, as análises realizadas por Altieri *et al.* (2005) evidenciaram a ação positiva da quitosana como controle microbiano em muçarela. Foram produzidos queijos sem quitosana como amostra controle e queijos com quitosana. Durante a produção do queijo com quitosana, foi preparada uma solução de quitosana com soro de leite e adicionada ao restante do leite. Resultados mostraram que a adição da quitosana ao leite (concentração final de 0,075%) reduziu a quantidade de microrganismos indesejáveis, como coliformes, em diferentes etapas da produção do queijo, mas não tiveram um efeito significativo em bactérias ácido-lácticas. Na avaliação sensorial, não houve diferença entre as amostras sem adição e com quitosana. Desse modo, a utilização da quitosana para prolongar a vida de prateleira do queijo muçarela é uma alternativa viável.

Em ricota, Di Pierro *et al.* (2011) estudaram a ação de um filme de quitosana e proteína do soro do leite com intuito de prolongar a vida de prateleira. Os filmes foram aplicados em ricotas coletadas de um laticínio local em Salerno, Itália. As análises microbiológicas mostraram que as amostras com revestimento de quitosana e proteína do soro tiveram menor contagem para microrganismos mesófilos, psicrotróficos e bactérias ácido-lácticas que as amostras sem revestimento (controle). Também é evidenciado que o limite aceitável desses microrganismos nunca foi ultrapassado nas amostras com revestimento. Com esses resultados, foi concluído que o revestimento de quitosana com proteína do soro do leite pode ser efetivo no prolongamento da vida de prateleira da ricota.

Em queijo Minas frescal, estudos realizados por Pereira (2013) e Pereira *et al.* (2018) mostraram que o revestimento de quitosana auxiliou no controle microbiano de *S. aureus*, sendo o revestimento com 20% de quitosana mais eficaz que o

revestimento com 5%. As amostras com revestimento de 20% de quitosana apresentaram menores valores de umidade em relação às amostras com revestimento de 5% e sem revestimento, resultado relacionado com a hidrofiliabilidade da quitosana. Quanto à alteração nas características sensoriais, o teste de comparação pareada mostrou que há diferença entre as amostras com revestimento de 5 e 20% de quitosana, mas as duas apresentaram boa aceitação. Também foi avaliada a ação antibacteriana da quitosana sob cepas patogênicas de *S. aureus*. Para isso, 1 mL de solução de cepas de *S. aureus* foram inoculadas em 5 mL caldo queijo com várias concentrações de quitosana (10 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹ e 0,625 mg.mL⁻¹) para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Segundo resultados, a CIM encontrada foi de 2,5 mg.mL⁻¹, sendo a menor concentração capaz de inibir o desenvolvimento da cepa no caldo queijo. A CBM foi de 5 mg.mL⁻¹ pois essa foi a quantidade em que não ocorreu desenvolvimento no caldo e nem em meio sólido.

Maia (2013) estudou os efeitos da quitosana em pó adicionada na massa de queijo de Coalho, em concentrações de 2, 3, 4 e 6%. De acordo com os resultados, as concentrações de 4 e 6% afetaram as características sensoriais do produto, reduzindo a qualidade ao provocar coloração, odor e texturas inadequados. As análises microbiológicas realizadas em amostras controle (sem adição), amostras com 1,5% de quitosana e amostras com 3% de quitosana apresentaram resultados dentro do estipulado pela legislação devido à qualidade da matéria-prima e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação. A análise sensorial realizada com as amostras de 0, 1,5 e 3% de quitosana mostrou que a preferência dos julgadores foi pela amostra controle, seguida da amostra com 1,5% e por último a amostra com 3% de quitosana.

Em queijo de coalho, o estudo de Oliveira (2015) teve como objetivo avaliar a bioatividade da quitosana como cobertura comestível na inibição de *L. monocytogenes*. O gel de quitosana foi aplicado em cubos de queijo nas concentrações 15 mg.mL⁻¹, 10 mg.mL⁻¹ e 5 mg.mL⁻¹. Concluiu-se que a cobertura de quitosana propiciou contagens microbianas inferiores aos queijos controle.

Barros (2017) e Barros *et al.* (2019) avaliaram a aplicabilidade da quitosana em diferentes concentrações em queijo de coalho como revestimento comestível e incorporada à massa para controle de crescimento da cepa de *S. aureus* ATCC 6538. Os resultados relatam que a ação antimicrobiana é efetiva principalmente nas concentrações de 4 mg.g⁻¹ quando adicionada na massa, e 15 mg.mL⁻¹ quando

utilizada como revestimento comestível. A análise sensorial se mostrou satisfatória para os parâmetros de qualidade global, cor, aroma, textura e sabor, sendo as amostras com quitosana adicionada à massa em concentração de 4 mg.g^{-1} a que teve maior aceitação.

Lima (2018) avaliou a bioatividade da quitosana incorporada à massa (concentrações de 1, 2 e 4 mg.g^{-1}) e como revestimento ($5, 10$ e 15 mg.mL^{-1}) na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho. De acordo com os resultados é possível observar que quanto maior a concentração de quitosana incorporada a massa, maior é a inibição da multiplicação dos microrganismos, sendo a concentração de 4 mg.g^{-1} a mais efetiva em todas as etapas. Em relação à cobertura de quitosana, o aumento da concentração também obteve maior inibição da multiplicação de microrganismos, sendo a concentração de 15 mg.mL^{-1} a mais efetiva até o fim das análises.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fabricação dos Queijos e Adição de Quitosana

Os queijos Coloniais artesanais foram produzidos em uma queijaria, com Sistema de Inspeção Municipal (SIM), localizada na zona rural do município de Francisco Beltrão, região Sudoeste do Paraná.

