

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ -
CAMPUS LIMOEIRO DO NORTE
MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

LORENA LIGIA DE LIMA MONTEIRO OLIVEIRA

**AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
AFRICANIZADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO E SEU EFEITO EM QUEIJO
COALHO**

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2019

LORENA LIGIA DE LIMA MONTEIRO OLIVEIRA

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
AFRICANIZADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO E SEU EFEITO EM QUEIJO
COALHO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - *Campus* Limoeiro do Norte - CE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Mayara Salgado Silva

LIMOEIRO DO NORTE - CE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Instituto Federal do Ceará - IFCE

Sistema de Bibliotecas - SIBI

Ficha catalográfica elaborada pelo SIBI/IFCE, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48a Oliveira, Lorena Ligia de Lima Monteiro.

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
AFRICANIZADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO E SEU EFEITO EM QUEIJO COALHO /
Lorena Ligia de Lima Monteiro Oliveira. - 2019.

78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Federal do Ceará, Mestrado em Tecnologia de
Alimentos, Campus Limoeiro do Norte, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira.

Coorientação: Profa. Dra. Mayara Salgado Silva .

1. Apícolas. 2. Lácteos. 3. Antimicrobiano. I. Título.

CDD 664

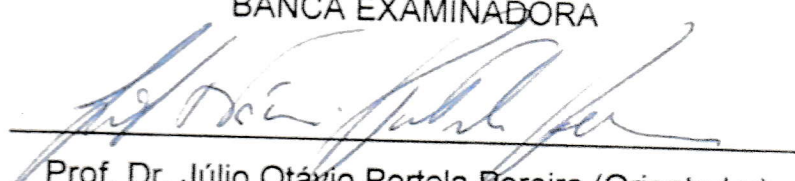
LORENA LIGIA DE LIMA MONTEIRO OLIVEIRA

AÇÃO ANTIMICROBIANA DA PRÓPOLIS PRODUZIDA POR ABELHAS
AFRICANIZADAS NO SEMIÁRIDO NORDESTINO E SEU EFEITO EM QUEIJO
COALHO

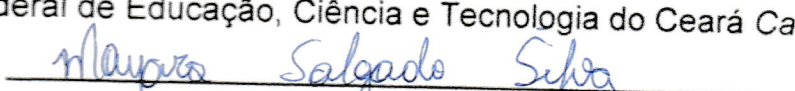
Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Tecnologia de Alimentos do
Instituto Federal de Educação, Ciência e
Tecnologia do Ceará - *Campus Limoeiro*
do Norte - CE, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos.

Data: 30 / 07 / 2019

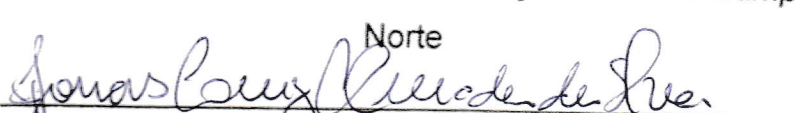
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira (Orientador)

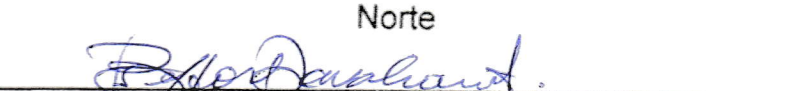
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus Sobral*


Prof. Dra. Mayara Salgado Silva (Coorientadora)

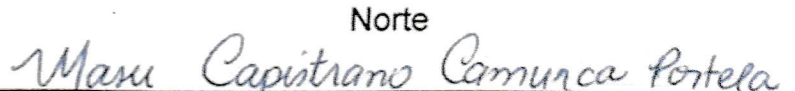
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus Limoeiro do*
Norte


Prof. Dr. Jonas Luiz Almada da Silva

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus Limoeiro do*
Norte


Prof. Dr. Antônio Belfort Dantas Cavalcante

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus Limoeiro do*
Norte


Prof. Dra. Masu Capistrano Camurça Portela

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará *Campus Sobral*

A Deus, dono de todas as coisas, a minha
amada família, mãe e esposo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado Deus, por tudo que tenho e sou, por ser fortaleza e me inspirar em todas as coisas. A minha mãezinha, Maria Santíssima, por interceder sempre por mim em todas as situações.

A minha amada mãe, Maria das Graças de Lima, pela educação que me destes, por ser a melhor torcedora e por em momento nenhum desistir de mim e dos meus sonhos. Ao meu amado esposo, amigo, irmão e principal motivador, Romario Silva Oliveira, por acreditar mais em mim do que eu mesma, por segurar “as pontas” nos momentos de choro e angústia, por seu zelo e amor para comigo.

A todos da minha família, que mesmo sem entender muito bem o que era esse tal de mestrado, ficaram orgulhosos e felizes. Aos meus amigos e irmãos de caminhada, de maneira especial ao Maurício e Rejane, que acompanharam mais de perto esse ciclo, pela torcida e orações.

Gratidão ao meu orientador Prof. Dr. Júlio Otávio Portela Pereira, que mesmo sabendo que eu estava meio perdida aceitou prontamente e embarcou nesse grande desafio. Obrigada pela paciência e palavras de conforto nos momentos difíceis. Eu fui tão agraciada por Deus, que ao invés de um pai ou uma mãe na pesquisa, ele me mandou os dois. Cada um com seu jeitinho, completamente diferente por sinal.

A “mãe”, Prof.(a) Dra. Mayara Salgado Silva foi a que esteve mais próxima, que acompanhou de perto os perrengues e que vibrou quando as coisas davam certo, como toda boa mãe. Ela mal sabe que muitas vezes não conseguia acompanhar o ritmo dela, meu Deus, que mulher incrível. Quero que saiba que o meu amor pela pesquisa aumentou e muito, graças a esse pequeno período que passei contigo. Sentirei falta de te lembrar das reuniões e de esperar para falar com a senhora depois de ter atendido seus “1999” bolsistas.

A banca examinadora composta pelo Prof. Dr. Jonas Almada, Prof. Dr. Antônio Belfort e a Profa. Dra. Masu Capistrano, por ter aceitado participar e por todas as considerações feitas, que com certeza serão necessárias e contribuirão para este trabalho.

Aos docentes deste curso de mestrado, que são incríveis. Minha admiração por cada um de vocês só aumentou. Não poderia deixar de fazer um agradecimento especial a melhor coordenadora da minha vida todinha, Renata

Chastinet Braga. Tenho muito orgulho de dizer que fiz parte de um mestrado no qual a senhora coordenava. Obrigada pelo cuidado com todos nós, pelas mensagens e palavras de apoio e motivação, por ajudar a lavar vidrarias, por nos acalmar nos momentos de desespero e nos fortalecer nos momentos de desânimo.

A todos os meus colegas do curso de mestrado, Cláudio, Josilene, Kivia, Bianca, Marla, Darciane, Samara e Fábila. Que dádiva de Deus ter vocês. Obrigada por muitas vezes emprestarem os ouvidos para os desabafos e por ajudarem no experimento da maneira que puderam.

A todos os técnicos e responsáveis pelos laboratórios, de forma especial ao Jorge, Kelbia, Mayra, Auriana e Juju, que estavam sempre de prontidão para ajudar no que fosse preciso. A todos os funcionários efetivos e terceirizados do *campus* Limoeiro do Norte, por cuidar tão bem de nós.

A todos os bolsistas de iniciação científica e voluntários, que Deus providenciou nos momentos que mais precisei. Mesmo sem ter bolsista, sempre aparecia uma mão amiga (Os Vitor's, Josy, Maico, Anielly, Daniela, dentre outros). Dividimos trabalhos em congressos, conversas e companhia. Aprendi muito com vocês.

A Lidiana e ao Prof. Rinaldo, pela ajuda com metodologias e materiais necessários a pesquisa. Ao professor Odério, por disponibilizar parte da própolis utilizada na pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo apoio e incentivo a pesquisa e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico - FUNCAP, pela concessão da bolsa.

A todos que não foram citados, mas que sabem da importância que têm na minha vida pessoal e profissional, muito obrigada.

*“Para tudo há um tempo, para cada coisa
há um momento debaixo dos céus”.*

(Eclesiastes 3, 1)

RESUMO

A contaminação em queijo coalho pode ocorrer no processamento, assim como no armazenamento e transporte. Dentre os principais microrganismos responsáveis, destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*. Visando o controle da proliferação de microrganismos indesejáveis, a indústria busca meios alternativos que auxiliam na conservação do produto. A utilização da própolis e seus extratos como conservantes naturais vem se destacando, tornando-se uma alternativa para esta problemática. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antimicrobiana de dois tipos de própolis produzidas por abelhas africanizadas no semiárido nordestino e seus efeitos sobre microrganismos em queijo coalho. Para tanto, foram elaborados diferentes tipos de extratos, a partir das amostras de própolis marrom e verde. Estes extratos foram submetidos à análises para a determinação do extrato seco total, sólidos solúveis, ceras, solubilidade em acetato de chumbo e hidróxido de sódio. Foram determinados ainda o teor de compostos fenólicos, flavonoides totais e atividade de oxidação. Para analisar o efeito inibitório dos extratos de própolis, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*. A Concentração Mínima Inibitória (CMI) foi determinada por meio da técnica de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços. Os extratos apresentaram efeito a partir de 0,25% para própolis verde e 1,0% para marrom. Desta forma, foi estabelecida uma concentração mínima comum (1,0%) para avaliar o efeito nos queijos. Verificou-se a eficiência de ambos os extratos sobre coliformes a 45 °C, e do extrato de própolis verde sobre *Staphylococcus spp.* Não foram observados efeitos sobre *Salmonella spp.* As análises físico-químicas e de composição centesimal mostraram que a utilização do extrato não interferiu de forma significativa nas características finais do produto. Por meio de um teste sensorial de comparação múltipla verificou-se que os extratos não interferiram nos atributos sabor e odor dos queijos. Acredita-se que os extratos de própolis podem servir como um importante agente antimicrobiano natural em queijos, trazendo inúmeros benefícios, tornando-se uma alternativa inovadora.

Palavras-chave: Apícolas. Lácteos. Antimicrobiano natural.

ABSTRACT

Contamination in rennet cheese can occur in processing as well as in storage and transportation. The main responsible microorganisms include: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. Aiming at controlling the proliferation of undesirable microorganisms, the industry looks for alternative means that help the conservation of the product. Using propolis and its extracts as natural preservatives has been highlighted becoming an alternative to this problem. Thus, the objective of this work is evaluate the antimicrobial action of two types of propolis produced by Africanized bees in the northeastern semiarid and their effects on microorganisms in rennet cheese. Different types of extracts were elaborated from the brown and green propolis samples. These extracts were analyzed for total dry extract, soluble solids, waxes, solubility in lead acetate and sodium hydroxide. The content of phenolic compounds, total flavonoids and oxidation activity were also determined. To analyze the inhibitory effect of propolis extracts, strains of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* were used. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by microdilution technique using 96-well microplates. The extracts showed effect from 0.25% for green propolis and 1.0% for brown. Thus, a common minimum concentration (1.0%) was established to assess the effect on cheese. It was found that the efficiency of both extracts on coliforms at 45 ° C and the green propolis extract on *Staphylococcus* spp. No effects on *Salmonella* spp. The physicochemical analysis and centesimal composition showed that using the extract did not significantly affect the final characteristics of the product. Through a multiple comparison sensory test it was verified that the extracts did not interfere in the cheese taste and odor attributes. It is believed that propolis extracts can serve as an important natural antimicrobial agent in cheese, bringing numerous benefits, making it an innovative alternative.

Keywords: Beekeepers. Dairy. Natural Antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de processamento do queijo coalho.....	19
Figura 2 - Queijo coalho	20
Figura 3 - Coloração de amostras de própolis coletadas no Ceará.....	25
Figura 4 - Parede celular das bactérias Gram positiva e Gram negativa	27
Figura 5 - Escala e suspensão de bactérias	35
Figura 6 - Microplaca de 96 poços	36
Figura 7 - Acompanhamento dos sólidos solúveis durante o preparo dos extratos .	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas do local de coleta das própolis.....	30
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos dos extratos de própolis	41
Tabela 3 - Teor de flavonoides, compostos fenólicos e atividade de oxidação	43
Tabela 4 - Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos extratos	47
Tabela 5 - Contagem de bactérias após tratamento com extrato de própolis Marrom	50
Tabela 6 - Contagem de bactérias após tratamento com extrato de própolis Verde.	51
Tabela 7 - Resultados referentes ao pH e acidez titulável das amostras de queijo .	54
Tabela 8 - Composição centesimal dos queijos analisados	56
Tabela 9 - Análises microbiológicas dos extratos.....	58
Tabela 10 - Análise sensorial das amostras de queijo com extrato de própolis	59

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 JUSTIFICATIVA.....	15
3 OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
4.1 Histórico do queijo	17
4.1.1 Queijo coalho.....	18
4.1.1.1 Microrganismos contaminantes em queijo coalho	21
4.1.2 Controle microbiano em queijos.....	22
4.2 Apicultura no Brasil	23
4.2.1 Própolis.....	24
4.2.2 Extrato de própolis.....	26
4.2.3 Própolis em alimentos	28
5 MATERIAL E MÉTODOS	30
5.1 Tipo de estudo, local e período.....	30
5.2 Obtenção das amostras de própolis e elaboração dos extratos	30
5.3. Análises de caracterização dos extratos	31
5.3.1 Teor de sólidos solúveis.....	31
5.3.2 Extrato seco total	31
5.3.3 Ceras	32
5.3.4 Solubilidade em acetato de chumbo	32
5.3.5 Solubilidade em hidróxido de sódio.....	33
5.3.6 Atividade de oxidação.....	33
5.3.7 Determinação do teor de compostos fenólicos.....	33

5.3.8 Determinação de flavonoides totais	34
5.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos	34
5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre queijo coalho..	36
5.6 Análises físico-químicas e composição centesimal dos queijos	37
5.7 Análises microbiológicas	37
5.8 Análise sensorial e aspectos éticos	38
5.9 Análise estatística	38
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Caracterização dos extratos de própolis	40
6.2 Bioatividade dos extratos de própolis.....	43
6.3 Atividade antimicrobiana.....	47
6.3.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)	47
6.3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos sobre queijo coalho.....	49
6.4 Análises físico-químicas e composição centesimal dos queijos	53
6.5 Análises Microbiológicas	57
6.6 Análise sensorial.....	58
7 CONCLUSÃO	61
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO A - CERTIFICAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA	72
APÊNDICE A - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES	73
APÊNDICE B - TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA	74
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	75

1 INTRODUÇÃO

O queijo coalho é o produto obtido por coagulação do leite pelo uso do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, podendo ser complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas. É um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variando de 35,0% a 60,0% (BRASIL, 2001a).

Produto popular na região nordeste e considerado o queijo mais tradicional, tem como matéria prima principal o leite, que muitas vezes é utilizado na forma *in natura* (PEREIRA et al., 2017). Esse leite em sua grande parte não recebe tratamento adequado desde a ordenha ao transporte, não atendendo as normas básicas de higiene, favorecendo assim a contaminação, o que pode acabar comprometendo a qualidade do produto final (DANTAS, 2012).

A contaminação pode ocorrer desde o processamento, mas também durante seu armazenamento e transporte. Vários estudos apresentam dados relevantes sobre a contaminação de queijo coalho, onde a contagem de microrganismos, sejam eles deteriorantes ou patogênicos, excedem os limites estabelecidos pela legislação. Dentre os principais microrganismos encontrados destacam-se *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* e *Escherichia coli*. A contaminação microbiológica de queijo coalho apresenta destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de poder causar doenças veiculadas por alimentos (BORGES et al., 2008; SANTANA et al., 2008; PEREIRA et al., 2017).

Visando o controle da proliferação de microrganismos indesejáveis, a indústria adiciona aos queijos diferentes substâncias, que além de prevenir o surgimento desses microrganismos, auxiliam na conservação do produto. Diversas estratégias, por sua vez, vêm sendo criadas para substituir esses produtos por conservantes naturais, que são compostos produzidos por organismos vivos. Dentre os conservantes naturais, a própolis e seus extratos vêm se destacando (KAMEYAMA et al., 2008).

A própolis, substância constituída principalmente de resina, ceras e óleos essenciais, possui dentre suas inúmeras propriedades, a atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana (OSÉS et al., 2016). Neste sentido, tem-se observado a eficiência do extrato de própolis como agente antimicrobiano contra uma série de

microrganismos (KAMEYAMA, et al., 2008). Isso possibilita sua utilização como alternativa inovadora, o que traz benefícios tanto para a indústria de alimentos como ao consumidor, além de favorecer a apicultura e a inserção dos produtos das abelhas no mercado (ALVES; KUBOTA, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

O queijo é um alimento de fácil aceitação e de utilização variada. Do ponto de vista nutricional é fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, cálcio, zinco, potássio, ferro, fósforo, ácido linoleico e de outros ácidos graxos (OPAS, 2009). Essas e outras vantagens garante ao alimento uma considerável relevância econômica e social, de forma especial na Região Nordeste.