Foram produzidos 8 kg de queijo com aproximadamente 70 litros de leite cru, coalho líquido (coagulante quimosina microbiana) e iogurte natural. Após a etapa de dessora e salga na massa, foram separados 4 kg de massa para adição de quitosana (1%) e 4 kg de massa para produção dos queijos controle (sem adição de quitosana). A concentração de quitosana foi definida a partir de dados da literatura, considerando efetividade da ação antimicrobiana e características dos queijos observadas por outros autores.

Foi utilizada quitosana comercial de médio peso molecular (190 – 310 KDa), com grau de desacetilação de 75 - 85% (Sigma-Aldrich, SP, Brasil). A quitosana em pó foi dissolvida em uma pequena quantidade de soro e adicionada à massa do queijo.

A maturação dos queijos ocorreu na queijaria, em câmara fria (5 a 12 °C), e as amostras foram coletadas nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias de maturação para realização das análises. Em cada período foram selecionadas, de forma aleatória simples, 2 peças de queijo controle (denominado como C) e 2 peças de queijo com quitosana (denominado como Q), totalizando 16 peças de queijo.

4.2 Análises Físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no LGQ Laboratórios, situado na cidade de Francisco Beltrão-PR. Foram determinados os teores de umidade e sólidos totais de acordo com o método descrito pela IDF 4:2004 e acidez (% ácido láctico) de acordo com o método 920.124 descrito pela AOAC (2019).

4.3 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no LGQ Laboratórios, situado na cidade de Francisco Beltrão-PR. Para a determinação de *Staphylococcus* coagulase

positiva foi utilizado o método descrito pela ISO 6888-1:1999, coliformes totais por método descrito na Instrução Normativa n° 30/2018 do MAPA (BRASIL, 2018), coliformes termotolerantes pelo método descrito na ISO 4832:2006 e bactérias lácticas pelo método descrito no APHA (2015).

4.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas no *Minitab Statistical Software* (2021). Para determinar se os dados seguem distribuição normal foi utilizado o teste de normalidade de Ryan-Joyner. A avaliação da existência de diferença significativa durante os períodos de maturação foi realizada com a utilização da ANOVA ($p \leq 0,05$) e Teste Tukey como forma de comparação múltipla. O Teste t de Student para duas amostras foi utilizado para determinar diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras no mesmo período de maturação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas estão apresentados na Tabela 1. As amostras C0, C15 e Q0 apresentaram umidade entre 36 e 45,9%, característica de queijos de média umidade. As demais amostras apresentaram valores menores que 35,9%, sendo classificadas como queijos de baixa umidade (BRASIL,1996). Como esperado, houve redução na umidade dos queijos ao longo da maturação.

Tabela 1. Umidade, sólidos totais e acidez de queijo Colonial artesanal controle (C) e com quitosana (Q) durante a maturação.

	Amostra	Dias de maturação			
		0	15	30	45
Umidade (g/100g)	C	45,34 ± 0,36 ^{aA}	36,43 ± 0,79 ^{bA}	32,29 ± 1,39 ^{bcA}	28,67 ± 1,41 ^{cA}
	Q	43,87 ± 0,41 ^{aA}	32,85 ± 0,03 ^{bA}	30,52 ± 0,39 ^{cA}	30,79 ± 0,95 ^{bcA}
Sólidos Totais (g/100g)	C	54,67 ± 0,36 ^{cA}	63,57 ± 0,79 ^{bA}	67,71 ± 1,39 ^{abA}	71,34 ± 1,41 ^{aA}
	Q	56,13 ± 0,41 ^{cA}	67,15 ± 0,03 ^{bA}	69,48 ± 0,39 ^{aA}	69,21 ± 0,95 ^{abA}
Acidez (g/100g)	C	0,41 ± 0,14 ^{aA}	0,63 ± 0,03 ^{aA}	0,69 ± 0,01 ^{aA}	0,69 ± 0,15 ^{aA}
	Q	0,37 ± 0,01 ^{bA}	0,63 ± 0,03 ^{aA}	0,66 ± 0,10 ^{aA}	0,57 ± 0,03 ^{abA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o queijo individualmente nos diferentes períodos de maturação (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os queijos no mesmo período de maturação (Teste t, $p < 0,05$) para cada parâmetro analisado.

Em 45 dias de maturação, as amostras controle apresentaram redução de umidade de 17,67%, enquanto as amostras com quitosana de 13,1%. A diminuição da umidade durante o período de maturação também foi observada no trabalho realizado por Santos (2016), que estudou os efeitos do período de maturação de queijos produzidos com leite cru sobre a microbiota deteriorante e *L. monocytogenes*. Os teores de umidade das amostras diminuíram de 65 para 17% em um período de maturação de 60 dias.

Não houve diferença significativa entre as amostras controle e com quitosana em nenhum dos períodos avaliados. Dessa forma, a adição de 1% de quitosana à massa não interferiu na umidade do queijo Colonial artesanal.

Em queijo de coalho, o aumento da concentração de quitosana (1,5 e 3%) ocasionou a diminuição da umidade dos queijos em relação às amostras controle (MAIA, 2013). Oliveira (2015) observou que entre queijos de coalho revestidos com cobertura de quitosana de 5, 10 e 15 mg.ml⁻¹, apenas as amostras com revestimento de 5 mg.ml⁻¹ tiveram menor umidade que o controle. Por outro lado, no estudo de Pereira (2018), com queijo Minas frescal, as amostras imersas em gel com 5 e 20% de quitosana apresentaram valores diferentes de umidade do que as amostras controle, sendo que as amostras imersas em 20% de quitosana obtiveram a menor umidade, seguido das amostras imersas em 5%.

A acidez variou de 0,41 a 0,69% para as amostras controle, e de 0,37 a 0,66% para as amostras com quitosana. As amostras C0 e Q0 apresentaram os menores valores para acidez. O queijo estudado é produzido com a adição de iogurte natural ao leite. Dessa forma, era esperado um queijo levemente ácido. Lima e Leal (2017) observaram valores de acidez de queijos artesanais entre 0,14 e 0,92%. Em queijo de coalho, Barros (2017) encontrou variação de acidez de 0,12 a 0,31% para as amostras controle e acidez de 0,22% para as amostras com 4 mg.g⁻¹ de quitosana incorporada à massa.

A acidificação do queijo ocorre devido ao processo de conversão da lactose em ácido lático pelas bactérias ácido lácticas. O aumento da acidez traz benefícios como o controle de microrganismos indesejáveis, interfere na ação do coagulante e em enzimas durante a maturação e afeta a sinérese durante a dessoragem (DE PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

A adição de quitosana à massa não interferiu na acidez do queijo, pois não houve diferença significativa entre as amostras C e Q em nenhum período avaliado. Esse resultado é semelhante ao apresentado no estudo de Maia (2013), no qual não houve diferença na acidez para três concentrações de quitosana incorporada à massa de queijo de coalho. O estudo de Oliveira (2015) mostra que apenas os queijos de coalho com revestimento de 5 e 10 mg.g⁻¹ apresentam valores menores para acidez que o controle, e as amostras com 15 mg.g⁻¹ foram iguais.

5.2 Análises Microbiológicas

5.2.1 *Staphylococcus* coagulase positiva

Todas as amostras apresentaram contagens menores que $1,0 \times 10^1$ UFC.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positiva, em conformidade com a legislação (BRASIL, 1996; BRASIL, 2019a). Esse resultado, em amostras controle, é um indicativo de BPA e BPF que resultam em um leite e queijo de boa qualidade e com baixa contaminação. Valores baixos em análises de microrganismos patogênicos são muito importantes em queijos produzidos com leite cru. Dessa forma, não foi possível determinar a ação antimicrobiana da quitosana a 1% incorporada à massa no desenvolvimento desse microrganismo no queijo estudado.

Resultados similares foram observados por Maia (2013), em queijo de coalho, em que obteve contagem menor que 10^2 UFC.g⁻¹ de *Staphylococcus* coagulase positiva nas amostras controle, com 1,5 e com 3% de quitosana. Oliveira (2015) também obteve contagem menor que 10 UFC.g⁻¹ para *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras controle e amostras revestidas com 5, 10 e 15 mg.ml⁻¹ de quitosana.

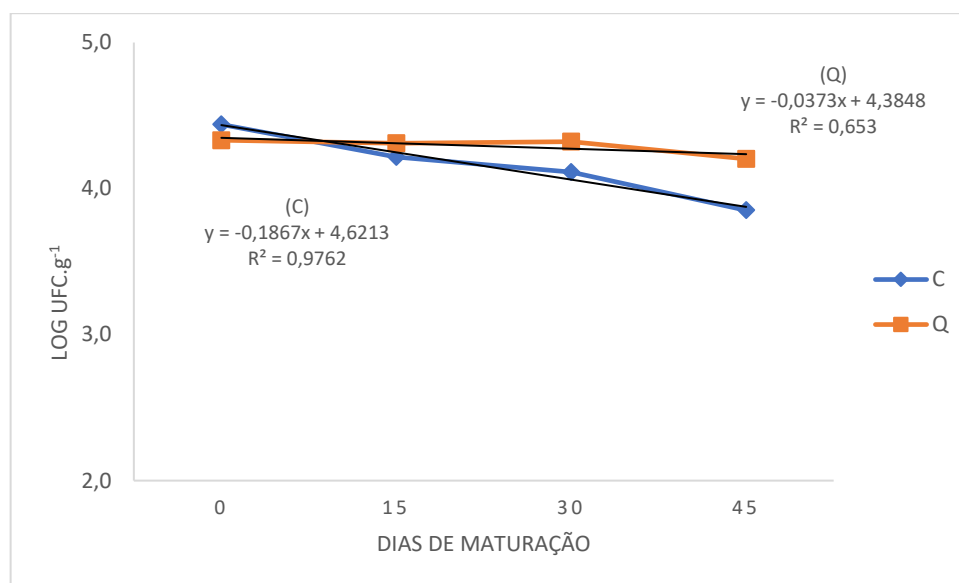
Os resultados obtidos por Barros (2017) mostram que a concentração de 4 mg.g⁻¹ de quitosana incorporada na massa de queijo Coalho foi mais eficaz que 1 e 2 mg.g⁻¹ frente a *S. aureus*. Estudo realizado por Pereira *et al.* (2018) indica que a cobertura de quitosana de 5 e 20 mg.g⁻¹ controlou o desenvolvimento de *S. aureus* em queijo Minas frescal até o 20° dia. As amostras com cobertura de 20 mg.g⁻¹ apresentaram menores contagens de *S. aureus* desde o primeiro dia.