Dentre os problemas enfrentados pela indústria, de maneira geral, estão a contaminação e proliferação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, relativamente comum na produção de queijos. Para solucionar parcialmente o problema, são adicionadas ao produto uma série de substâncias, que visam controlar essa proliferação, bem como aumento da vida útil, da funcionalidade, dentre outros.

Atualmente, tem-se observado a busca constante dos consumidores por alimentos naturais e que lhe tragam algum benefício extra à saúde, contribuindo na manutenção da qualidade de vida. Desta forma, vem se destacando o uso de conservantes naturais, que além de auxiliar na preservação das características do produto por um tempo maior, oferece algum benefício ao consumidor. Dentre os conservantes naturais encontra-se a própolis, produto desenvolvido pelas abelhas.

A própolis se destaca por sua funcionalidade e ampla aplicabilidade devido a sua ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, dentre outras, sendo muito utilizada na indústria de alimentos, atuando como conservante natural e fonte de compostos bioativos, melhorando a vida útil dos alimentos e exercendo atividade funcional quando consumida (MELLO; PETRUS; HUBINGER, 2010; OSÉS et al., 2016). É importante destacar ainda que a utilização desse e outros produtos oriundos das abelhas estimularia a apicultura na região.

Capaz de causar impactos econômicos e sociais positivos, a apicultura pode contribuir de forma significativa para a preservação dos ecossistemas (MANTILLA et al., 2012). Além de auxiliar na inserção de produtos apícolas no mercado, o trabalho possibilitará o estudo e a utilização da própolis como conservante em queijos, atuando como antimicrobiano natural, estendendo a vida de prateleira do produto.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antimicrobiana de dois tipos de própolis produzidas por abelhas africanizadas no semiárido nordestino e seus efeitos sobre microrganismos em queijo coalho.

3.2 Objetivos específicos

- Elaborar dois diferentes extratos, a partir da própolis marrom e verde produzidas no semiárido;
- Caracterizar os extratos elaborados;
- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos de própolis sobre microrganismos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos no queijo coalho;
- Caracterizar o queijo por meio de análises físico-químicas e composição centesimal;
- Avaliar a qualidade microbiológica do produto;
- Analisar os efeitos da aplicação dos extratos na qualidade sensorial dos queijos coalho mediante teste de comparação múltipla.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Histórico do queijo

O queijo é um derivado lácteo que está entre os alimentos mais antigos da humanidade. O alimento surgiu há vários anos antes de Cristo, mas não se sabe ao certo a data da sua origem. Os egípcios estão entre os primeiros povos que criaram gado para uso do leite e conseqüentemente do queijo, tornando-se fonte importante de sua alimentação. Tumbas egípcias apresentam murais que mostram a fabricação de queijo no antigo Egito, além de relatos bíblicos do antigo testamento (DANTAS, 2012).

São várias as teorias que a literatura descreve a respeito do surgimento do queijo. Uma delas coincide com a domesticação de cabras e ovelhas, onde os pastores observaram que o leite acidificava, separando-se em massa e soro. A coalhada ácida gerada possuía alguma estabilidade ao armazenamento e quando desidratada e salgada essa estabilidade aumentava consideravelmente (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009). O homem percebeu a alta perecibilidade do leite e procurou meios de conservá-lo. Outra teoria aponta que, acidentalmente um viajante ao tentar armazenar o leite em recipientes feitos com couro do estômago de carneiro parcialmente seco, o descobriu coagulado, sem soro, resultante da reação entre o leite e o couro. Isso serviu ainda para o desenvolvimento de técnicas usadas nos dias atuais, em que os elementos nutritivos do leite podem ser preservados e transformados em vários alimentos sólidos (DANTAS, 2012; PEREIRA, 2015).

Com o passar do tempo, a massa branca de sabor agradável foi colocada em fôrmas, adicionada de outros ingredientes e maturada, resultando no queijo (ANDRADE, 2006). Durante o Império Romano, a produção de queijo alcançou um alto padrão e podia-se encontrar um espaço nas casas somente para a produção e maturação de queijos, que eram servidos à nobreza durante os banquetes ou aos soldados que se encontravam nas fronteiras do império (PERRY, 2004).

Com o advento dos estados feudais e mosteiros, a fabricação de queijos foi realmente estabelecida e os conhecimentos adquiridos eram passados de geração em geração. Naquele período, as comunidades eram muito autossuficientes, havia pouco vínculo e conseqüentemente pouca troca de

informações entre elas, e isso explicaria o fato de existir essa grande variedade de queijos (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Muitas das variedades que se tem hoje no mercado derivam de alguma mudança não proposital durante o processamento, como a composição do leite, microbiota endógena, espécie e raça do animal ou ainda por conta de alguma mudança inesperada durante a produção e estocagem, como o crescimento de mofos ou outros microrganismos. Essas mudanças sofreram alterações ao longo dos anos e por provocarem mudanças desejáveis foram incorporadas na fabricação de muitos queijos (PERRY, 2004; PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

No Brasil, o consumo de queijo iniciou-se com a chegada dos portugueses, que consumiam o produto em grande escala (DANTAS, 2012). Com a chegada do primeiro rebanho de bovinos no país, deu-se início a produção de queijo datada por volta do ano de 1536. No Nordeste está relacionado à instalação das primeiras fazendas (ANDRADE, 2006). É nesta região também que o queijo coalho é mais conhecido e apreciado. O mercado lácteo brasileiro ainda apresenta um grande potencial de crescimento.

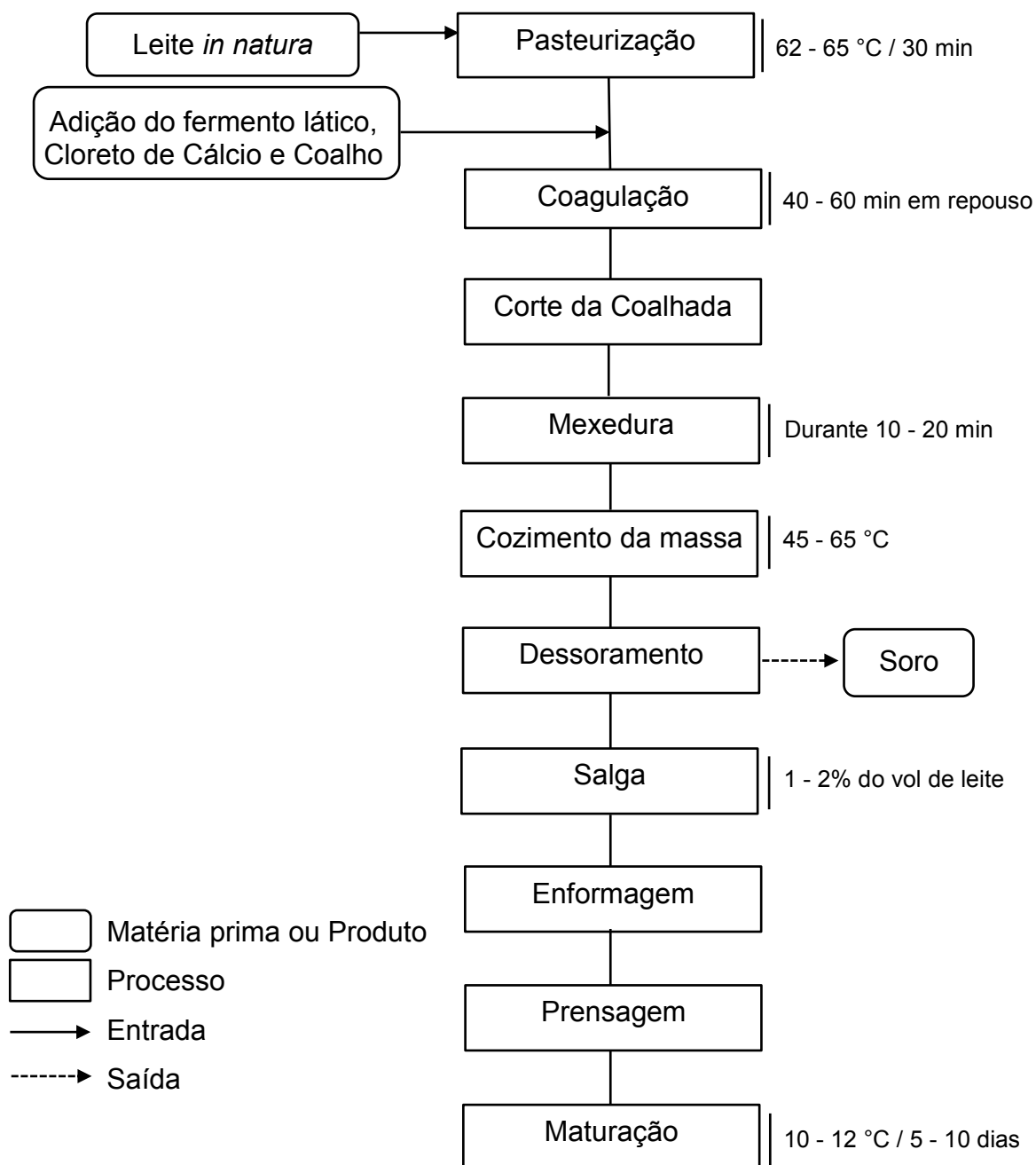
4.1.1 Queijo coalho

O queijo coalho é obtido por meio da coagulação do leite pelo coalho podendo ser completada ou não pela ação de bactérias lácticas. O coalho é uma mistura de enzimas responsáveis por esta coagulação, uma das primeiras etapas da produção de queijo. Antigamente fazia-se uso do coalho naturalmente presente no estômago, salgado e seco, de animais ruminantes. Hoje essa prática foi substituída pelo uso do coalho industrial, que é o coalho que foi extraído, filtrado e purificado. O queijo coalho é considerado de média a alta umidade, pesa em torno de 1,0 Kg a 5,0 Kg e seu formato na maioria das vezes é retangular, podendo se apresentar de outras formas (CAVALCANTE et al., 2007; SANTANA et al., 2008; FERNANDES, 2013).

O queijo coalho é produzido há mais de 150 anos, estando relacionado às atividades pecuaristas e a transmissão dos saberes de geração em geração para que a tradição fosse mantida. O queijo pode ser produzido tanto de forma artesanal como industrializado, porém grande parte da produção deste alimento no Nordeste

se dá em pequenas e médias queijarias, tendo em vista a facilidade na produção e não sendo necessário o uso de equipamentos caros (OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2018). A peculiaridade do seu sabor e consistência o coloca entre os principais queijos artesanais que vêm ganhando espaço em outras regiões do país (DANTAS, 2012). A figura 1 apresenta um fluxograma de processamento deste produto.

Figura 1 - Fluxograma de processamento do queijo coalho



Fonte: Adaptado de Nassu (2006).

Considerada tradicional, a produção no Ceará também se dá em indústrias de pequeno e médio porte, situadas em sua grande maioria nas mesorregiões do Vale do Jaguaribe e Sertões Cearenses. Muitas dessas empresas funcionam sem fiscalização nenhuma. Por ser um produto muito difundido, o queijo coalho (Figura 2), pode ser encontrado à venda nas próprias unidades produtoras, em feiras, padarias, confeitarias, supermercados, restaurantes, dentre outros estabelecimentos (CARVALHO, 2007).

Figura 2 - Queijo Coalho



Fonte: FUNCAP (2016).

Um empecilho que ainda pode ser verificado é a ausência de critérios de qualidade para a matéria-prima, bem como para as técnicas de processamento, e isso permite a chegada de produtos com baixa qualidade no mercado, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos padrões do produto (NASSU, 2006; SOUSA et al., 2014). Todavia, a criação do selo ARTE pode induzir os produtores a se atentarem a qualidade higiênico-sanitária dos seus produtos, garantindo o selo e ampliando sua produção, venda e lucro.

Durante muitos anos, os queijos e outros produtos produzidos artesanalmente tinham sua comercialização limitada ao município ou estado em que foram produzidos. Com a criação da lei nº 13.680 em junho de 2018, os produtos produzidos de forma artesanal, com características próprias e métodos tradicionais, passaram a ter sua venda permitida em diferentes estados. Para tanto deverão ser empregadas boas práticas agropecuárias e de fabricação, além de serem submetidos a uma fiscalização, que fica sobre a responsabilidade dos órgãos de

saúde pública dos Estados e do Distrito Federal. O produto será identificado mediante a presença do selo ARTE (BRASIL, 2018).

4.1.1.1 *Microrganismos contaminantes em queijo coalho*

Estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo coalho apresentam resultados significativos a respeito da presença de microrganismos patogênicos e deterioradores, que em muitos casos excedem o que é estabelecido pela legislação vigente, podendo causar infecção, intoxicação ou toxinfecções, trazendo riscos à saúde do consumidor (OLIVEIRA et al., 2010; SOUSA et al., 2014; PEREIRA et al., 2017). De forma geral, alimentos produzidos artesanalmente, como é a realidade de muitos produtores de queijo coalho, tem grande possibilidade de se apresentarem contaminados (OLIVEIRA et al., 2010).

Essa contaminação pode ser oriunda do uso de matérias-primas de fontes não seguras, de utensílios contaminados, do ambiente inapropriado para produção e armazenamento, da comercialização em condições inadequadas, dentre outros. Além disso, o queijo, por suas características, acaba se tornando uma excelente fonte de nutrientes para o desenvolvimento microbiano, sobretudo para as bactérias mesófilas aeróbicas, coliformes totais, termotolerantes e a *Escherichia coli* (OLIVEIRA et al., 2010; SILVA, 2018).

As bactérias aeróbias mesófilas são capazes de se desenvolver em temperaturas em torno de 35 - 37 °C. Elas estão relacionadas à qualidade do alimento, tendo em vista que são predominantes onde há falta de condições básicas de higiene ou conservação inadequada. A presença de coliformes pode ser oriunda de contaminação durante o beneficiamento, armazenamento e transporte. Os coliformes totais podem ser utilizados como indicador de higiene, enquanto os termotolerantes e *E. coli* indicam contaminação de origem fecal. A presença de microrganismos do grupo coliformes é frequentemente observada em queijo coalho (SANTANA, 2008; OLIVEIRA et al., 2010; SILVA et al., 2018).

Além desses microrganismos, destacam-se também a *Salmonella spp.* e o *Staphylococcus aureus*. A *Salmonella spp.*, é encontrada no trato gastrointestinal de animais e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água. É facilmente observada em queijo coalho e pode causar toxinfecções alimentares

quando ingerida. O *Staphylococcus aureus*, por sua vez, é um dos patógenos mais comuns. A incidência deste microrganismo em queijo coalho é alta e em muitos casos tornam o produto impróprio para o consumo por exceder os níveis de contaminação estabelecidos pela legislação. A enterotoxina estafilocócica presente em alimentos contaminados pelo microrganismo pode causar intoxicação. Devido a sua termoestabilidade, é capaz de resistir a certos tratamentos térmicos, como a pasteurização, podendo causar uma recontaminação após o tratamento térmico, o que a torna ainda mais perigosa (BORGES et al., 2008; SANTANA, 2008).

Tendo em vista que o consumo do queijo na maioria das vezes se dá sem nenhum tipo de tratamento térmico é necessário que se atente às condições de higiene durante o preparo, bem como na conservação do mesmo e que haja também a utilização de meios alternativos para evitar o crescimento desses microrganismos (SILVA et al., 2018; CARVALHO, 2007).

4.1.2 Controle microbiano em queijos

Para controlar o desenvolvimento de microrganismos, sobretudo os patogênicos e os deteriorantes, a indústria utiliza várias técnicas de conservação que além de melhorar o alimento nesse aspecto ainda lhe confere maior qualidade, vida de prateleira, bem como aceitação no mercado. Ao longo dos anos, muitas das técnicas já utilizadas, como os tratamentos térmicos com altas e baixas temperaturas, sofreram alterações e outras foram desenvolvidas para auxiliar na produção de alimentos mais seguros e agradáveis ao paladar (AZEREDO; BRITO, 2012; BINOTI; RAMOS, 2015).

As técnicas utilizadas para a conservação de alimentos visam principalmente criar um ambiente desfavorável ao crescimento microbiano, e em alguns casos pode causar a morte do microrganismo. Pode ser utilizada uma única ou ainda técnicas combinadas para que se tenha uma maior eficácia (AZEREDO; BRITO, 2012)

Dentre as diversas técnicas existentes as que se dão pelo uso do frio, como refrigeração e congelamento, são bem conhecidas e utilizadas. Dentre suas vantagens destaca-se a inibição ou retardo da multiplicação dos microrganismos. A utilização do calor também é um método amplamente difundido. As altas

temperaturas atuam destruindo os microrganismos, bem como interferem negativamente nos substratos necessários para o desenvolvimento microbiano. O controle de oxigênio e água, o uso de aditivos e a irradiação também são técnicas utilizadas na conservação de alimentos que em sua maioria têm como princípio o controle microbiano (LEONARDI; AZEVEDO, 2018).

Várias limitações podem estar associadas às técnicas utilizadas, como por exemplo, danos à composição nutricional. Uma das mais importantes, por sua vez, são as alterações que estas podem causar às características sensoriais do produto (AZEREDO; BRITO, 2012; BINOTI; RAMOS, 2015).

A exigência dos consumidores por alimentos mais frescos e naturais vem despertando o interesse por novas metodologias que além de garantir a segurança do alimento, principalmente em termos de conservação, são diferenciadas dos métodos tradicionais e desta forma acabam atraindo o público cada vez mais preocupado com essas questões (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008; AZEREDO; BRITO, 2012). Dentre os métodos, a utilização de antimicrobianos naturais vem se destacando por sua natureza segura e mais saudável (PEREIRA et al., 2018). A própolis, produto amplamente desenvolvido na apicultura brasileira, é um exemplo de substância que pode ser utilizada como antimicrobiano natural por suas várias propriedades, podendo ser uma alternativa para aplicação em uma variedade de alimentos.

4.2 Apicultura no Brasil

Durante muito tempo, as abelhas responsáveis pela produção de méis no Brasil eram da tribo *Meliponini*, que são abelhas sem ferrão nativas do país. Esta atividade é hoje conhecida como meliponicultura (SILVA, 2014). Em 1839, as abelhas *Apis mellifera* foram introduzidas no estado do Rio de Janeiro pelos jesuítas, que trouxeram algumas colônias da região do Porto, em Portugal. Outras raças de *Apis mellifera* também foram introduzidas em outras regiões do país por europeus. Em 1956, por acidente, abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*) escaparam de um apiário experimental e acasalaram com as de raça europeia, dando origem às hoje chamadas abelhas africanizadas que alavancaram a apicultura brasileira (SOUZA, 2007; QUEIROGA, et al., 2015).

A apicultura brasileira vem crescendo nos últimos anos e se tornou um instrumento de inclusão econômica e alternativa de emprego e renda. Ela está difundida em todo país, que apresenta características de flora e clima excelentes para o desenvolvimento dessas atividades (SABBAG; NICODEMO, 2011). A apicultura ainda contribui ecologicamente, por estimular a polinização de espécies nativas e socialmente pela diminuição do êxodo rural mediante a intensificação de mão de obra no campo (PAULA et al., 2015).

Os principais produtos da apicultura para a comercialização são: mel, cera, pólen, geleia real, apitoxina e própolis (SILVA et al., 2017). As pesquisas relacionadas à apicultura têm crescido nos últimos anos, o que possibilita um aumento na produtividade (SABBAG; NICODEMO, 2011).

O estado do Ceará, por sua localização, é bastante propício para o desenvolvimento da apicultura. O semi-árido apresenta condições ideais para esta atividade, sobretudo pela riqueza de sua vegetação, além do clima que é bastante favorável (KHAN; MATOS; LIMA, 2009). O estado de destaca ainda por produção de mel de abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), produto de boa qualidade, bastante procurado pelo mercado internacional.

4.2.1 Própolis

A própolis é constituída por uma mistura de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas coletadas pelas abelhas de brotos, flores e exsudados de plantas, em que as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a obtenção do produto final. A utilização da própolis pelo homem é relatada desde a antiguidade, onde era utilizada em suplementos alimentares, na prevenção de enfermidades, dentre outras funções. Sua cor, assim como sua composição de maneira geral pode variar de uma amostra para outra (FUNARI; FERRO, 2006; SILVA, et al., 2015; BARBOSA, et al., 2016; HEIMBACH, et al., 2016; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

A palavra própolis deriva do grego *pro* e *polis* cujo significado é defesa da cidade. Logo, a mesma é utilizada pelas abelhas nas colmeias para uma série de funções como, preenchimento de frestas, diminuição das aberturas de entrada e saída da colmeia, mumificação de cadáveres de insetos, impedimento de sua

decomposição e putrefação, dentre outras. É utilizada ainda na defesa contra microrganismos, cobrindo a parede interna da colmeia, além de reparar os favos danificados. A própolis vem se destacando e ganhando popularidade no mundo todo devido as suas propriedades terapêuticas e aplicabilidade na indústria de alimentos (PEREIRA, 2008; SILVA, et al., 2015; CORRÊA, 2017).

O Brasil está no *ranking* dos maiores produtores de própolis no mundo. As condições climáticas, geográficas e as características da vegetação favorecem a sua produção, cujo mercado está mais voltado à exportação para outros países, como Japão. Há vários estudos publicados relacionados à composição da própolis e os fatores que interferem nessa composição, qualidade e também na quantidade produzida, bem como o crescente interesse no consumo deste alimento (BARBOSA, et al., 2016; SALGUEIRO; CASTRO, 2016).

As características físicas e químicas da própolis podem se diferenciar a depender da flora e do clima predominante. Em geral, é constituída de cerca de 50% a 60% de resina, 30% a 40% de ceras, 5 a 10% de óleos essenciais, 5% de grão de pólen, além de outras substâncias. Seu ponto de fusão está entre 60 °C e 70 °C, podendo chegar a 100 °C. A coloração pode variar de marrom escuro passando por tons esverdeados até marrom avermelhado (figura 3). Apresenta odor característico que varia de uma amostra a outra (NOGUEIRA et al., 2007; LUSTOSA et al., 2008; SOARES et al., 2017).

Figura 3 - Coloração de amostras de própolis coletadas no Ceará



Fonte: Adaptado de LIMA (2015).

Considerada uma das misturas mais heterogêneas, cerca de 300 compostos já foram identificados e/ou caracterizados nas amostras de própolis,

dentre os quais estão: ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, chalconas), terpenos, esteroides, aldeídos e ácidos aromáticos, sesquiterpenos, naftaleno, além de vitaminas (B1, B2, B6, C, E) e minerais (manganês, ferro, cálcio e alumínio). Dentre todos esses compostos, os flavonoides e os ácidos fenólicos se destacam por sua grande atividade biológica (DA SILVA et al., 2006; FUNARI; FERRO, 2006; PEREIRA, 2008).

4.2.2 Extrato de própolis

A utilização da própolis como extratos líquidos é bem ampla, sobretudo por suas inúmeras propriedades benéficas. A própolis bruta contém substâncias solúveis tanto em óleo como em água, porém maior parte destas é solúvel em óleo. Essa característica faz do álcool etílico o solvente mais utilizado, bem como o produto proveniente desta extração (BURIOL et al., 2009; MELLO; PETRUS; HUBINGUER, 2010).

A extração da própolis bruta pode ser realizada de maneira simples (maceração), onde a amostra é deixada em contato com o solvente, podendo estar ou não sob agitação, em temperatura ambiente. O tempo pode variar de uma amostra a outra. Outro método que também pode ser utilizado é por meio do extrator Soxhlet, um método mais rápido que é realizado mediante o aquecimento da amostra. O tipo de extração, o tempo e o solvente utilizado podem influenciar na composição química do extrato (PEREIRA, 2008; VIEIRA, 2012).

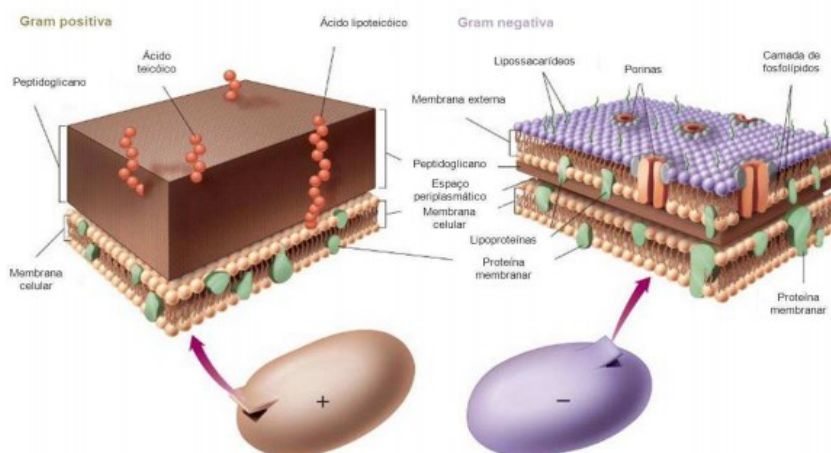
A bioatividade dos extratos de própolis está associada a sua composição química. Estudos revelam que seus constituintes podem atuar exercendo funções, tais como: atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, hepatoprotetora, imunoestimulante, antibiótica e até anticancerígena. Todas essas atividades vêm proporcionando um aumento da aplicabilidade da própolis na indústria alimentícia, sobretudo na forma de alimento funcional (FUNARI; FERRO, 2006; ALVES; KUBOTA, 2013).

Os compostos fenólicos, presentes nos extratos de própolis, não são sintetizados pelo organismo humano, mas quando ingeridos em quantidade significativa atuam na prevenção de doenças como certos tipos de câncer, doenças

cardiovasculares, doenças inflamatórias, dentre outras (MELLO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012). O grupo dos flavonoides é o mais estudado e são tidos como os mais abundantes e efetivos antioxidantes na própolis, desempenhando papel fundamental na atividade antioxidante de seus extratos. Os antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem a oxidação (LUSTOSA et al., 2008; DE-MELO et al., 2014).

Diversos estudos já foram realizados para constatar outra importante atividade da própolis, a antimicrobiana. A ação da própolis sobre as bactérias Gram positivas é mais eficaz do que contra as bactérias Gram negativas. Isso ocorre devido à constituição da parede celular dessas bactérias que é mais complexa (Figura 4). O mecanismo de ação está ligado provavelmente à destruição do RNA-polimerase bacteriano. Quanto à ação fungicida, a própolis tem se mostrado eficaz, sobretudo em fungos do gênero *Candida*. (LUSTOSA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Em se tratando dos extratos alcoólicos de própolis, o teor alcoólico pode influenciar na ação antimicrobiana dos mesmos (DOS SANTOS et al., 2003).

Figura 4 - Parede celular das bactérias Gram positiva e Gram negativa



Fonte: Adaptado de Baptista (2013).

A atividade anti-inflamatória da própolis também está relacionada à presença de flavonoides que atuam inibindo a ação da lipooxigenase e da ciclooxigenase. A propriedade cicatrizante é atribuída aos flavonoides e ácidos fenólicos (LUSTOSA et al., 2008).

4.2.3 *Própolis em alimentos*

A própolis está sendo amplamente utilizada pela indústria, principalmente na forma de alimentos funcionais. Isto se dá pela riqueza de compostos presentes em sua composição (KAWAKITA et al., 2015). Nos últimos anos, diversos estudos abordando a utilização da própolis em alimentos vêm apresentando resultados consideráveis (KAMEYAMA, et al., 2008; NEVES; LIMA, 2010; THAMNONOPOULOS et al., 2018).

Os extratos de própolis são adicionados diretamente aos alimentos, ou podem ser aplicados superficialmente, como por imersão por exemplo. Além disso, polímeros contendo extratos de própolis podem servir como revestimentos. Em todo caso, estes métodos visam reduzir ou eliminar completamente os patógenos que são transferidos para os alimentos ou para reduzir a microbiota presentes nos mesmos (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

O efeito antimicrobiano da própolis também foi observado contra *Listeria monocytogenes* no leite armazenado sob refrigeração. Thamnopoulos et al. (2018) observaram efeito anti-listerial e dose dependente de extratos de própolis dissolvido em glicerol adicionado ao leite. O mesmo recebeu pontuação média em um teste sensorial aplicado, o que possibilitaria uma abertura para o desenvolvimento de bebidas, possibilitando seu uso como conservante natural.

A incorporação da própolis a filmes e revestimentos é outra vertente de utilização em alimentos que vem sendo amplamente estudada e utilizada. Siripatrawan e Vitchayakitti (2016) observaram em seu estudo que a incorporação de extrato de própolis em filmes de quitosana melhorou a propriedade mecânica e de barreira. Estes autores verificaram ainda, que ao incorporar o extrato ao filme, houve um aumento dos compostos fenólicos, que era proporcional ao aumento da concentração do mesmo. Eles observaram efeito antimicrobiano do filme adicionado do extrato, efeito este que não foi observado no filme sem adição do extrato. Os autores atribuíram este efeito aos compostos presentes na própolis, como por exemplo, os flavonoides.

Bodini et al. (2013), ao testarem as propriedades de filmes a base de gelatina com adição de extrato de própolis, observaram que a incorporação do extrato não alterou as propriedades físicas e mecânicas do filme, e mais, esses

autores verificaram que ocorreu um aumento do conteúdo de polifenóis, que foi preservado durante os 177 dias de armazenamento do filme. Em relação à atividade antimicrobiana, estes autores testaram a eficiência do filme contra *Staphylococcus aureus*, e observaram que foi efetiva. Além disso, a zona de inibição aumentava de acordo com o aumento da concentração de extrato no filme. Este efeito também foi observado durante os dias de armazenamento.

Estes e outros resultados mostram a importância do estudo mais detalhado da utilização da própolis em alimentos em suas diversas formas. Eles servem como base para criação de estratégias para preservação de compostos e características de alimentos, tornando-se de grande importância para a indústria.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de estudo, local e período

Trata-se de um estudo experimental, com características descritivas e analíticas. Experimental, por se tratar de um produto com características próprias a partir do revestimento com os extratos, e descritivo e analítico, porque foi descrito e avaliado todo o processo e execução.

A pesquisa foi realizada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará (IFCE) - *Campus* Limoeiro do Norte, no período de julho de 2018 a julho de 2019.

As formulações e análises do produto e dos ingredientes utilizados foram realizadas na Planta Piloto de Leite e Derivados e nos laboratórios de Química, Bioquímica, Microbiologia e Análise Sensorial de Alimentos, da referida instituição.

5.2 Obtenção das amostras de própolis e elaboração dos extratos

As própolis marrom e verde produzidas por abelhas *Apis mellifera* foram coletadas na Fazenda São Vicente, localizada na cidade de Sobral - CE. As coordenadas foram georreferenciadas e estão descritas na tabela 1. Após a coleta o material foi congelado e encaminhado ao laboratório de Química e Bioquímica de Alimentos, para a elaboração dos extratos e análises necessárias.

Tabela 1 - Coordenadas do local de coleta das própolis

Tipo de Própolis	Latitude	Longitude	Safra
Própolis Marrom	3° 42' 29" S	40° 09' 50" W	2018
Própolis Verde	3° 41' 53" S	40° 09' 09" W	2018

Fonte: Elaborada pela autora.

Foram elaborados três lotes distintos de extratos a partir das amostras de própolis (marrom e verde). As extrações seguiram a metodologia utilizada por Pereira (2008), com adaptações, onde 60g de cada amostra, previamente trituradas

em liquidificador industrial, foram misturadas a 200 mL de álcool de cereais 95,7 °INPM (Instituto Nacional de Pesos e Medidas) em um frasco de vidro posteriormente fechado hermeticamente.

Os frascos foram deixados sob agitação em mesa agitadora (SOLAB® SL - 180) a 100 rpm durante 20 dias em temperatura ambiente. Após esse período os extratos foram devidamente filtrados em filtro de papel (Unifil® n° 40) e armazenados em freezer a 4 °C protegidos da luz. Posteriormente, foram submetidos às análises de caracterização química e atividade biológica.

5.3 Análises de caracterização dos extratos

5.3.1 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi obtido utilizando um refratômetro de bancada (OPTRONICS®) e as análises foram realizadas no dia do preparo do extrato, a cada cinco dias durante vinte dias e após filtração, a fim de avaliar a solubilidade dos extratos.

5.3.2 Extrato seco total

Para a obtenção do extrato seco total, a metodologia utilizada foi uma adaptação da Farmacopeia Brasileira (2011), em que 1 mL das amostras de extrato de própolis foram colocadas em cápsulas de alumínio, previamente taradas em estufa a 105 °C e pesadas. Posteriormente, as amostras foram colocadas em estufa a 105 °C por duas horas. Passado esse período, as amostras foram retiradas da estufa e deixadas em um dessecador por trinta minutos. As amostras foram pesadas e a operação foi repetida até obtenção de peso constante. O percentual de extrato seco foi obtido através da seguinte equação:

$$\frac{ES\% = 100 \times (P2 - P1)}{A} \quad (1)$$

Em que ES é o percentual de extrato seco (% m/v), P2 é o peso da cápsula mais a amostra seca, P1 é o peso da cápsula e A é o volume da amostra.