5.2.2 Coliformes totais e termotolerantes

A Figura 3 apresenta as curvas de sobrevivência de coliformes totais nas amostras de queijo Colonial artesanal nos quatro períodos de maturação. As amostras coletadas no primeiro período do estudo (C0 e Q0) apresentaram as maiores contagens de coliformes totais. A curva de sobrevivência das amostras controle apresentou maior declinação que a curva das amostras com quitosana. Durante o período de maturação, houve uma redução na quantidade desses microrganismos,

como mostra a linha de tendência da curva, e as amostras com a menor contagem de coliformes totais foram as amostras do último período analisado (45 dias).

Figura 3. Curva de sobrevivência de coliformes totais em queijo Colonial artesanal controle (C) e com adição de quitosana (Q) durante a maturação.



Fonte: Autoria Própria (2021)

De acordo com a Tabela 2, nenhuma das amostras esteve em conformidade com a legislação para coliformes totais em 45 dias de maturação (BRASIL, 1996). Para estimar a quantidade de dias de maturação necessários para as amostras atingirem contagem abaixo do valor máximo permitido pela legislação, o cálculo das equações apresentadas na Figura 3 foi realizado. Para as amostras controle seriam necessários 60 dias de maturação, e para as amostras com quitosana, 264 dias.

No entanto, de acordo com os novos padrões microbiológicos para alimentos da Anvisa (IN n° 60/2019), que entraram em vigor em dezembro de 2020, para queijos não são mais exigidas análises de coliformes totais, somente de *Escherichia coli* (BRASIL, 2019a). A presença de certos coliformes no meio ambiente diminuiu a associação dos coliformes como um grupo indicador de contaminação fecal. A *E. coli* também pode ser encontrada no meio ambiente, mas sua origem é provavelmente intestinal e, portanto, é um indicador adequado de higiene e de contaminação fecal (METZ; SHEEHAN; FENG, 2020).

Tabela 2. Análises de coliformes totais em queijo Colonial artesanal controle (C) e com quitosana (Q) durante a maturação.

Amostras	Dias de maturação			
	0	15	30	45
C	4,44 ± 0,01 ^{aA}	4,22 ± 0,06 ^{bA}	4,11 ± 0,05 ^{bA}	3,85 ± 0,01 ^{cB}
Q	4,33 ± 0,04 ^{aA}	4,31 ± 0,04 ^{aA}	4,32 ± 0,03 ^{aA}	4,20 ± 0,04 ^{aA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (log UFC.g⁻¹). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o queijo individualmente nos diferentes períodos de maturação (Teste de Tukey, $p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os queijos no mesmo período de maturação (Teste t, $p < 0,05$).

A maturação é uma etapa de extrema importância para queijos produzidos com leite cru. Estudo realizado por Pereira (2019) mostra a redução da contagem de coliformes totais ao longo do período de maturação, em que todos os tratamentos apresentaram contagem média menor que 1 log UFC.g⁻¹ aos 60 dias de maturação.

Apenas houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras controle e com quitosana no quarto período de estudo. Provavelmente seria possível analisar uma diferença maior entre as contagens com um período de estudo mais prolongado. A concentração de quitosana estudada não foi eficiente em reduzir coliformes totais, pois a média das contagens das amostras com quitosana foi maior que a das amostras controle, aos 45 dias de maturação.

Em seu estudo, Altieri *et al.* (2005) não encontraram diferença na contagem de coliformes em queijo muçarela controle e com quitosana, porém mesmo não estatisticamente significativas, as contagens de coliformes foram menores nas amostras com quitosana do que nas amostras sem, em todas as análises, resultado diferente do encontrado neste estudo.

A presença de coliformes está relacionada com a higiene do processo de produção e com a qualidade da água utilizada. Quando há contaminação em grande quantidade com esses microrganismos, pode ocorrer o estufamento precoce do queijo devido à fermentação da lactose e produção de gás carbônico, causando rachaduras e odor característico.

Resultados similares foram observados por outros autores para queijos artesanais. Araújo (2017) pesquisou coliformes totais e termotolerantes em dez

amostras de queijos tipo coalho produzidos com leite cru na Região do Agreste Paraibano e os resultados mostram que todas as amostras apresentaram contagem de coliformes totais e termotolerantes acima do permitido pela legislação. Wagner *et al.* (2016) pesquisaram parâmetros microbiológicos do leite e do queijo artesanal Serrano no RS em três períodos de maturação. De acordo com os resultados da pesquisa, o menor índice de microrganismos foi no último período da maturação (60 dias).