5.3.3 Ceras

A determinação do teor de cera das amostras dos extratos deu-se mediante uma adaptação da metodologia descrita pela AOAC (1992). Inicialmente, as amostras foram refrigeradas a 4 °C, durante um período mínimo de oito horas. Posteriormente, foi retirada 1 g de cada amostra, colocada em um béquer e filtrada em papel de filtro, previamente seco em estufa a 105 °C por duas horas. Os béqueres e os papéis de filtro foram lavados por três vezes com 1 mL de álcool etílico refrigerado. Os papéis de filtro foram então secos em temperatura ambiente por doze horas, e posteriormente colocados em estufa a 50 °C por quinze minutos, dessecados por trinta minutos e pesados. O teor de cera foi obtido a partir da seguinte equação:

$$Ceras(\%) = \frac{P3 - P2 \times 100}{P1} \quad (2)$$

Em que P1 é o peso da amostra, P2 é o peso dos papéis de filtro secos a 105 °C e P3 é o peso final dos papéis de filtro com as amostras secas.

5.3.4 Solubilidade em acetato de chumbo

Para a determinação da solubilidade em acetato de chumbo, amostras de 0,5 mL de cada extrato foram colocadas em tubos de ensaio e adicionadas de 0,5 mL de acetato de chumbo a 10 %. Posteriormente, as misturas foram agitadas e deixadas em repouso por três minutos. O aparecimento de um precipitado amarelo homogêneo na parte inferior dos tubos de ensaio indica resultado positivo de solubilidade (AOAC,1995).

5.3.5 Solubilidade em hidróxido de sódio

Para a determinação da solubilidade em hidróxido de sódio, amostras de 0,5 mL de cada extrato foram colocadas em tubos de ensaio e adicionadas de 0,5 mL de hidróxido de sódio 50 %. Posteriormente, as soluções foram agitadas e deixadas em repouso por três minutos. A formação de um precipitado branco no fundo dos tubos de ensaio indica resultado positivo de solubilidade (AOAC,1995).

5.3.6 Atividade de oxidação

Para a determinação da atividade de oxidação 1 mL de cada extrato foi diluído em 24 mL de água destilada. Em um tubo de ensaio de 15 mL foram adicionados 0,5 mL deste extrato diluído, 0,5 mL de água destilada e 1 mL de ácido sulfúrico 20%. A mistura foi agitada em agitador de tubos e posteriormente foram adicionados 5 mL de permanganato de potássio 0,1 N, agitando-se rapidamente. O tempo gasto para o desaparecimento da cor rosa foi medido com um cronometro e anotado (TAGLIACOLLO; ORSI, 2011).

5.3.7 Determinação do teor de compostos fenólicos

Para a determinação da porcentagem de compostos fenólicos, foram pesados 2,5 mL de cada amostra de extrato e posteriormente foram adicionados 7 mL de solução etílica 70% e 0,5 mL de acetato de chumbo a 10%. A solução foi misturada e deixada em repouso por vinte e quatro horas em temperatura ambiente. Posteriormente, as soluções foram filtradas em papéis filtro previamente secos em estufa a 105 °C por uma hora e pesados, que foram mantidos a temperatura ambiente por doze horas. Passado esse período, os papéis de filtro foram colocados em estufa a 50 °C por uma hora e novamente pesados. A metodologia utilizada foi uma adaptação da AOAC (1992). A porcentagem de compostos fenólicos foi determinada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{Compostos Fenólicos (\%)} = \frac{P3 - P2 \times 100}{P1} \quad (3)$$

Em que P1 é o peso das amostras, P2 é o peso dos papéis de filtro secos e P3 é o peso dos papéis de filtro com a amostra seca.

5.3.8 Determinação de flavonoides totais

Foram realizadas leituras em espectrofotômetro mediante a formação de complexos entre alumínio e alguns flavonoides. Uma curva padrão com quercetina foi utilizada como referência (APÊNDICE A). Para tanto, 2 mL das soluções dos extratos de própolis a 2 mg/mL foram diluídos em balões de 25 mL. Posteriormente, a absorbância de soluções contendo alíquotas de 0 a 3,5 mL desta solução mais 1 mL de cloreto de alumínio foram medidas em espectrofotômetro. O resultado foi expresso em mg de quercetina por grama de extrato de própolis e em porcentagem. (FUNARI; FERRO, 2006; MATSUDA, 2006; MELLO, MATSUDA, ALMEIDA-MURANDIA, 2012).

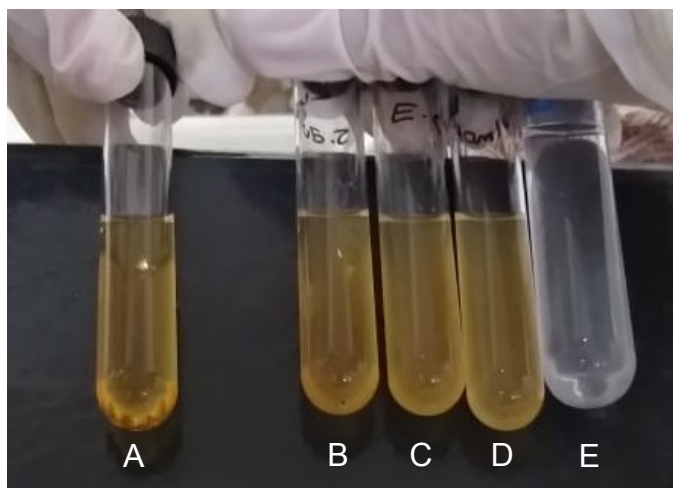
5.4 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos

Para analisar o efeito antimicrobiano dos extratos de própolis, foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (CLIST 2275), *Salmonella typhi* (INCQS 14028) e *Escherichia coli* (CLIST 3862), tidos na literatura como maiores contaminantes em queijo coalho e por serem excelentes representantes do grupo de bactérias Gram positiva e negativa. Essas bactérias encontravam-se preservadas em ágar inclinado no laboratório de microbiologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - *Campus* Limoeiro do Norte. Para o repique, cada uma das culturas foi transferida com o auxílio de uma agulha inoculadora para placas contendo Ágar Triptona de Soja (TSA) mediante estriamento em quadrantes. O procedimento foi realizado a fim de se obter colônias isoladas, para verificar a pureza das culturas. Posteriormente, foram incubadas por 24 horas a 35 °C.

Após o repique, foram selecionadas de cada uma das culturas de 3 a 5 colônias isoladas e com morfologia semelhantes. Estas foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB). Os tubos foram incubados a 35°C durante um período de três a seis horas para alcançar uma turbidez ótica

semelhante a uma solução padrão McFarland 0,5, resultando em uma suspensão contendo aproximadamente 1 a 2×10^8 UFC/mL (Figura 5). Para auxiliar na comparação foi utilizado fundo branco e preto (NCCLS, 2003).

Figura 5 - Escala e suspensão de bactérias



Meio de cultura (TSB) (A), suspensão *S. aureus* (B), suspensão *E. coli* (C), Suspensão *Salmonella* (D), Escala McFarland 0,5 (E).

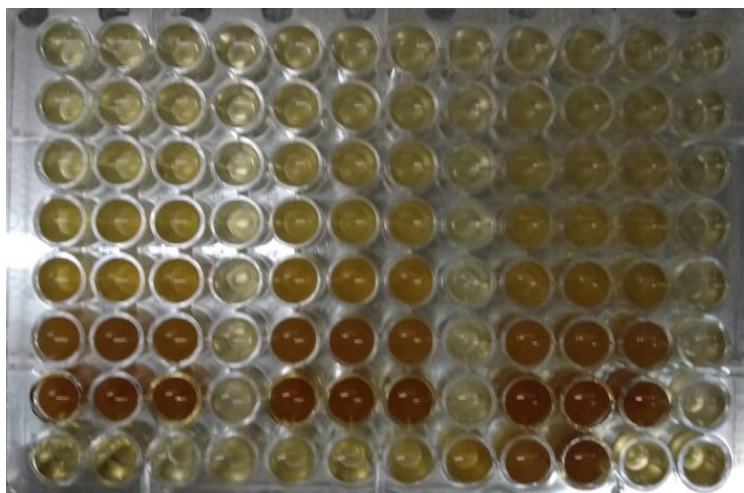
Fonte: Autora.

A Concentração Mínima Inibitória foi determinada por meio da técnica de microdiluição, utilizando microplacas de 96 poços (Figura 6), conforme metodologia descrita no NCCLS (2003), com modificações. Para o preparo da microplaca em cada poço foi adicionado 10 μ L da suspensão padronizada, 150 μ L de meio de cultivo (TSB) e 150 μ L de solução contendo extrato de própolis nas concentrações de 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 2,5; 0,125; 0,0625 % (m/v). Foram realizados três controles, um contendo o meio de cultivo mais a suspensão padronizada, outro contendo apenas meio de cultivo e um último contendo álcool etílico de cereais nas concentrações das diluições dos extratos.

As placas foram incubadas a 35 °C por 24 - 48 horas e avaliadas em ambos os períodos. As concentrações mínimas inibitórias foram definidas como as menores concentrações dos extratos de própolis que não permitiram a turvação do meio de cultivo.

As análises foram realizadas em triplicata e duas repetições para cada um dos extratos e microrganismos em estudo.

Figura 6 - Microplaca de 96 poços



Fonte: Autora.

5.5 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos sobre queijo coalho

Os queijos industrializados utilizados para os testes foram adquiridos no comércio local, manipulados em condições higiênico-sanitárias adequadas para evitar qualquer tipo de contaminação, e abertos em câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de uma lâmina estéril, foram retiradas fatias de queijo coalho de aproximadamente 0,5 cm de espessura, pesando em torno de 20 - 25 gramas.

A partir dos dados obtidos no teste de concentração mínima inibitória (Item 5.4) foram realizados quatro tratamentos para cada tipo de extrato:

- Controle negativo - Queijo coalho;
- Controle positivo - Queijo coalho + suspensão bacteriana;
- Extrato a 1,0% - Queijo coalho revestido com extrato + suspensão bacteriana;
- Álcool etílico - Queijo coalho revestido com álcool + suspensão bacteriana.

As soluções de extrato de própolis a 1,0%, assim como as soluções etanólicas foram aplicadas nas fatias por meio de aspersão. Sobre a superfície de cada fatia de queijo, exceto o controle negativo, foram inoculadas três alíquotas de 10 μ L da suspensão microbiana, previamente padronizada a 0,5 na escala McFarland de bactéria, para cada bactéria em estudo.

As fatias foram analisadas de acordo com o que é proposto por APHA (2001) para a pesquisa de coliformes a 35 °C, coliformes a 45 °C, *E. coli*, *Staphylococcus* e *Salmonella*, no mesmo dia e após 48 horas de incubação a 35 °C. Desta forma, foi observado o crescimento microbiano das amostras em cada um dos tempos em estudo e verificado a eficácia dos extratos.

Depois de estabelecido o efeito sinérgico, queijos coalho foram adquiridos diretamente na empresa devidamente registrada e revestidos conforme a metodologia preestabelecida a fim de compreender se o revestimento teria alguma influência sobre a composição e características sensoriais do produto final.

5.6 Análises físico-químicas e composição centesimal dos queijos

A amostra controle juntamente com as amostras que passaram pelos tratamentos com os extratos foram submetidas a análises físico-químicas: pH, por meio de um potenciômetro digital (Hanna Bench®) e a acidez titulável, que foi determinada de acordo com o que é proposto na instrução normativa nº 68 (BRASIL 2006), mediante titulação com solução de hidróxido de sódio, utilizando a fenoftaleína como indicador.

Para a determinação da composição centesimal as amostras foram submetidas às análises de umidade, cinzas e proteínas de acordo com os métodos oficiais da AOAC (2005) e lipídeos utilizando um butirômetro conforme descrito por Pereira et al. (2001). Os carboidratos foram determinados por diferença, utilizando a fórmula: % carboidratos totais = 100% - (% umidade + % cinzas + % proteínas + % lipídios).

5.7 Análises microbiológicas

Para garantir a sanidade dos queijos optou-se pela compra do produto diretamente com a empresa produtora, que emitiu a certificação da qualidade higiênico-sanitária (Anexo A). Foram realizadas as análises microbiológicas dos extratos diluídos, com o objetivo de investigar a presença de Coliformes a 35 °C e a 45 °C, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras, adotando-se a

metodologia utilizada pela APHA (2001). A análise sensorial só seria realizada caso as amostras apresentassem dentro dos padrões legais, conforme foi observado.

5.8 Análise sensorial e aspectos éticos

Foi utilizado um teste de comparação múltipla (APÊNDICE B), onde os queijos revestidos (em cubos) foram comparados com a amostra de referência (controle), para averiguar se havia diferença entre elas e o quanto diferiram (DUTCOSKY, 2011).

O teste foi aplicado em 30 avaliadores, não treinados, de ambos os sexos, com faixa etária entre 18 e 50 anos. Ambos participaram do teste em duplicata, totalizando 60 julgamentos. Os mesmos avaliaram por meio de uma escala hedônica de sete pontos (0 = nenhuma diferença do controle; 1 = diferença muito ligeira; 2 = diferença ligeira / moderada; 3 = diferença moderada; 4 = diferença moderada / grande; 5 = diferença grande; 6 = diferença muito grande) os atributos sabor e odor.

Os avaliadores receberam todos os informes referentes à pesquisa, quanto aos objetivos e metodologia do estudo. A eles foi garantido o direito de desistir de participar da pesquisa quando desejassem, e ainda que será mantido o anonimato por ocasião de divulgação dos resultados da pesquisa. Foi a eles assegurado o mínimo de risco à sua saúde por se tratar de produto com segurança físico-química e microbiológica.

Os colaboradores que aceitaram participar da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE C), que continha todas as informações necessárias sobre a pesquisa.

O estudo foi submetido Comitê de Ética em Pesquisa do IFCE, respeitando a resolução nº 466 (BRASIL, 2013). O mesmo foi aceito com o parecer número 3.199.675.

5.9 Análise estatística

As análises foram realizadas em duplicata e triplicata e os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si

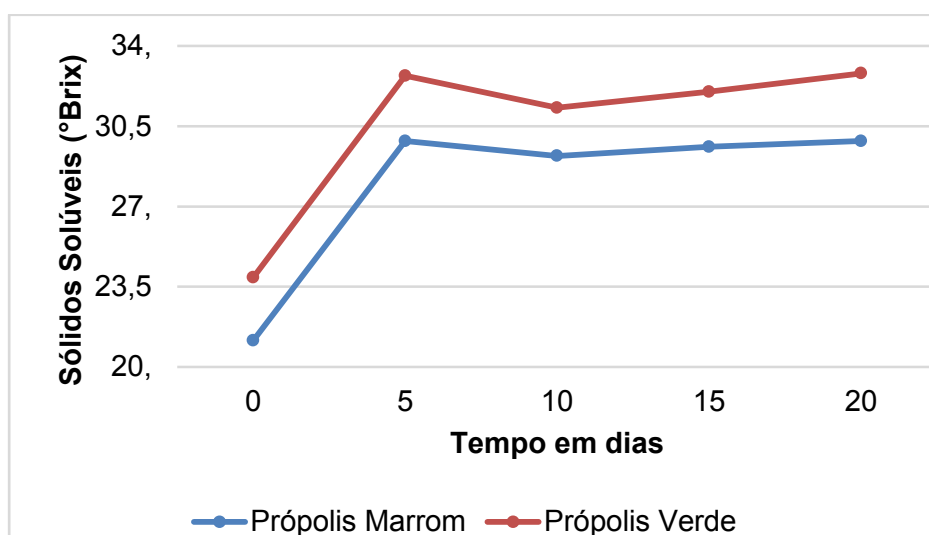
pelo teste t de student, para os resultados referentes as análises de caracterização dos extratos e Tukey ao nível de 5 % de significância para as demais utilizando o programa STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2007).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos extratos de própolis

Analisando a evolução dos sólidos solúveis dos extratos de própolis (Figura 7) foi possível perceber que o máximo de solubilidade foi atingido nos primeiros cinco dias. Após este período, a variação na concentração foi irrelevante. Deste modo pode-se inferir que é possível produzir o extrato de própolis em cinco dias sobre as condições descritas na metodologia.

Figura 7 - Acompanhamento dos sólidos solúveis durante o preparo dos extratos



Fonte: Elaborado pela autora.