Os valores obtidos para coliformes termotolerantes foram abaixo de $1,0 \times 10^1$ UFC.g⁻¹ para todas as amostras. A baixa contagem de coliformes termotolerantes das amostras pode estar relacionada com as BPF's empregadas durante as etapas de obtenção do leite e fabricação dos queijos. Maia (2013) também não observou contaminação por coliformes termotolerantes, apresentando contagens menores que 3 UFC.g⁻¹ nas amostras controle, com 1,5% e com 3% de quitosana.

Benincá *et al.* (2020) analisou a relação entre as Boas Práticas de Fabricação e a qualidade microbiológica de queijo Colonial artesanal. O estudo mostra que o índice de não-conformidades nas condições higiênico-sanitárias das indústrias durante a fabricação dos queijos tem relação direta com o índice de não-conformidades na carga microbiológica patogênica nos produtos.

5.2.3 Bactérias Ácido-Láticas

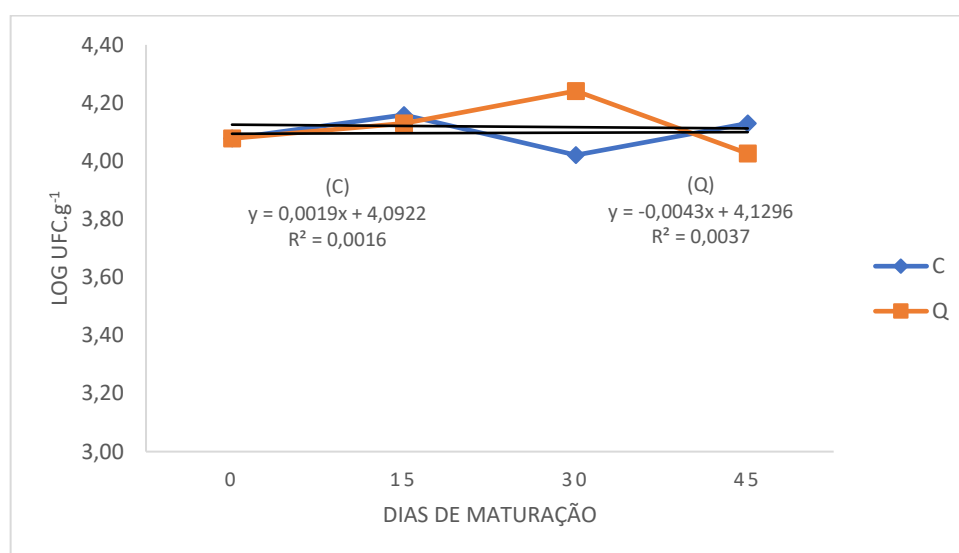
A Figura 4 apresenta a curva de sobrevivência das bactérias ácido lácticas nos quatro períodos de maturação. Não houve diferença significativa entre as amostras C e Q nos quatro períodos de maturação estudados ($p \leq 0,05$) (Tabela 3). A adição de quitosana (1%) não interferiu no desenvolvimento de bactérias ácido-láticas no queijo Colonial artesanal. Resultado similar foi apresentado no estudo de Altieri *et al.* (2005) com queijo muçarela, no qual não houve diferença no desenvolvimento de bactérias ácido-láticas entre as amostras controle e amostras com quitosana. Em contrapartida, o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas em ricota revestida com filme de quitosana e proteína do soro do leite foi menor que em amostras controle, como mostra o estudo de Di Pierro *et al.* (2011).

Tabela 3. Análises de bactérias ácido lácticas em queijo Colonial artesanal controle (C) e com quitosana (Q) durante a maturação.

Amostras	Dias de maturação			
	0	15	30	45
C	4,08 ± 0,05 ^{aA}	4,16 ± 0,06 ^{aA}	4,02 ± 0,03 ^{aA}	4,13 ± 0,02 ^{aA}
Q	4,08 ± 0,05 ^{aA}	4,13 ± 0,02 ^{aA}	4,24 ± 0,05 ^{aA}	4,03 ± 0,07 ^{aA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (log UFC.g⁻¹). Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa para o queijo individualmente nos diferentes períodos de maturação (Teste de Tukey, p < 0,05). Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os queijos no mesmo período de maturação (Teste t, p < 0,05).

Figura 4. Curva de sobrevivência das bactérias ácido lácticas em queijo Colonial artesanal controle (C) e com adição de quitosana (Q) durante a maturação.



Fonte: Autoria Própria (2021)

A importância das bactérias ácido lácticas se dá pela grande influência desses microrganismos sobre as características sensoriais do queijo. O trabalho realizado por Lunardi *et al.* (2021) indica a importância da microbiota natural do leite e sua capacidade de utilizar de substratos alternativos como fonte de nutrientes e que gêneros como *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* são capazes de inibir o crescimento de bactérias indesejáveis ao produzir substâncias antimicrobianas. As bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas atuam como inibidores de microrganismos patogênicos, contribuindo com a vida útil do produto (ANTONIO; BORELI, 2020).

6 CONCLUSÃO

Ambos os queijos apresentaram redução na umidade ao longo da maturação. A adição de 1% de quitosana à massa do queijo Colonial artesanal não interferiu na umidade durante os 45 dias de maturação em relação às amostras controle, visto que não houve diferença significativa entre as amostras em nenhum dos períodos avaliados. Da mesma forma, esta concentração de quitosana não interferiu na acidez dos queijos.