Segundo Soares et al. (2017), o °Brix é um método que pode indicar a quantidade de extrato seco na amostra. Os autores relatam que quando este valor é de 33 °Brix, o extrato seco está em torno de 11%. Este fato não foi observado no extrato de própolis marrom em estudo. Mesmo apresentando um valor para sólidos solúveis semelhante ao descrito pelos autores (33,6 °Brix) o extrato seco mostrou-se inferior (9,29%). O extrato de própolis verde apresentou valor superior para este parâmetro (34,7 °Brix), assim como para extrato seco, mas mesmo assim não atingiu 11% (Tabela 2). Tal fato é comumente observado na literatura devido às variações na composição das amostras de própolis, que podem interferir no conteúdo de extrato seco final.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos dos extratos de própolis

Amostras	Análises		
	Sólidos Solúveis (°Brix)	Extrato Seco (% m/v)	Ceras (%)
Ex. Própolis Marrom	33,6a ± 3,71	9,29a ± 0,24	3,40a ± 0,71
Ex. Própolis Verde	34,7a ± 4,70	10,40a ± 0,31	2,96a ± 2,63

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste t de student ($p \geq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante o acompanhamento da solubilidade no preparo dos extratos, observou-se que o extrato de própolis verde sempre apresentou maior teor de sólidos solúveis. A literatura indica que, quanto maior o conteúdo de extrato seco, mais solúvel é a amostra bruta no solvente utilizado (FUNARI; FERRO, 2006).

O regulamento técnico de identidade e qualidade de extrato de própolis indica que o extrato seco deve ser de no mínimo 11% (BRASIL, 2001b). No entanto, por se tratar de um extrato que será utilizado para testes de atividade antimicrobiana, o mínimo legal não é aplicado, tendo em vista que serão trabalhadas concentrações menores do extrato.

Kawakita et al. (2015) encontraram valores superiores aos apresentados nesta pesquisa (12,8%) para extrato seco do extrato hidroalcoólico de própolis de abelhas *Apis mellifera* africanizadas. Soares et al. (2017) por sua vez, encontraram valores que variaram de 7,27% a 18,42%, em um estudo realizado com oito diferentes amostras de extrato de própolis. Estes mesmos autores observaram que, a amostra que apresentava maior conteúdo de extrato seco, assim como maior valor referente a sólidos solúveis era a que tinha coloração esverdeada. Embora não diferindo entre si, este fato também pode ser observado nas amostras em estudo.

Os principais componentes da própolis, por apresentarem maior bioatividade, como os compostos fenólicos, por exemplo, não estão presentes na cera, logo é desejável um menor conteúdo de cera na amostra, tendo em vista que quanto maior o teor de ceras, menor o teor das demais substâncias (MELLO;

MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN, 2012). Neste estudo, quanto maior o teor de ceras menor foi o valor do extrato seco total.

Em relação a este parâmetro, as amostras em estudo apresentaram valores superiores aos encontrados por Kawakita et al. (2015) (1,02%). Lima (2012) em um estudo realizado com amostras de própolis da caatinga do Baixo Jaguaribe observou que as amostras coletadas no período seco apresentou um percentual de ceras maior que as coletadas no período chuvoso. O autor relata que o número de espécies botânicas em estado vegetativo diminui na caatinga neste período, dessa forma as abelhas tendem a coletar mais cera, já que as resinas são mais escassas ou de difícil coleta. Silva et al. (2006) em seu estudo também observaram que as amostras com maiores teores de cera foram colhidas no verão, período pelo qual ocorre média a baixa precipitação na região do estudo. Tal fato explicaria o alto teor de ceras nas amostras em estudo, tendo em vista a baixa precipitação na região no período em que a mesma foi colhida.

O conteúdo de ceras no extrato de própolis marrom foi superior ao obtido no extrato de própolis verde, todavia estes não apresentaram diferença significativa entre si ao nível de 5% de significância a partir do teste t de student. Segundo a legislação, o conteúdo de ceras deve ser de no máximo 1,0%. Esses resultados comparados com os dados da literatura permite deduzir que estas amostras provavelmente foram coletadas em períodos secos, razão pela qual apresenta um elevado teor de ceras. Entretanto, como os extratos serão aplicados diluídos, o teor de ceras não será relevante.

Em relação à solubilidade dos extratos em acetato de chumbo e hidróxido de sódio, ambas as amostras apresentaram resultado positivo aos testes. A solubilidade em acetato de chumbo tem por objetivo verificar a homogeneidade das partículas do extrato em meio a um sal, enquanto a solubilidade em hidróxido de sódio visa verificar a solubilidade da amostra em uma base (KAWAKITA et al., 2015). A legislação estabelece que ambos os testes devem ser positivos, logo as amostras apresentaram-se de acordo com a legislação.

Esses e outros parâmetros avaliados podem variar muito de um estudo a outro, tendo em vista os locais, época do ano e as condições nas quais a matéria-prima é produzida e coletada (BREYER; BREYER; CELLA, 2016). A metodologia

utilizada na elaboração dos extratos também é outro fator que pode contribuir de forma direta nos resultados das análises.

6.2 Bioatividade dos extratos de própolis

A bioatividade dos extratos foi avaliada mediante determinação do teor de flavonoides, percentual de compostos fenólicos e a atividade de oxidação. O anexo VII da instrução normativa nº 3 de 2001, referente ao Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis, estabelece parâmetros referentes às análises em questão.

Para flavonoides, a instrução estabelece um mínimo de 0,25% (m/m) equivalente a 2,5 mg/g. No que se refere ao conteúdo de compostos fenólicos, este deve ser de no mínimo 0,50% (m/m) e a atividade de oxidação não deve ultrapassar 22 segundos. Os resultados referentes a estas análises foram descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Teor de flavonoides, compostos fenólicos e atividade de oxidação

Amostras	Teor de flavonoides totais (mg/g - %)	Compostos Fenólicos (%)	Atividade de Oxidação (segundos)
Ex. Própolis Marrom	1,41a ± 0,06 - 0,14a ± 0,01	7,53a ± 0,24	72,5a ± 0,71
Ex. Própolis Verde	12,08b ± 1,05 - 1,21b ± 0,11	8,92b ± 0,38	10,0b ± 0,38

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste t de student ($p \geq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os flavonoides são compostos amplamente estudados quando se trata de atividade biológica em amostras de própolis. A variação da quantidade deste componente está relacionada à composição do produto, que é influenciada pela época do ano, espécie de abelha e espécie botânica (SOARES, 2017; LIMA, 2012). No trabalho em questão houve diferença significativa entre as duas amostras, em que o extrato de própolis verde se destacou apresentando o maior teor de flavonoides.

Soares et al. (2017) em seu trabalho sobre identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis, avaliaram oito diferentes amostras e apresentaram valores para flavonoides que variaram de 0,526 mg/mL a 3,57 mg/mL. Na referida pesquisa, os autores observaram ainda que o maior teor de flavonoides estava presente na amostra de cor esverdeada. Eles atribuíram tal resultado a maior quantidade de grupos fenólicos presentes na própolis verde, corroborando assim com os resultados desta pesquisa, tendo em vista a grande diferença entre as duas amostras.

Buriol et al. (2009) encontraram valores para flavonoides presentes em extratos hidroalcoólicos e oleosos de própolis que variaram de 2,25% a 5,05%. Mello, Matsuda e Almeida-Murandia (2012) obtiveram em seu estudo com própolis de quatro regiões do Brasil valores entre 0,36 mg/g e 52,70 mg/g. Alves e Kubota (2013) em estudo com extratos comerciais obtiveram valores variando de 0,49 mg/g a 1,14 mg/g para flavonoides, inferiores aos encontrados nesta pesquisa. Este fato destaca a qualidade da própolis produzida no nordeste.

Gutierrez-Gonçalves e Marcucci (2009) em estudo realizado com amostras de própolis do Ceará encontraram valores referentes a flavonoides entre 1,17% e 8,09%. Bonvehí e Gutierrez (2011) encontraram altos teores de flavonoides em amostras de própolis de Basco (nordeste da Espanha), com mínimo em torno de 86 mg/g. Os autores sugerem ser os flavonoides os melhores candidatos para avaliar a qualidade da própolis produzida na região devido as suas atividades biológicas e por sua predominância na fração fenólica.

Para Lozina et al. (2010) as propriedades terapêuticas da própolis são atribuídas a presença de compostos fenólicos, de forma especial os flavonoides. Estes autores analisaram quinze amostras de própolis da Argentina e encontraram valores entre 0,12 mg/g e 30,39 mg/g. Oliveira et al. (2012) apresentaram em seus resultados teores de flavonoides em três amostras de própolis, 0,81%; 1,22% e 1,72% respectivamente. Lima (2015) avaliou o teor de flavonoides de amostras de própolis da região Noroeste do Ceará e encontrou valores semelhantes aos encontrados nesta pesquisa (0,08 mg/g - 31,1 mg/g).

Assim como os flavonoides, os demais compostos fenólicos também são influenciados pelo período e espécies botânicas disponíveis. No período chuvoso há uma maior abundância de espécies botânicas em seu estado vegetativo e essa

diversidade contribui tanto para a qualidade da própolis produzida, quanto no teor de compostos fenólicos presentes na mesma (LIMA, 2012). Zabaïou et al. (2017) enfatizam que a atividade antioxidante dos extratos de própolis estão relacionadas ao conteúdo de polifenóis.

Nesta pesquisa, foi observado a partir dos resultados obtidos que o conteúdo de compostos fenólicos também foi superior no extrato de própolis verde e que houve diferença significativa entre as amostras de extratos de própolis. Ambas, porém apresentam-se de acordo com o que é preconizado pela legislação.

Oliveira et al. (2012) trabalharam com a quantificação de compostos fenólicos de diferentes extratos de própolis comerciais e obtiveram resultados inferiores aos observados nesta pesquisa (3,36% - 4,81%). Porém, valores semelhantes foram observados por Buriol et al. (2009), que obtiveram um percentual de 8,55% de compostos fenólicos para o extrato de própolis produzido em condições semelhantes às deste trabalho. Corrêa (2017) também encontrou valores próximos aos encontrados nesta pesquisa para extrato de própolis verde (5,9%).

Kawakita et al. (2015) avaliaram o percentual de compostos fenólicos em amostras de extrato de própolis deixadas sob refrigeração e em temperatura ambiente por um período de duzentos e dez dias. Os valores obtidos variaram de 0,50% a 0,54% estando, portanto, dentro dos parâmetros estabelecidos pela legislação, mas apresentando valores bem inferiores aos observados nesta pesquisa. Essa variação, segundo os autores, pode ser oriunda das diferentes fontes de exudados e da localização do apiário.

Para compostos fenólicos, Mello, Matsuda e Almeida-Muradian (2012) encontraram resultados variando entre 0,95% e 29,52%. Gutierrez e Marcucci (2009) obtiveram valores entre 3,71% e 9,49%. Lima (2012) observou que a própolis coletada no período chuvoso apresentava um conteúdo de compostos fenólicos maior, mostrando outra variável que pode influenciar no conteúdo deste composto nas amostras.

O índice de oxidação é um parâmetro utilizado para sugerir o tempo decorrido desde a colheita da própolis, o tipo de armazenamento e a atividade antioxidante. Isto por que altos índices de oxidação indicam longo período de armazenamento em temperaturas mais elevadas, sejam no interior da colmeia ou em outros locais de armazenamento (MELLO; MATSUDA; ALMEIDA-MURADIAN,

2012). Valores inferiores ao que é preconizado pela legislação (22 segundos) indicam bom poder de oxidação (LIMA, 2015). Deste modo, a própolis verde do nordeste apresentou uma considerável atividade, tendo em vista que o tempo foi metade do preconizado pela legislação.

O tempo decorrido na análise do extrato de própolis marrom foi superior ao observado no extrato de própolis verde, apresentando diferença estatística significativa. Isso aponta para uma maior atividade antioxidante do extrato de própolis verde frente ao extrato de própolis marrom. Lima (2015) encontrou valores para este parâmetro com mínimo de 2 segundos e máximo de 48 segundos. Kawakita et. al. (2015) encontraram valores inferiores aos apresentados nesta pesquisa (6 a 6,6 segundos).

Lima (2012) obteve resultados médios de 2,70 segundos para amostras coletadas no período chuvoso e 3,35 segundos para o seco na caatinga do Baixo Jaguaribe cearense, indicando o aumento do tempo de modo proporcional ao período seco, onde a própolis apresenta maior conteúdo de cera. Lozina et al. (2010), encontraram valores que variaram entre 2 e 110 segundos, estando os resultados desta pesquisa entre a faixa encontrada por estes autores.

Como supracitado, a qualidade da própolis está relacionada a diversos fatores bem como as substâncias que a compõem. Este fato explica a diversidade de resultados apresentados pela literatura. Sabe-se que os compostos fenólicos são responsáveis por parte da bioatividade da própolis, mas que este não deve ser considerado de maneira isolada, tendo em vista que a sua maior ou menor quantidade pode não está ligada ao seu desempenho (SOARES, 2017).

Os resultados demonstram que as amostras apresentam um bom conteúdo de compostos fenólicos, estando superiores ou dentro da faixa de valores apresentados pela literatura. Quanto aos flavonoides, embora o extrato de própolis marrom tenha apresentado conteúdo inferior, alguns estudos apontam resultados semelhantes. Em relação à atividade de oxidação, os resultados confirmam o que é apontado pela literatura quanto às diferenças entre os extratos.

Logo, analisando os resultados desta pesquisa e comparando-os com os disponíveis na literatura observa-se que os extratos estão em condições de serem utilizados, tendo em vista que apresentam um bom conteúdo de compostos fenólicos

e uma quantidade relevante de flavonoides, com um destaque para o extrato de própolis verde.

6.3 Atividade antimicrobiana

6.3.1 Concentração Mínima Inibitória (CMI)

Os resultados referentes à concentração mínima inibitória de cada um dos extratos sobre as espécies bacterianas estão descritos na tabela 4. Os valores encontrados foram iguais para as três espécies de bactérias em estudo (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*) nos testes com o extrato de própolis marrom. Essa mesma concentração foi observada para o extrato de própolis verde, exceto para *Staphylococcus aureus*, em que o extrato apresentou efeito a partir de 0,25%.

De maneira geral, a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis marrom e verde foi igual, no que se refere à espécie de bactéria avaliada, com exceção para o *Staphylococcus aureus*, que se destacou por sua sensibilidade a concentrações mais baixas de extrato de própolis verde. Vale destacar que *Staphylococcus aureus* está associados aos processos infecciosos epiteliais, de modo que a própolis verde também poderia ser utilizada com maior eficiência no tratamento de infecções na pele ou mesmo mastite em gado que também é provocada pelo mesmo microrganismo.

Tabela 4 - Concentrações Mínimas Inibitórias (CMI) dos extratos

Bactérias	Agente Inibitório (%)	
	Extrato de Própolis Marrom	Extrato de Própolis Verde
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,0 %	0,25 %
<i>Salmonella typhi</i>	1,0 %	1,0 %
<i>Escherichia coli</i>	1,0 %	1,0 %

Fonte: Elaborada pela autora.

Kameyama et al. (2012), em seu estudo sobre a utilização do extrato de própolis na sanitização e conservação de cenoura minimamente processada, observaram que em todas as concentrações estudadas o extrato alcoólico de própolis teve eficiência contra bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, além de fungos filamentosos e leveduras, atingindo o máximo de eficiência na concentração de 0,4%. Estes mesmos autores observaram ainda que o extrato aquoso não apresentou efeito inibitório e atribuiu tal fato a menor concentração de flavonoides existente no mesmo, composto que tem relação com esta atividade.

Corrêa (2017) em seu estudo sobre a ação antimicrobiana de própolis verde encontrou valores para CMI que variaram de 1,25% a 10%, para várias espécies de bactérias dentre as quais, *Staphylococcus lugdugensis*, *Proteus vulgaris* e *Bacillus cereus*. Lima (2015) em estudo realizado com quinze diferentes amostras de própolis do Ceará observou efeito em concentrações que variaram de 3% a 50% para *Staphylococcus aureus* e *E. coli*. Um detalhe relevante deste estudo foi que das quinze amostras estudadas, apenas oito apresentaram atividade inibitória, e destas apenas duas amostras apresentaram efeito na concentração de 3%. Os resultados apresentados neste estudo demonstram o efeito em concentrações inferiores as descritas por este autor, podendo este fator estar associado ao método de aplicação mais eficiente ou mesmo ao tipo de própolis utilizada.

Gutierrez-Gonçalves e Marcucci (2009) obtiveram resultados para CMI entre 400 µg/mL (0,04 g/100 mL) e 600 µg/mL (0,06 g/100 mL), em uma das três amostras de própolis do Ceará avaliadas no estudo, valores esses inferiores aos encontradas neste estudo. Todavia as outras amostras não apresentaram efeito. Gomes et al. (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato de própolis marrom sobre cinco espécies de bactérias Gram positivas e oito Gram negativas isoladas. Eles obtiveram como CMI, concentrações que variaram de 2,25 mg/mL (0,225 g/100 mL) a 18,5 mg/mL (1,85 g/100 mL). Os autores observaram ainda que, dependendo da procedência das bactérias isoladas os valores variavam. Os valores encontrados nesta pesquisa estariam, portanto dentro da faixa estabelecida por estes autores.