Nas condições avaliadas, não foi possível determinar se a concentração de quitosana estudada interferiu no controle de *Staphylococcus* coagulase positiva, pois todas as amostras apresentaram baixa contagem para esse microrganismo. Os valores baixos para as contagens nessa análise são desejados pelos produtores de queijos artesanais, pois retratam a adoção das Boas Práticas de Fabricação e Boas Práticas Agropecuárias.

A ação de 1% de quitosana incorporada à massa no controle de coliformes totais não foi satisfatória, visto que, após 45 dias de maturação, a contagem das amostras com quitosana foi maior que a das amostras controle. Não foi possível determinar a influência da quitosana na contagem de coliformes termotolerantes devido à baixa contagem em todas as amostras nos quatro períodos avaliados. Nesta concentração de quitosana não houve alteração das contagens de bactérias ácido-láticas nos queijos.

Todas as amostras apresentaram contagem de coliformes totais acima do permitido pela legislação nos quatro períodos avaliados. No entanto, considerando que esta análise não é mais exigida para queijos nos novos padrões microbiológicos para alimentos da Anvisa, todas as amostras estavam aptas ao consumo, pois não apresentaram coliformes termotolerantes e *Staphylococcus*.

O efeito antimicrobiano da quitosana precisa ser mais estudado, visto que é uma substância natural e abundante no meio-ambiente. Como trabalhos futuros, sugere-se a avaliação da influência da quitosana em queijo Colonial artesanal inoculado com quantidade conhecida e padronizada de *Staphylococcus* spp. Além disso, é importante também avaliar as características sensoriais e de textura dos queijos com quitosana.

REFERÊNCIAS

- AHMAD SHIEKH, R. *et al.* Chitosan as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits. **Food Science and Technology Research**, v. 19, n. 2, p. 139–155, 2013.
- ALTIERI, C. *et al.* Use of Chitosan to Prolong Mozzarella Cheese Shelf Life. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 8, p. 2683-2688, 2005.
- ANTONELLO, L.; KUPKOVSKI, A.; CASTRO BRAVO, C. Qualidade microbiológica de queijos coloniais comercializados em Francisco Beltrão, Paraná. **Revista Thema**, [S. l.], v. 9, n. 1, 2012. Disponível em: <<https://periodicos.ifsul.edu.br/index.php/thema/article/view/76>>. Acesso em: 07/2021.
- ANTONIO, M. B.; BORELLI, B. M. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis** (21st ed.). Gaithersburg: AOAC International. 2019.
- APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA. 2015.
- ARAÚJO, R. M. S. **Pesquisa de coliformes totais e coliformes termotolerantes em queijos tipo coalho produzidos com leite cru na região do Agreste Paraibano**. 2017. 12 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.
- AZEVEDO, V. V. C. *et al.* Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27–34, 2007.
- BARROS, D. **Quitosana como cobertura e incorporada em queijo de coalho: influência de viabilidade de *Staphylococcus aureus* e no controle de qualidade**. 2017. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2017.
- BARROS, D. *et al.* Queijo de coalho com quitosana incorporada e como revestimento: efeito na viabilidade de *Staphylococcus aureus* e aceitação sensorial. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 6, suplemento 3, p. 3477-3492, 2019.
- BELOTI, V. **Leite: obtenção, inspeção e qualidade**. Londrina: Planta, 2015.
- BENINCÁ, T. *et al.* Análise das boas práticas de fabricação na qualidade microbiológica de queijo colonial artesanal. **7º Simpósio de Segurança Alimentar**. Rio Grande do Sul. 2020. Disponível em: <http://schenautomacao.com.br/ssa7/envio/files/trabalho3_13.pdf>. Acesso em 07/2021.

BORDINI, F. W. *et al.* Avaliação microbiológica de queijo tipo colonial mediante presença ou ausência de certificação comercial no Sul do Brasil. **Revista brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 14, p. 3212-3227, 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos prontos para oferta ao consumidor**. Brasília, DF, 2019a. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>>. Acesso em 07/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 331, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação**. Brasília, DF, 2019b. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em 07/2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. **Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, que disciplina a fiscalização e a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Brasília, DF, 2017. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 10/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. **Regulamenta o disposto no art. 10-A da Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, que dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal**. Brasília, DF, 2019c. Disponível em <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-9918-de-18-de-julho-de-2019-198615217>>. Acesso em 03/2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 07 de agosto de 2013. **Regulamenta o tempo mínimo de maturação para queijos produzidos a partir de leite cru**. Brasília, DF, 2013. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em 10/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. **Estabelece como oficiais os métodos constantes do Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/29896222/do1-2018-07-13-instrucao-normativa-n-30-de-26-de-junho-de-2018-29896212>. Acesso em 08/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Lei Federal nº 13.860, de 18 de julho de 2019**. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. Brasília, 2019d. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato20192022/2019/lei/L13860.htm>. Acesso em: 11/2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 73, de 23 de dezembro de 2019. **Estabelece, em todo o território nacional, o Regulamento Técnico de Boas Práticas Agropecuárias destinadas aos**

produtores rurais fornecedores de leite para a fabricação de produtos lácteos artesanais, necessárias à concessão do selo ARTE, na forma desta Instrução Normativa e do seu Anexo. Brasília, DF, 2019e. Disponível em <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-73-de-23-de-dezembro-de-2019-235851288>>. Acesso em 03/2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos em anexo.** Brasília, DF, 1996. Disponível em <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>. Acesso em 06/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** jan 2018. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em 06/2021.