Bastos et al. (2011), avaliaram a atividade antimicrobiana de extrato de própolis marrom e observaram concentrações mínimas inibitórias que variaram entre 125 mg/mL a 1000 mg/mL (12,5 g/100 mL a 100 g/100 mL). Senhorini et al. (2014) ao

verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato de própolis sobre cepas de microrganismos, observaram que as bactérias Gram positivas foram mais sensíveis aos extratos, que apresentaram efeito em concentrações entre 0,1% e 0,25%. Já para Gram negativas, os autores relataram que as cepas só apresentaram sensibilidade em concentrações a partir de 3% atribuindo essa maior resistência a fatores como, a maior concentração lipídica do grupo e a complexidade da parede celular.

Os resultados encontrados para CMI podem variar de espécie para espécie de microrganismo em estudo, pois cada um apresenta características diferentes que os fazem mais ou menos sensíveis aos agentes antimicrobianos, sendo na maioria dos casos proporcionais as concentrações destes extratos. Outro fator que pode causar variação é o tipo de própolis utilizada, sabendo que estas apresentam atividade diferenciada dependendo de uma série de fatores, como por exemplo, sua composição (ARAÚJO; CARVALHO, 2015; ALMEIDA et al., 2017).

De maneira geral, a utilização da própolis em alimentos permite explorar sua propriedade antimicrobiana, frente a várias espécies de microrganismos que são numerosos e se multiplicam com facilidade (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

Nestes testes foi possível perceber que a concentração ideal comum aos microrganismos estudados foi de 1%, semelhante aos limites descritos por outros autores com maior ou menor efeito, por este motivo esta foi a concentração utilizada. As bactérias testadas eram Gram negativas (*E. coli* e *Salmonella*) e Gram positiva (*Staphylococcus aureus*). Tal fato pode justificar a maior sensibilidade do *Staphylococcus aureus* frente à própolis verde, já que foi observado em outros estudos que as bactérias Gram positivas são mais sensíveis aos agentes antimicrobianos e que a atividade antimicrobiana está relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos presentes na amostra, sobretudo os flavonoides, observado em maior quantidade no extrato de própolis verde.

6.3.2 Atividade antimicrobiana dos extratos sobre queijo coalho

Para comprovar a efetividade dos extratos em termos práticos, fez-se o teste de aplicação diretamente sobre o produto. Deste modo, o produto entraria em

sinergia com os fatores do alimento, podendo assim aumentar ou reduzir o seu efeito.

A resolução 12 de 02 de janeiro de 2001, que aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos estabelece limites para coliformes a 45 °C, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella spp.* em queijos, desta forma os resultados referentes a atividade antimicrobiana dos extratos foram dispostos de acordo com esses microrganismos (BRASIL, 2001c).

As fatias foram avaliadas no dia do seu revestimento e após 48 horas, período esse necessário para o possível crescimento das bactérias. As fatias revestidas com extrato foram comparadas com as fatias controles (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5 - Contagem de bactérias após tratamento com extrato de própolis Marrom

Bactérias	Tempo	Tratamentos	
		Controle Positivo	Extrato de Própolis (1,0%)
Coliformes a 45 °C (NMP/g)	0 h	< 3,0	< 3,0
	48 h	11,0	< 3,0
<i>Staphylococcus spp.</i> (UFC/g)*	0 h	1,04 x 10 ⁵	1,76 x 10 ⁵
	48 h	40,90 x 10 ⁵	44,80 x 10 ⁵
<i>Salmonella spp.</i> (presença ou ausência)	0 h	Presença	Presença
	48 h	Presença	Presença

*Valores estimados, baseados na contagem por centímetro cúbico.

**Crescimento em relação ao controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados referentes ao extrato de própolis marrom mostram que, em se tratando dos coliformes a 45 °C, o extrato não apresentou nenhum efeito no tempo 0, com crescimento mínimo. É possível que o microrganismo não tenha conseguido se adaptar ao meio que foi inoculado em um período tão curto. Com 48 horas, por sua vez, o crescimento nas fatias revestidas com extrato de própolis

marrom foi inferior ao controle, mostrando que para este grupo o extrato teve efeito positivo nesta concentração.

Para *Staphylococcus spp.* os resultados não foram satisfatórios, tendo em vista que nos tempos avaliados as fatias revestidas com extrato apresentaram valores superiores ao controle, mostrando a ineficácia do extrato de própolis marrom na concentração testada para este microrganismo.

Os resultados referentes à presença de *Salmonella* foram positivos para todos os tratamentos em estudo, demonstrando que apesar de apresentar efeito inibitório para salmonela conforme observado no teste anterior, este efeito não chega a ser bactericida. A metodologia utilizada detectava somente a presença ou ausência da bactéria, isto por que a legislação estabelece a ausência do microrganismo em 25 g de queijo.

Tabela 6 - Contagem de bactérias após tratamento com extrato de própolis Verde

Bactérias	Tempo	Tratamentos	
		Controle Positivo	Extrato de Própolis (1,0%)
Coliformes a 45 °C (NMP / g)	0 h	23,0	23,0
	48 h	460,0	27,0
<i>Staphylococcus spp.</i> (UFC / g)*	0 h	69,55 x 10 ⁵	49,40 x 10 ⁵
	48 h	174,20 x 10 ⁵	164,45 x 10 ⁵
<i>Salmonella spp.</i> (presença ou ausência)	0 h	Presença	Presença
	48 h	Presença	Presença

*Valores estimados, baseados na contagem por centímetro cúbico.

**Crescimento em relação ao controle.

Fonte: Elaborada pela autora.

No que se refere aos resultados do extrato de própolis verde, assim como para a marrom, a contagem de coliformes no tempo 0 foi igual para os três tratamentos. Em 48 horas, nota-se um crescimento bem superior no tratamento controle, mostrando o efeito do extrato sobre esses microrganismos.

Diferente do que ocorreu com o extrato de própolis marrom, o verde mostrou eficiência sobre espécies de *Staphylococcus*, nos dois tempos analisados. Este fato pode ser justificado pela presença maior de compostos fenólicos e flavonoides no extrato de própolis verde, principais responsáveis por tal atividade (BURIOL ET AL., 2009). Em relação a *Salmonella*, o extrato de própolis verde não apresentou efeito bactericida.

Zabaiou et al. (2017), relatam em seu trabalho que o extrato etanólico de própolis brasileira, produzida por *Apis mellifera* e as abelhas sem ferrão mostraram efeitos significativos contra *S. aureus*, *E. coli* e *Enterococcus sp.*, a partir do teste realizado por difusão de disco. Lima (2015) observou considerável atividade inibitória de algumas amostras de própolis do coletadas em diferentes cidades do Ceará sobre *S. aureus* e *E. coli*.

Kawakita et al. (2015), ao avaliarem a atividade antimicrobiana de extratos de própolis mantidos em temperatura ambiente e refrigerada, observaram atividade biológica dos extratos, inibindo o crescimento de *S. aureus*, independente da temperatura de armazenamento. Gutierrez-Gonçalves e Marcucci (2009) também observaram efeito do extrato de própolis sobre cepas de *S. aureus* e *Candida albicans*, não apresentando efeito sobre bactérias Gram negativas.

Oliveira et al. (2012) obtiveram resultados negativos quanto a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis. Em seu estudo, o maior halo de inibição apresentado foi contra *S. aureus*, porém os autores consideraram as concentrações de 20% e 30% insuficientes para revelar atividade inibitória.

Campos (2017) avaliou a atividade antimicrobiana do extrato de própolis verde sobre *S. aureus* e *E. coli*, observando atividade inferior para *E. Coli*. Esses autores verificaram ainda a ineficiência do extrato aquoso sobre as cepas e que a atividade. Gomes et al. (2016) em seu estudo com propolis marrom, verificaram a eficácia de seu extrato contra todas as bactérias Gram positivas e negativas em estudo, garantindo a sua utilização como possível substância antibacteriana. Todavia os autores relatam que a concentração variava de acordo com a espécie e o isolado.

Diferente do que a maioria dos trabalhos na literatura apresentam, Bastos et al. (2011) verificaram potencial atividade antimicrobiana em sete das vinte e três amostras avaliadas de extratos de própolis marrom contra *Escherichia coli*,

indicando que os extratos podem servir no desenvolvimento de novas formulações contra infecções causadas por esta bactéria.

Buriol et al. (2009) observaram em seu estudo que o extrato de própolis foi eficaz contra todas as cepas de microrganismos testados, exceto para *Salmonella typhimurium*, assim como os resultados apresentados por esta pesquisa. Este e outros resultados corroboram com várias pesquisas na literatura que evidenciam efeito positivo dos extratos contra bactérias Gram positivas e atividade limitada ou ausência dela contra cepas Gram negativas (PACKER LUZ, 2007; KAWAKITA et al., 2012; BURIOL et al., 2015; CAMPOS, 2017).

Acredita-se que a atividade antimicrobiana dos extratos está relacionada ao conteúdo de flavonoides, compostos fenólicos e seus derivados. Todavia é importante levar em consideração que o tipo de microrganismo e o solvente utilizado na extração são também fatores relevantes para bons resultados (BURIOL et al., 2009; ALMEIDA et al., 2017).

Os extratos podem ser uma alternativa mais natural e inovadora que visa evitar a proliferação de microrganismos. Tal fato chamaria atenção dos consumidores, que estão cada vez mais seletivos no que se refere à alimentação, buscando produtos de qualidade e que utilizem técnicas mais naturais para preservação das suas propriedades. Logo, a adição de própolis aos alimentos além de garantir numerosos benefícios para o consumidor, traria estabilidade microbiana e qualidade aos alimentos durante o armazenamento (POBIEGA; KRAŚNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

Através destas análises pode-se constatar o efeito dos extratos sobre coliformes a 45 °C, além da eficiência do extrato de própolis verde sobre *Staphylococcus spp.*, o que possibilita sua utilização como agente antimicrobiano. A eficácia maior do extrato de própolis verde confirma o que outros estudos apontam sobre a relação entre compostos fenólicos e sua eficiente atividade antimicrobiana.

6.4 Análises físico-químicas e composição centesimal dos queijos

Fatias de queijo controle juntamente com fatias de queijo aspergidas com os extratos foram submetidas a análises físico-químicas para verificar se os extratos interfeririam nos parâmetros avaliados.

A tabela 7 apresenta os resultados referentes ao pH e acidez das amostras analisadas. O pH das amostras de queijo com extratos de própolis não diferiram entre si nem em relação ao controle, mostrando que a adição do extrato não altera este parâmetro. Em relação à acidez titulável a amostra com extrato de própolis verde diferiu do controle, mas não diferiu da amostra com extrato de própolis marrom, esta por sua vez, não diferiu estatisticamente de nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 7 - Resultados referentes ao pH e acidez titulável das amostra de queijo

Tratamentos	pH	Acidez titulável (% ácido láctico)
Controle	6,57a ± 0,12	1,56b ± 0,25
Ext. Própolis Marrom	6,65a ± 0,02	1,18ab ± 0,12
Ext. Própolis Verde	6,94a ± 0,41	0,95a ± 0,13

*Médias seguidas de letras iguais na coluna indicam que não diferem entre si ($p \geq 0,05$) em relação ao tratamento (teste de Tukey).

Fonte: Elaborada pela autora.

Cavalcante et al. (2007) avaliaram esses mesmos parâmetros para dois tratamentos de queijo em três tempos diferentes (10, 20 e 30 dias). Os valores referentes a pH variaram de 5,17 e 5,29, não apresentando diferença estatística entre si. Para acidez os autores obtiveram resultados variando entre 0,75% e 0,93%, em que somente um dos tratamentos no trigésimo dia apresentou diferença estatística dos demais. Como se pode observar, esses valores mostraram-se inferiores aos apresentados nesta pesquisa. A matéria prima utilizada foi provavelmente a responsável por esta diferença.

Ao avaliar amostras de queijo coalho produzidas artesanalmente em São Rafael-RN, Pereira (2015) obteve valores para pH e acidez de 5,53 a 6,89 e 0,14% a 0,65%, respectivamente. O resultado obtido por este autor para pH foi semelhante aos obtidos nesta pesquisa. Sousa et al. (2014) em seu estudo com queijos produzidos na região Nordeste obtiveram resultados para pH entre 5,18 e 6,23; enquanto para acidez valores entre 0,12% e 1,02%.

Santos e colaboradores (2011) ao analisarem queijo coalho produzido com uma mistura de leite de cabra e vaca obtiveram valores para pH (5,61 - 6,48) semelhantes aos apresentados nesta pesquisa, assim como Correia (2011) em seu estudo com amostras de queijo dos municípios de Sousa e Aparecida - PB, que obteve valores entre 6,52 e 6,78 para este parâmetro, valores próximos aos observados nesta pesquisa.

Freitas, Travassos e Maciel (2013) em um estudo realizado com queijos do estado da Paraíba, verificaram valores referentes a pH entre 4,8 e 5,6 e para acidez valores entre 0,21% e 0,78%. Mamede et al. (2010) obtiveram valores entre 5,88 e 6,27; e 0,53% e 0,91% para pH e acidez respectivamente.

Como observado, a maioria dos trabalhos mostram valores inferiores para acidez quando comparados aos resultados desta pesquisa. Não se pode atribuir tal fato aos extratos, tendo em vista que estes apresentaram resultados semelhantes aos do tratamento controle. A acidez é decorrente da produção de ácido lático a partir da degradação da lactose pelas bactérias e tem influência direta no pH (SOUSA et al., 2014).

Os dados referentes à composição centesimal das amostras são apresentados na tabela 8. As amostras com os extratos apresentaram umidade maior quando comparadas a amostras controle, mas somente a que continha extrato de própolis marrom diferiu das demais. Este resultado deve-se ao fato de que os extratos foram diluídos até obterem concentração de 1% e posteriormente aplicados nos queijos, o que os tornariam mais úmidos.

Os queijos do tipo coalho são classificados como queijos de média e alta umidade, podendo variar de 36% a 54,9%. Logo, todas as amostras se enquadraram no que é estabelecido pela legislação (BRASIL, 1996).

Os percentuais de umidade obtidos nas amostras de queijo são coerentes ainda com os valores apresentados por Pereira (2015) (41,01% - 48,31%), Correia (2011) (40,13% - 47,48%) e Machado et al. (2011) (44,84% - 46,44%). Outros autores apresentaram valores inferiores aos encontrados nesta pesquisa. Sousa et al. (2014) em seu estudo obtiveram percentuais de umidade para queijos coalho que variaram de 14,38% a 29,38%, valores esses que os classificaria como queijos de baixa umidade.

Tabela 8 - Composição centesimal dos queijos analisados

Parâmetros	Tratamentos		
	Controle	Extrato de Própolis Marrom	Extrato de Própolis Verde
Umidade (%)	39,73a $\pm$ 0,12	46,23b $\pm$ 0,75	42,23ab $\pm$ 3,48
Proteína (%)	22,23a $\pm$ 0,27	20,24b $\pm$ 0,28	21,47a $\pm$ 0,44
Lipídeos (%)	15,67a $\pm$ 0,76	15,00a $\pm$ 0,50	15,00a $\pm$ 0,00
Cinzas (%)	4,60a $\pm$ 0,02	3,77b $\pm$ 0,10	4,64a $\pm$ 0,04
Carboidrato (%)	17,77a $\pm$ 1,07	14,76a $\pm$ 0,66	16,66b $\pm$ 3,88

*Médias seguidas de letras iguais na linha indicam que não diferem entre si ($p \geq 0,05$) em relação ao tratamento (teste de Tukey).

Fonte: Elaborada pela autora.

Esses e outros resultados mostram que a umidade de queijos desse tipo é muito relativa e pode variar de um produtor a outro. Cavalcante et al. (2007) afirmam que existe uma relação direta entre o teor de umidade do queijo e a ocorrência de proteólise e, por consequência, mudanças na consistência e no sabor do produto. Tal fato pode ser observado no trabalho em questão, tendo em vista que quanto maior o percentual de umidade nas amostras menores foram os teores de proteína encontrados nas mesmas.

As amostras que continham extrato apresentaram um menor valor para proteínas quando comparadas ao controle. A amostra com própolis marrom diferiu estatisticamente das demais amostras. Santos et al. (2011) apresentaram valores semelhantes aos encontrados nesta pesquisa em seu estudo, em que o percentual referente a proteína presente nas amostras variou entre 19,44% a 25,66%. Freitas et al. (2013) também apresentaram valor semelhante em uma de suas amostras de queijo coalho analisadas (22,64%).

Em relação aos resultados referentes a lipídeos, as amostras apresentaram valores semelhantes entre si, não diferindo estatisticamente, valores estes aproximados dos observados por Santos et al. (2011) (16,83% e 17,0%) e Pereira (2015) (15,0% e 15,08%).

O valor referente a cinzas foi menor na amostra que continha extrato de própolis marrom. Este resultado já era de se esperar pelo valor observado da umidade da amostra. Os demais valores não apresentaram diferença estatística. Valores aproximados para este parâmetro foram observados por Mamede et al. (2010) com valores entre 2,99% e 4,3%. Correia (2011) obteve resultados variando entre 3,28% e 4,03%.

O valor referente aos carboidratos foi obtido por diferença da soma dos demais. Somente a amostra que continha extrato de própolis verde apresentou diferença estatística.

Os resultados apresentados pela pesquisa mostram que a utilização dos extratos não altera de forma significativa a qualidade físico-química do queijo, não sendo um empecilho para ser utilizada. Vale ressaltar que, as concentrações utilizadas dos extratos foram bem baixas e isso pode justificar tais resultados.

6.5 Análises Microbiológicas

Os queijos utilizados na análise sensorial foram obtidos diretamente da fábrica, devidamente embalados, acondicionados e transportados ao laboratório, acompanhados de certificado de qualidade assinado pelo indivíduo responsável pelo Controle de Qualidade da empresa, garantindo que o mesmo foi produzido em condições adequadas e que não apresentavam nenhum risco à saúde humana. Por este motivo, apenas o extrato foi submetido aos testes microbiológicos, tendo em vista que foram produzidos artesanalmente no laboratório.

As soluções de extrato de própolis marrom e verde foram submetidas a análises microbiológicas para a determinação de Coliformes a 35 °C e a 45 °C, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras, seguindo a metodologia proposta pela APHA (2001). Os resultados estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Análises microbiológicas dos extratos

Análises	Extrato de Própolis Marrom	Extrato de Própolis Verde
Coliformes a 35 °C (NMP/g)	< 3,0	< 3,0
<i>Salmonella spp</i> (Presença ou Ausência)	Ausência	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/ml)	< 10,0	< 10,0
Bolores e Leveduras (UFC/ml)	< 10,0	< 10,0

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que não ocorreu crescimento para nenhum dos testes microbiológicos realizados, e por isso os extratos estavam adequados para a utilização e próprios para o consumo.

6.6 Análise sensorial

Participaram do teste sensorial 30 avaliadores não treinados, sendo 23,3% do sexo masculino e 76,7% do sexo feminino. No que se refere à faixa etária, 23,33% apresentaram idade de 18 a 20 anos, 73,44% eram maiores de 20 e menores que 30 anos, e 3,33% com idade entre 40 e 50 anos. Em relação ao grau de escolaridade 83,33% ensino superior incompleto, 6,67% dos avaliadores possuíam ensino superior completo, 3,33% pós-graduação incompleta e 6,67% pós-graduação completa.

Após a realização do teste sensorial de comparação múltipla os valores atribuídos por cada avaliador para cada um dos atributos analisados em cada tratamento foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey com 5% de significância. A tabela 10 apresenta os resultados.

Tabela 10 - Análise sensorial das amostras de queijo com extrato de própolis

Tratamentos	Sabor	Odor
Controle	1,63a ± 1,39	1,27a ± 1,22
Ext. Própolis Marrom	1,63a ± 1,25	1,13a ± 1,11
Ext. Própolis Verde	1,52a ± 1,28	1,22a ± 1,18

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na coluna indicam que não há diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste de tukey ($p \geq 0,05$).

Fonte: Elaborada pela autora.

De acordo com a escala utilizada essas médias situaram entre 1 (diferença muito ligeira) e 2 (diferença ligeira/moderada), não foi possível observar diferença entre si nem em relação ao controle. Tais resultados indicam que, a utilização dos extratos não alterou os atributos sabor e odor avaliados nos queijos.

Ao analisar o percentual de cada ponto da escala observa-se que, nos queijos revestidos com extrato de própolis verde o maior percentual de julgamentos (30%) correspondeu à resposta “diferença muito ligeira” (1), o mesmo ocorreu com os queijos revestidos com extrato de própolis marrom (35%).

Para o atributo odor, 33% dos julgamentos, foram também referentes à resposta “diferença muito ligeira” (1) para extrato de própolis verde, enquanto para os queijos revestidos com extrato de própolis marrom foi a resposta “nenhuma diferença do controle” correspondente a 37% dos julgamentos.

Kameyama et al. (2008) realizaram um teste sensorial de ordenação-preferencia com cenouras minimamente processadas submetidas a sanitização com três soluções: solução clorada (200 mg/L), solução clorada mais um revestimento comestível (0,4% m/v) e solução de própolis (0,4% m/v). O teste foi realizado com 43 provadores e os autores observaram que não houve diferença estatística significativa em relação à preferencia do sabor entre os diferentes tratamentos. Logo, mesmo se tratando de um teste diferente do utilizado nesta pesquisa, observa-se que o extrato não influenciou nas características sensoriais do produto.

Corrêa (2017) realizou um teste de comparação múltipla com queijo gorgonzola revestido com extrato de própolis verde nas concentrações de 5% e 10%. Como resultado, houve diferença significativa das amostras com extrato em relação ao controle para o atributo sabor, onde as notas média situaram-se entre 1

(diferença ligeira) e 3 (diferença moderada). Em relação ao atributo odor, houve diferença significativa entre todas as amostras avaliadas, onde a maior adição do extrato resultou em uma maior média. O teste utilizado nessa pesquisa foi uma adaptação do que foi utilizado neste estudo. Desta forma, observa-se que a utilização dos extratos em relação aos atributos sensoriais é mais viável em concentrações mais baixas.

Neves e Lima (2010) realizaram um teste sensorial de Preferência - Escala Hedônica e Intenção de Compra em néctares de acerola adicionados de extrato de própolis. Na primeira etapa, eles avaliaram néctares com concentrações de 1% a 10% para determinar a de maior aceitabilidade. Posteriormente, as concentrações foram diminuídas utilizando a mais aceita (1%) como referência. Os néctares nas concentrações de 0,5%, 0,75% e 1,0% foram avaliados quanto ao sabor, cor, aroma e aspecto global. As médias obtidas revelaram que os provadores “gostaram” dos néctares com 0,5% de extrato de própolis adicionado e “nem gostaram nem desgostaram” dos néctares com concentrações de 0,75% e 1,0%, revelando ainda que comprariam os mesmos nas três concentrações. Os resultados apresentados por esse estudo reafirma o que já foi observado em outros trabalhos, onde quanto menor é a concentração dos extratos, mais bem aceito são os produtos no qual esses são adicionados.

Reis et al. (2017) observaram baixo percentual de aceitação de hambúrgueres adicionados de extratos microencapsulados de coprodutos da própolis e atribuíram tal fato ao sabor característico e cheiro de própolis que permaneceu no produto.

A análise sensorial é de suma importância quando se trata de novos alimentos ou novas substâncias adicionadas a eles, mostrando ser possível ou não a sua utilização. A partir dos resultados desta análise observa-se que os extratos nas concentrações estudadas não trouxeram prejuízos sensoriais aos queijos, possibilitando sua utilização.

7 CONCLUSÃO

A semelhança com os resultados apresentados na literatura permite concluir que os extratos apresentavam características adequadas para serem utilizados nos testes posteriores. A variação nos resultados se deu devido principalmente aos tipos de própolis utilizadas.

Os extratos apresentaram um bom conteúdo de compostos fenólicos, onde o extrato de própolis verde se destacou por apresentar maiores valores. Em relação aos flavonoides, o extrato de própolis verde apresentou maior conteúdo, o que pode justificar a maior eficiência contra *Staphylococcus aureus*.

Neste trabalho, foi verificado o potencial antimicrobiano do extrato de própolis sobre três espécies de microrganismos (*Salmonella typhi*, *E. coli* *Staphylococcus aureus*). O uso de diferentes tipos de própolis (marrom e verde) permitiu avaliar, além da eficiência, se essas apresentavam efeitos diferentes, tanto entre elas, quanto entre as bactérias em estudo.

O extrato de própolis marrom exerceu atividade antimicrobiana com concentração mínima inibitória de 1,0% para as três espécies de bactérias em estudo. Esta atividade foi observada também com a própolis verde para *Salmonella typhi* e *E. coli*. O *Staphylococcus aureus* apresentou sensibilidade ao extrato de própolis verde em concentrações inferiores (0,25%).

Os testes referentes à atividade antimicrobiana dos extratos em queijo coalho comprovaram uma redução do crescimento de coliformes a 45°C. O extrato de própolis verde também se mostrou eficiente contra *Staphylococcus spp.* Os extratos não apresentaram efeitos sobre as espécies de *Salmonella*.

Em relação aos parâmetros físico-químicos e composição das amostras de queijo, os resultados obtidos permitem concluir que os extratos não causaram alterações significativas na composição do produto.

Embora apresentem odor e sabor característicos, os extratos nas concentrações utilizadas nos queijos não interferiram nos atributos sensoriais, sabor e odor, permitindo concluir que tal fato não seria um empecilho para a utilização dos mesmos nesse produto.

Este trabalho contribuiu de forma significativa por se tratar de uma alternativa inovadora que visa melhorar a qualidade de um produto regional e

bastante apreciado. As baixas concentrações de extrato de própolis permitem ainda concluir que teria um bom custo-benefício.

Sugerem-se como estudos futuros testes utilizando concentrações maiores para verificar a eficácia dos extratos sobre outras espécies de microrganismos, bem como testes físico-químicos e sensoriais que permitem comprovar se tais concentrações interfeririam nas características do produto.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. T. C.; SILVA, M. C. D.; OLIVEIRA, J. M. S.; KAMIYA, R. U.; ARRUDA, R. E. S.; VIEIRA, D. A.; SILVA, V. C.; ESCODRO, P. B.; BASÍLIO-JÚNIOR, I. D. NASCIMENTO, T. G. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280 - 287, 2017.
- ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 37 - 41, 2013.
- American Public Health Association (APHA). (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 ed. Washington: APHA. 676.
- ANDRADE, A. A. **Estudo do perfil físico-químico e aceitação de queijo coalho produzido no estado do Ceará**. 2006. 126p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Departamento de tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- AOAC. Official methods of analysis of the association of analytical chemists. Transinf [Internet]. 1992 [acesso em 2015 jul 10] Disponível em: www.conapis.com.br/legislacao.htm.
- ARAUJO, J. M.; CARVALHO, M. DA S. Fabricação de produto a base de própolis no combate a formação de biofilme microbológico na indústria de alimentos. **Revista GEINTEC**, São Cristóvão, v. 5, n. 1, p. 1674 - 1682, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official methods of Analysis**. 18^a ed., Gaithersburg, Maryland, 2005. 771p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY -AOAC. **Association of Official Analytical Chemist Official Methods of Analysis**. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.
- AZEREDO, H. M. C.; BRITO, E. S. Fundamentos dos principais métodos não convencionais de conservação de alimentos. In: **Fundamentos de Estabilidade de Alimentos**. 2^a ed. Brasília - DF: Embrapa, 2012. Cap. 6. p. 186 - 221.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistência aos antibióticos**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências e tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, 2013.
- BARBOSA, S. R. M.; CABRAL, G. H.; DA COSTA, L. A. M. A.; FLACH, A. Teor de fenólicos e atividade antioxidante de própolis em áreas de floresta e savana de Roraima. **RCT - Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 3, 2016.

- BASTOS, E. M. A. F.; GALBIATI, C.; LOUREIRO, E. M.; SCOARIS, D. O. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1255 - 1259, 2011.
- BINOTI, M. L.; RAMOS, A. M. Conservação de alimentos : uma visão mais saudável. **Hu Revista**, Juiz de Fora, v. 41, n. 3 e 4, p. 171 - 179, 2015.
- BODINI, R. B.; SOBRAL, P. J. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; CARVALHO, R. A. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, s/n, p. 104 - 110, 2013.
- BONVEHÍ, J. S.; GUTIÉRREZ, A. L. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Propolis from the Basque Country (Northeastern Spain). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, s/n, p. 1387 - 1395, 2011.
- BORGES, M. DE F.; NASSU, R. T.; PEREIRA, J. L.; ANDRADE, A. P. C. DE; 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. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 5, p. 1431 - 1438, 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45. 2001c.
- BRASIL. Lei nº 13.680, de 14 de junho de 2018. Altera a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, para dispor sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário oficial da União**, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 30, de 26 de Junho de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, 2001a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Instrução normativa nº 68, de 12 dezembro de 2006. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Defesa Animal. Legislações. Legislação por Assunto. Legislação de Produtos Apícolas e Derivados. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geléia real, geléia real

lioofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, nº 12, seção 1, p. 59, 13 de junho de 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Homeopática Brasileira**. 3 edição. 2011.

BREYER, H. F. E.; BREYER, E. D. H.; CELLA, I. **Produção e beneficiamento da própolis**. Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Santa Catarina, 2016.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; DOS SANTOS, J. M. T.; DA ROSA, M. R.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R.; SANTA, H. S. D.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; FERREIRA, P. M. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: Uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

CAMPOS, J. V. **Avaliação da atividade antimicrobiana e análise morfológica por microscopia de força atômica (AFM) da ação de extratos de própolis verde sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2017. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologias, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2017.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CAVALCANTE, J. F. M.; ANDRADE, N. J. DE; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. DE L. F.; PINTO, C. L. DE O.; ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 205 - 214, 2007.

CORRÊA, F. T. **Ação antimicrobiana da própolis verde em microrganismos isolados e identificados na superfície de queijo tipo gorgonzola Lavras - MG**. 2017. 58 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

CORREIA, L. J. H. **Diagnóstico das condições ambientais e avaliação dos riscos microbiológicos no processamento de queijo de coalho**. 2011. 207 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade federal de campina Grande, Campina Grande, 2011.

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

DA SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842 - 1848, 2006.

DE-MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; FREITAS, A DA S. DE.; BARTH, O. M.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. DE. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 44, n. 3, p. 341 - 348, 2014.

DOS SANTOS, C. R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E. S.; LÚCIO, E. M. R. A.; ARAÚJO, G. L.; TEIXEIRA, L. A.; SHARAPIN, N.; ROCHA, L. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 71 - 74, 2003.

DUTCOSKY, Silva Deboni. **Análise Sensorial de Alimentos**. 3 ed. Ver. E ampl. Curitiba: Champagnat, 2011. 426 p.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial Biotecnológico de Quitosana em Sistemas de Conservação de Alimentos. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435 - 451, 2008.

FERNANDES, J. Produção de queijo origem dos coalhos. **AGROTEC: Revista técnico-científica agrícola**, Portugal, v. 6, n. 8, p. 101 - 103, 2013.

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

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 171 - 178, 2006.

Fundação Cearense de Apoio ao desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP. **Pesquisa apoiada pela FUNCAP busca baratear preço e melhorar a qualidade do queijo coalho**. Disponível em: <<https://www.funcap.ce.gov.br/2016/07/29/pesquisa-apoiada-pela-funcap-busca-baratear-preco-e-melhorar-a-qualidade-do-queijo-coalho/>>. Acesso em : 20 junho 2019.

GOMES, M. F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V.; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279 - 282, 2016.

- GUTIERREZ-GONÇALVES, M. E. J.; MARCUCCI, M. C. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante da Própolis do Estado do Ceará. **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, p. 81 - 86, 2009.
- HEIMBACH, N. S.; ITAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ITAVO, L. C. V.; SILVA, J. A.; SILVA, P. C. G.; REZENDE, L. C.; GOMES, M. F. F. Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano in vitro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 65 - 72, 2016.
- KAMEYAMA, O.; ABRÃO, J. J.; TEIXEIRA, J. M. DE A.; ANDRADE, N. J. DE; MININ, V. P. R.; SOARES, L. S. Extrato de própolis na sanitização e conservação de cenoura minimamente processada. **Revista Ceres**, v. 55, n. 3, p. 218 - 223, 2008.
- KAWAKITA, E. T.; SOUZA, E. A.; UEHARA, D. M.; ORSI, R. O. Avaliação da vida útil do extrato hidroalcoólico de própolis mantido sob diferentes temperaturas de armazenamento de armazenamento. **Atas de Saúde Ambiental - ASA**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 33 - 46, 2015.
- KHAN, A. S.; MATOS, V. D.; SALES LIMA, P. V. P. Desempenho da apicultura no estado do Ceará: Competitividade, nível tecnológico e fatores condicionantes. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Piracicaba, v. 47, n. 3, p. 651 - 675, 2009.
- LEONARDI, J. G.; AZEVEDO, B. M. Métodos de conservação de alimentos. **Revista Saúde em Foco**, s/v, n. 10, p. 51 - 61, 2018.
- LIMA, A. O. D. **Produção de própolis por abelha melífera africanizada (*Apis melífera* L) na caatinga do Baixo Jaguaribe cearense**. 2012. 92 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- LIMA, L. S. C. **Caracterização físico-química e atividades antioxidante e antimicrobiana de própolis produzidas em colônias de abelhas *Apis mellifera* L. na região Noroeste do Estado do Ceará / Lidiana Souza Correia Lima**. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia de Alimentos). Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Ceará, Limoeiro do Norte, 2015.
- LOZINA, L. A.; PEICHOTO, M. E.; ACOSTA, O. C.; GRANERO, G. E. Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 1, p. 102 - 110, 2010.
- LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447 - 454, 2008.
- MACHADO, G. DE M.; COSTA, R. G. B.; PAULA, J. C. J.; PAIVA, P. H. C.; TAVEIRA, L. B.; ALMEIDA, F. A. Viabilidade tecnológica do uso de ácido láctico na fabricação de queijo de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 379, p. 1 - 15, 2011.