BRAZEIRO, F. S. G. *et al.* Atividade antimicrobiana de filmes a base de gelatina e quitosana contra *Staphylococcus aureus*. In: SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – SIEPE. 10., 2018, Santana do Livramento. **Anais [...]**. Rio Grande do Sul: UNIPAMPA. 2018.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; BADARÓ, A. C. L. **Segurança alimentar na produção de queijo Colonial artesanal.** Francisco Beltrão: Grafisul, 2019.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; BADARÓ, A. C. L. Dilemas da produção de queijo Colonial artesanal do Sudoeste do Paraná. **Faz Ciência**, v. 23, n. 37, p. 108-124, 2021.

CASTRO-CISLAGHI, F.P. *et al.* **Mapeamento dos produtores e aspectos de qualidade do queijo Colonial artesanal da região Sudoeste Paranaense.** In: SEMINÁRIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA DA REGIÃO SUL, 37., 2019, Florianópolis. Florianópolis: UFSC, 2019. 6 p. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/199054>>. Acesso em 10/2019.

COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCE (CALs). **Coliform bactéria – Indicators in Food & Water.** Milk and Quality Improvement Program. Cornell University. 2021. Disponível em <<https://foodsafety.foodscience.cornell.edu/sites/foodsafety.foodscience.cornell.edu/files/shared/Coliform%20Fact%20Sheet%20v1.pdf>>. Acesso em 03/2021.

DA SILVA, F. *et al.* Qualidade microbiológica e físico-química de queijos coloniais com e sem inspeção, comercializados no Sudoeste do Paraná. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 33, n. 2, 2015.

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

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

EBADI, Z. *et al.* The shelf life extension of refrigerated *Nemipterus japonicus* fillets by chitosan coating incorporated with propolis extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 139, p. 94–102, 2019.

ECKERT, R. G. WEBBER, M. Controle de qualidade microbiológico de queijos maturados comercializado na feira do pequeno produtor da cidade de Cascavel-PR. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 252/253, p. 80-85, 2016.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2019**. Brasília. 2019. Disponível em <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/198698/1/Anuario-LEITE2019.pdf>>. Acesso em 10/2019.

EMBRAPA. **Anuário Leite 2021**. Brasília. 2021. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>> Acesso em 07/2021.

FEITOSA, T. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162–165, 2003.

FONSECA, A. C. M. **Processos de obtenção e caracterização físico-química de quitinas e quitosanas extraídas dos rejeitos da indústria pesqueira da região de Cananéia - SP**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

FRANCO, P. C. I. *et al.* Atividade antimicrobiana e caracterização de filmes de amido de mandioca/quitosana, reforçados com fibras de cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p.8766-8779, 2020.

FUENTES FANEGAS, M. *et al.* Capacidad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas autóctonas aisladas de queso doble crema y quesillo colombiano. **Biotechnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**, v. 15, n. 1, p. 45–55, 2017.

GARCIA, J. K. S. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 2, p. 58-65, 2016.

GOY, R. C.; BRITTO, D. de; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros**, São Carlos, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010414282009000300013&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 10/2019.

GUERRA-SÁNCHEZ, M. G. *et al.* Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 93, n. 1, p. 18–22, 2009.

HASHEMINEJAD, N.; KHODAIYAN, F. The effect of clove essential oil loaded chitosan nanoparticles on the shelf life and quality of pomegranate arils. **Food Chemistry**, v. 309, p. 125520, 2019.

IDE, L. P. DE A.; BENEDET, H. D. Contribuição Ao Conhecimento Do Queijo Colonial Produzido Na Região Serrana Do Estado De Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 6, p. 1351–1358, 2001.

JOHLER, S.; ZURFLUH, K.; STEPHAN, R. Tracing and inhibiting growth of *Staphylococcus aureus* in barbecue cheese production after product recall. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3345–3350, 2016.

JORDAN, K. *et al.* Microbes versus microbes: Control of pathogens in the food chain. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 15, p. 3079–3089, 2014.

KARAGÖZ, Ş.; DEMIRDÖVEN, A. Effect of chitosan coatings with and without *Stevia rebaudiana* and modified atmosphere packaging on quality of cold stored fresh-cut apples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 108, p. 332–337, 2019.

LAMPERT, S.; AGNOL, V. D. **Caracterização de queijo colonial obtido a partir de leite cru e pasteurizado produzidos no município de São Miguel do Oeste - SC.** 2019. 72 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Tecnologia em Alimentos, Instituto Federal de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, 2019.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Biopolímero Funcional com Potencial Industrial Biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672–678, 2009.

LIMA, A. S. **Bioatividade de quitosana na inibição da microbiota mesófila em queijo de coalho.** 2018. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2018.

LIMA, B. B.; LEAL, M. C. **Parâmetros indicadores de qualidade em queijos artesanais comercializados em Castro – PR.** 2017. 30 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2017.

LUNARDI, A. *et al.* Non Starter Lactic acid bacteria (NSLAB): a challenge to the cheese industry. **Brazilian Journal Of Development**, v. 7, n. 3, p. 26383-26409, 2021. Disponível em:
<https://www.researchgate.net/publication/349439767_Bacterias_acido-laticas_nao_iniciadoras_NSLAB_Um_desafio_a_industria_do_queijo>. Acesso em: 06 jul. 2021.

MAIA, G. M. I.; **Estudo dos aspectos tecnológicos e sensoriais do queijo de coalho com quitosana.** 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

MESQUITA, A. A. *et al.* *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*: Prevalence, resistance to antimicrobials, and their relationship with the milk quality of

dairy cattle herds in Minas Gerais state, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 5, p. 308–316, 2019.

METZ, M.; SHEEHAN, J.; FENG, P.C.H. Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses – A literature review. **Food Microbiology**, v. 85, 103283, 2020.

MULINARI, E. L.; ROSOLEN, M. D.; ADAMI, F. S. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado produzido no Rio Grande do Sul. **Revista Caderno Pedagógico**, v. 14, n. 1, p. 28-35, 2017.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; TONIAL, I. B. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 2, p. 521-523, 2012.

OLIVEIRA, P. G. **Bioatividade de quitosana como cobertura comestível em queijo de coalho na inibição de *Listeria monocytogenes***. 2015. 106 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2015.

PEREIRA, R. B. M. **Influência da cobertura de quitosana nas características físico-químicas, sensoriais e na inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal**. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Ciências Domésticas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

PEREIRA, R. B. M. *et al.* Quitosana em queijo Minas frescal: ação antibacteriana sob cepa patogênica e nos atributos sensoriais. **Brazilian Journal of Health**, v. 1, n. 2, p. 342-363, 2018.

PEREIRA, D. A. **Efeito de diferentes condições de maturação nas características de queijo Minas artesanal**. 100f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2019.

PEREIRA, F. A. O. **Queijo colonial artesanal do Sudoeste do Paraná: identificação de compostos voláteis e alterações químicas e físicas durante a maturação**. 2021. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Tecnologia de Alimentos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2021.

PETER, M.G. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 629–640, 1995.

QI, L. *et al.* Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Research**, v. 339, n. 16, p. 2693–2700, 2004.

QUEIROZ, M. M. *et al.* Hygienic-sanitary quality of Minas fresh cheese sold in the city of Botucatu, São Paulo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 84, n. 0, p. 1–6, 2018.

RIBAS, M. M. **Avaliação microbiológica de queijos coloniais produzidos no município de Roque Gonzales, Rio Grande do Sul**. 2019. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas, Universidade Federal da Fronteira Sul, Cerro Largo, 27.

SANTOS, A. J. P. **Efeito do período de maturação de queijos sobre a microbiota deteriorante e *Listeria monocytogenes***. 2016. 36 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2016. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/bitstream/10482/21364/1/2016_AndersonJoaquimPereiraDosSantos.pdf>. Acesso em: 29 jun. 2021.

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

SEBRAE. **Queijos Nacionais**. Estudos de Mercado SEBRAE/ESPM. set, 2008.

SILVA, A. S. *et al.* Inativação de patógenos em carne bovina fresca revestida com monocamada comestível de quitosana. **Magistra**, v. 31, p.460-464, 2020.

SILVA, A. S. *et al.* Efeito de revestimento com quitosana na contaminação de carnes bovina fresca comercializadas em feira livre. **Revista Ciência Agrônômica**, v.50, n. 1, p.38-43, jan/mar 2019.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5. ed. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.

SILVEIRA, P. R. C. DA; TREVISAN, A. P. A produção e comercialização de queijos coloniais: dinâmicas de validação social da qualidade. **In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL**, 45., 2007, Londrina, p. 1–13, 2007.

SOBRAL, D. *et al.* Principais defeitos em queijo Minas artesanal: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 2, p. 108-120, 2017.

STEINBACH, J. *et al.* Understanding consumer, consumption, and regional products: A case study on traditional colonial-type cheese from Brazil. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 25, 2021.

TAVARES, A. B. *et al.* Queijo artesanal produzido no sul do Rio Grande do Sul: Avaliação físico-química, microbiológica e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *Staphylococcus coagulase positiva*. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-10, 2019.

TOKATLI, K.; DEMIRDÖVEN, A. Effects of chitosan edible film coatings on the physicochemical and microbiological qualities of sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Scientia Horticulturae**, v. 259, p. 108656, 2020.

VIÇOSA, G. N. *et al.* Impact of co-cultivation with *Enterococcus faecalis* over growth, enterotoxin production and gene expression of *Staphylococcus aureus* in broth and fresh cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 308, p. 108291, 2019.

WAGNER, S. A. *et al.* Parâmetros microbiológicos do leite e do queijo artesanal serrano dos Campos de Cima da Serra – RS em três períodos de maturação. **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 25.** Alimentação: a árvore que sustenta a vida. Gramado, 2016.

WANJALA, W.N.; NDUKO, J.M.; MWENDE, M.C. Coliforms contamination and hygienic status of milk chain in emerging economies. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 5, p. 3-10, 2018.

WESKA, R. F. *et al.* Obtenção De Quitosana a Partir De Carapaças De Siri. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 1, n. 1, p. 48-52, 2007.

ZHENG, L. Y.; ZHU, J. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527–530, 2003.