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

MANTILLA, S. P. S.; SANTOS, E. B.; BARROS, L. B. DE; FREITAS, M. Q. DE. Análise descritiva quantitativa aplicada em mel de abelhas (*Apis mellifera*): Uma revisão. **Colloquium Agrariae**, v. 8, n. 2, p. 75 - 84, 2012.

MATSUDA, A. H. **Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil**. 2006. 122p. Dissertação (Mestrado). Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

MELLO, B. C. B. D. S.; PETRUS, J. C. C.; HUBINGER, M. D. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 166 - 172, 2010.

MELO, A. A. M.; MATSUDA, A. H.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. DE. Identidade e qualidade da própolis proveniente de quatro regiões do Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 540 - 548, 2012.

NASSU, Renata Tieko; MACEDO, Benemária Araújo; LIMA, Márcia Helena Portela. **Queijo de Coalho**. Agroindústria Familiar. 1ª ed. Brasília, 2006. 40p.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard - Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2003.

NEVES, M. V. M.; LIMA, V. L. A. G. Avaliação sensorial e caracterização físico-química de néctar de acerola adicionada de extrato comercial de própolis. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 3, p. 399 - 405, 2010.

NOGUEIRA, M. A.; DIAZ, M. G.; TAGAMI, P. M.; LORSCHIDE, J. Atividade microbiana de óleos essenciais e extratos de própolis sobre bactérias cariogênicas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 93 - 97, 2007.

OLIVEIRA, K. A. DE M.; OLIVEIRA, G. V. DE.; BATALINI, C.; ROSALEM, J. A.; RIBEIRO, L. S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 211 - 222, 2012.

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

- OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos**. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.
- OSÉS, S. M.; PASCUAL-MATÉ, A.; FERNÁNDEZ-MUIÑO, M. A.; LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; SANCHO, M. T. Bioactive properties of honey with propolis. **Food Chemistry**, v. 196, s/n, p. 1215 - 1223, 2016.
- PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. DA. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102 - 107, 2007.
- PAULA, J. C. J. DE; CARVALHO, A. F. DE; FURTADO, M. M. Princípios Básicos de Fabricação de Queijo: do Histórico à Salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 367, n. 64, p. 19 - 25, 2009.
- PAULA, M. F.; SANTOS, A. J. DOS; SILVA, J. C. G. L. DA; JUNIOR, R. T.; HOEFLICH, V. A. Dinâmica das Exportações de Mel Natural Brasileiro no Período de 2000 a 2011. **Floresta e Ambiente**, v. 22, n. 2, p. 231 - 238, 2015.
- PEREIRA, D. A. **Extração aquosa de própolis e secagem em leite de espuma para uso me alimentos**. 2008. 87 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.
- PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: Métodos analíticos**. 2 ed. Ver. Ampl. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 234p.
- PEREIRA, R. B. DE M; FONTE, R. A. B.; BARROS, D. M.; MACHADO, E. C. L.; OLIVEIRA, M. G.; MOURA, D. F. Quitosana em queijo Minas frescal: ação antibacteriana sob cepa patogênica e nos atributos sensoriais. **Brazilian Journal of health Review**, v. 1, n. 2, p. 342 - 363, 2018.
- PEREIRA, T. M. DA F.; GÓIS, V. A. DE; SOARES, K. M. DE P.; SOUZA, L. B. DE; SOUSA, J. A. DE. *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp* . em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Pombal, v.12, n. 2, p. 358 - 361, 2017.
- PEREIRA, T. M. DA F. **Tecnologias de gestão e a qualidade do produto: um estudo em queijarias artesanais de São Rafael - RN**. 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Ambiente, Tecnologia e Sociedade). Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2015.
- PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293 - 300, 2004.
- POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, s/n, p. 53 - 62, 2019.

QUEIROGA, C. F. M. A. DE; FILHO, F. G. L.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. DE O. Cadeia Produtiva do Mel de Abelhas: Fonte Alternativa de Geração de Renda para Pequenos Produtores e Qualidade Físico-química do Mel. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Garanhuns, v. 5, n. 1, p. 24 - 30, 2015.

REIS, A. S. DOS; DIEDRICH, C.; MOURA, C.; PEREIRA, D.; ALMEIDA, J. F.; SILVA, L. D.; PLATA-OVIEDO, M. S. V.; TAVARES, R. A. W.; CARPES, S. T. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at - 15 °C. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, s/n, p. 306 - 313, 2017.

SABBAG, O. J.; NICODEMO, D. Viabilidade Econômica Para Produção De Mel Em Propriedade Familiar. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 94 - 101, 2011.

SALGUEIRO, F. B.; CASTRO, R. N. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1192 - 1199, 2016.

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

SANTOS, B. M.; OLIVEIRA, M. E. G.; SOUSA, Y. R. F.; MADUREIRA, A. R. M. F. M.; PINTADO, M. M. E.; GOMES, A. M. P.; SOUZA, E. L.; QUEIROGA, R. C. R. E. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 302 - 310, 2011.

SILVA, A. C. C.; RICARTE, F. S.; MACHADO, A. V.; COSTA, R. O. Sensibilidade de Agentes Bacterianos Patogênicos Frente à Ação Antibacteriana da Própolis. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, Garanhuns, v. 5, n. 1, p. 07 - 13, 2015.

SILVA, G. L.; COELHO, M. C. S. C.; COELHO, M. I. S.; LIBÓRIO, 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, L. Por uma leitura sociotécnica da história da criação de abelhas no Brasil: análise à luz da Social Construction of Technology (SCOT). **Revista do Curso de Ciências Sociais da UFSC**, v. 7, n. 7, p. 1 - 15, 2014.

SILVA, N. V. DA; PAIVA, A. C. C. DE; MEDEIROS, A. P. DE; MEDEIROS, A. C. DE; SILVA, O. S. DA; MARACAJA, P. B.; LIMA, C. J. DE; OLIVEIRA, C. G.; NETA, F. B. DE O. Produção de mel no município de São Rafael : um estudo de caso com base na experiência da Associação dos Apicultores do Desterro. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental**, Pombal, v. 11, n. 1, p. 112 - 118, 2017.

- SILVA, R. A.; RODRIGUES, A. E.; RIBEIRO, M. C. M.; CUSTÓDIO, A. R.; ANDRADE, N. E. D.; PEREIRA, W. E. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1842 - 1848, 2006.
- SINHORINI, W. A.; BORDIN, J. T.; VIGNOTO, V. K. C.; CARDOZO, R. M.; MARTINS, R. R.; WOSIACKI, S. R. Atividade antibacteriana in vitro da própolis testadas em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 107 - 111, 2014.
- SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, v. 61, s/n, p. 695 - 702, 2016.
- SOARES, A. L. F.; BILEZIKDJIAN, P. J.; ELIAS, P. G.; MEDEIROS, P. C. M.; SOUZA, L. A. DE. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis. **Revista Gestão em Foco**, v. 9, n. s/n, p. 255 - 275, 2017.
- SOUSA, A. Z. B.; ABRANTES, M. R.; SAKAMOTO, S. M.; SILVA, J. B. A.; LIMA, P. DE 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 de Biologia**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 30 - 35, 2014.
- SOUZA, Darcet Costa. **Apicultura: Manual do Agente de Desenvolvimento Rural**. 2 ed. Brasília: Sebrae, 2007. 186 p.
- STATSOFT. **STATISTICA for Window - Computer programa manual**. Versão 7.0. Tulsa: Statsoft Inc. 2007.
- TAGLIACOLLO, V. A.; ORSI, R. D. O. Quality of propolis commercialized in the informal market Qualidade da própolis comercializada no mercado informal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 3, p. 752 - 757, 2011.
- THAMNOPOULOS, I. A. I. MICHAELIDIS, G. F.; FLETOURIS, D. J.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. ANGELIDIS, A. S. Inhibitory activity of propolis against *Listeria monocytogenes* in milk stored under refrigeration. **Food Microbiology**, v. 73, s/n, p. 168 - 176, 2018.
- VIERA, V. B. **Obtenção do extrato de própolis assistida por micro-ondas, aplicação em linguça toscana e avaliação da sua capacidade antioxidante**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Centro de ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.
- ZABAIU, N.; FOUACHE, A.; TROUSSON, A.; BARON, S.; ZELLAGUI, A.; LAHOUEL, M.; LOBACCARO, J. M. A. Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 207, s/n, p. 214 - 222, 2017.

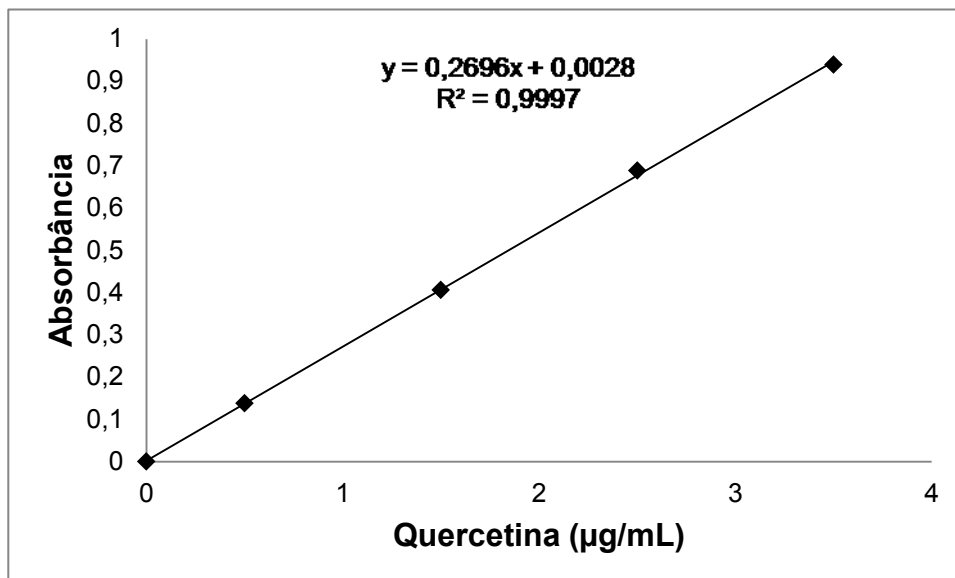
ANEXO A - CERTIFICAÇÃO DA QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA

Declaro para os devidos fins que eu
Georgina Darb Maia
Gourmet de Produção, portadora do CPF nº 005.833.023-10 e
 RG nº 2003005354242, atesto a garantia de qualidade
 higiênico-sanitária dos queijos elaborados na data 20 / 06 / 2019 com prazo de
 validade de seisenta dias, na empresa Laticínio Lá de Casa
 CNPJ 06.880.740/0001-46, para a Sra. Mayara Salgado Silva, residente em
 Limoeiro do Norte – CE.

Limoeiro do Norte, 26 de Junho de 2019.

Georgina Darb Maia
 Carimbo e assinatura do declarante responsável

**APÊNDICE A - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE
FLAVONOIDES**



Fonte: Elaborado pela autora.

APÊNDICE B - TESTE DE COMPARAÇÃO MÚLTIPLA**NOME:** _____**DATA:** ____/____/____**SEXO:** () Masculino () Feminino**ESTUDOS:** () Sem estudos () Fundamental () Médio () Superior () Pós-graduação
() Incompleto () Completo**FAIXA ETÁRIA - Anos:** () 15-20 () > 20-30 () > 30-40 () >40-50 () >50-60 () >60

Você está recebendo uma amostra controle e três amostras codificadas de queijo coalho. Prove a amostra **controle** e em seguida cada uma das amostras codificadas e avalie na escala de 0 a 6 o quanto cada amostra difere da amostra controle em relação ao sabor e odor.

0 - Nenhuma diferença do controle

1 - Diferença muito ligeira

2 - Diferença ligeira / moderada

3 - Diferença moderada

4 - Diferença moderada / grande

5 - Diferença grande

6 - Diferença muito grande

Amostra**Sabor****Odor**

Comentários _____

Fonte: Adaptado de Corrêa (2017).

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DIFERENTES EXTRATOS DE PRÓPOLIS SOBRE
MICRORGANISMOS EM QUEIJO TIPO COALHO**

Você está sendo convidado a participar como voluntário de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e Objetivos:

O objetivo desta pesquisa é avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes extratos de própolis sobre microrganismos patógenos e deteriorantes em queijo do tipo coalho, avaliando ainda suas propriedades físico-químicas, a qualidade microbiológica e sensorial, comparando amostras com e sem extrato de própolis.

A realização do trabalho justifica-se por tratar de uma alternativa que pode ser utilizada pela indústria em substituição aos antimicrobianos sintéticos, podendo aumentar a vida útil do produto, sem causar alterações sensoriais.

Procedimentos:

Participando do estudo você está sendo convidado a: realizar um teste sensorial, onde você receberá amostras codificadas de queijo tipo coalho com e sem extrato de própolis. Receberá também uma ficha onde avaliará o quanto as amostras com os extratos diferem da amostra controle (sem extrato), através de uma escala. Esse teste sensorial será realizado nas dependências do Instituto

Federal de Educação, Ciência e Tecnologia *Campus* Limoeiro do Norte e a sua duração estimada é de 15 a 25 minutos. As respostas serão guardadas sem identificação nos resultados.

Desconfortos e Riscos:

Os riscos são mínimos, como por exemplo, sentir desconforto digestivo caso tenha intolerância ou alergia a algum componente presente na preparação, como leite ou própolis. Para reduzir este risco, a pesquisadora fará algumas perguntas ao participante antes de iniciar a análise sensorial, com o intuito de identificar uma possível alergia ou intolerância.

Serão excluídas da pesquisa pessoas que apresentarem alguma intolerância ou alergia aos componentes presentes no produto.

Caso apresente constrangimento em responder, você poderá não aceitar participar da pesquisa ou desistir a qualquer momento.

Benefícios:

A pesquisa apresenta benefícios em poder incorporar resultados positivos ou negativos, e assim ajudar na busca de melhorias a produtos alimentícios destinados ao consumo humano, que melhorem a vida útil do mesmo e ainda a qualidade de vida dos consumidores. Sua ajuda seria de grande importância.

Acompanhamento e Assistência:

Você será acompanhado durante toda a realização da pesquisa. Caso haja algum desconforto físico durante o teste, você será encaminhado ao hospital mais próximo para possível atendimento médico.

Sigilo e Privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de

pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado.

Ressarcimento e Indenização:

Será garantido ao participante desta pesquisa o ressarcimento diante de alguma despesa necessária no decorrer do estudo.

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores:

LORENA LÍGIA DE LIMA MONTEIRO. Endereço – Rua: José Carneiro, 1244, Pitombeira, Limoeiro do Norte – CE. Telefone: (88) 9 99570455. E-mail: lorenaligialima@gmail.com.

MAYARA SALGADO SILVA: Endereço: Instituto Federal *Campus* Limoeiro do Norte, situado na Rua Estevam Remígio, n. 1145, Centro, Limoeiro do Norte- CE. Telefone: (85) 34012332. Email: silvams@ifce.edu.br

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IFCE das 08:00 h às 12:00 h e das 13:00 h as 17:00 h no IFCE Reitoria - R. Jorge Dumar, 1703 - Jardim América, Fortaleza - CE, 60410-426; fone (85) 34012332 e-mail: cep@ifce.edu.br.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar e declaro estar recebendo uma via original deste documento assinada pelo pesquisador e por mim, tendo todas as folhas por nós rubricadas:

Nome do(a) participante:

Contato telefônico (opcional):

E-mail (opcional):

(Assinatura do participante)

Data: ____/____/____.

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Nomes e assinaturas das pesquisadoras responsáveis:

Mayara Salgado Silva

(Coordenadora)

Lorena Ligia de Lima Monteiro Oliveira

(Pesquisadora)

Data: ____/____/____