

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA, NÃO LÁTICA E
UTILIZAÇÃO DO TRATAMENTO ÔHMICO PARA
PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE COALHO

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira
Soares

RECIFE

2010

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA LÁTICA, NÃO LÁTICA E UTILIZAÇÃO
DO TRATAMENTO ÔHMICO PARA PROCESSAMENTO DE QUEIJO DE
COALHO

Tese apresentada à Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Ciência Veterinária,
para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti
Vieira Soares

RECIFE
2010

TORQUATO MARQUES DOS SANTOS NETO

Caracterização da Microbiota Lática, Não Lática e Utilização do Tratamento Ôhmico para Processamento de Queijos

Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, para obtenção do título de Doutor

APROVADO EM: 30 de junho de 2010

Membros Titulares:

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto – DMFA – UFRPE

Profa. Dra. Tatiana de Souza Porto – UFRPE

Profa. Dra. Keila Aparecida Moreira – UFRPE - UAG

Profa. Dra. Galba Maria de Campos Takaki – UNICAP

Profa. Dra. Laura Maria Bruno - EMBRAPA AGROINDÚSTRIA

Membros Suplentes:

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota –DMV-UFRPE

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva -DMV-UFRPE

Ao meu avô, *in memoriam* Torquato Marques dos Santos, que com atos e palavras demonstrou o sentido da honestidade, amizade e respeito pelo próximo. Você foi e sempre será meu exemplo de vida. Obrigado pelo seu amor e dedicação.

À minha avó, Iris Cox dos Santos, por seus incansáveis dedicação e apoio, em especial nesta etapa de minha vida, sendo exemplo de tenacidade e perfeccionismo.

Ao meu pai, por me fazer acreditar que sempre podemos melhorar ao longo dos nossos dias, desde que para isso nos empenhemos.

À minha mãe, exemplo de abdicção, me fazendo enxergar muito além do que os olhos podem ver.

À minha família, alicerce de toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor e Luz de minha vida, pela saúde, força, sabedoria e conforto durante este curso de pós-graduação.

À Professora Ana Lúcia Figueiredo Porto por toda orientação, paciência e dedicação fundamentais para a conclusão deste curso de doutorado.

À professora Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, por sua co-orientação, idéias e sugestões elucidadoras.

Ao LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, por toda a estrutura física e humana oferecida, possibilitando a execução deste projeto.

Ao Professor José Luis Lima Filho, diretor do LIKA, por ter permitido que fossem utilizadas as instalações e equipamentos para a conclusão deste trabalho.

Aos professores José António Couto Teixeira e Lucília Maria Alves Ribeiro Domingues por sua colaboração, sugestões e ajuda nos momentos que necessitei.

A todos do corpo docente e discente da Universidade do Minho e demais funcionários, que em muito me ajudaram, quer fosse na fase de adaptação, quer fossem nas orientações tornando possível a execução da pesquisa naquela instituição de ensino Portuguesa.

À CAPES pela bolsa sanduíche concedida para Universidade do Minho e Universidade de São Paulo (PROCAD-NF - 2007); aos órgãos de fomento tecnológico – FACEPE, FINEP pelo apoio financeiro.

Ao Professor Dr. Adalberto Pessoa Júnior, pelo apoio para a realização dos experimentos realizados na Universidade de São Paulo – USP

À Professora Dra. Thereza Christina Vessoni Penna pela colaboração durante os experimentos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.

À Professora Dra. Dr^a Susana Marta Isay Saad pela apoio logístico para a realização de experimentos na Universidade de São Paulo, no Departamento

de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, área de Tecnologia de Alimentos.

À Professora Dra. Evelise Oliveira Telles pela importante ajuda durante a realização de experimentos no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS - USP - São Paulo.

A todo o corpo discente e funcionários da Universidade de São Paulo – USP, pelo apoio durante a realização dos trabalhos.

Aos meus amigos, pela valiosa contribuição através dos seus conhecimentos, idéias e amizade, fundamentais para a realização dos experimentos da tese.

Aos professores da Pós-graduação, pela amizade, ajuda e informações repassadas ao longo do curso de Doutorado em Ciência Veterinária. Serei eternamente grato.

Aos funcionários da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela ajuda fundamental ao término do experimento, incentivo e amizade em especial atenção a Sra. Edna Cherias e o Sr. Tom Menezes, por sua ajuda e dedicação para a solução dos assuntos concernentes às questões sócio-educativas.

Aos produtores e suas famílias que permitiram, com a hospitalidade sempre grandiosa e peculiar ao homem do campo, a coleta das amostras de queijo de coalho utilizadas no experimento.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a conclusão desta etapa de minha vida.

RESUMO

O Queijo de coalho é tradicionalmente produzido de modo artesanal em pequenas propriedades localizadas nos estados do Nordeste brasileiro a partir do leite cru sem adição de culturas iniciadoras. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota do queijo de coalho produzido a partir de leite cru em 5 municípios da bacia leiteira do Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil e testar o aquecimento ôhmico enquanto alternativa de pasteurização do leite de vaca a ser utilizado para a produção do queijo de coalho. Um total de 500 bactérias foi isolado nos municípios estudados, sendo que 370 amostras (74%), apresentaram características de bactérias ácido – lácticas (BALs). Dentre as BALs o *Lactococcus lactis* apresentou a frequência de 78,38% em relação às demais; *Enterococcus faecalis* (18,92%) e *Leuconostoc* spp (2,77%). Foram escolhidas aleatoriamente 38 amostras de BALs identificadas por provas morfotintoriais e bioquímicas, destas 84,21% foram confirmadas por sequenciamento do gene 16S rRNA. Entre as bactérias não ácido lácticas o *Bacillus cereus* obteve 42,31% de frequência das médias observadas nos municípios estudados. O leite cru, após ser submetido ao aquecimento ôhmico apresentou ausência da fosfatase e presença da peroxidase, além da diminuição da carga microbiana. A partir dos dados encontrados para os queijos produzidos pelo leite obtido após aquecimento ôhmico foi constatado que os mesmos não se enquadram na denominação “média umidade” (de 36,0 a 45,9g/100g) definida para o queijo de coalho pela Resolução nº7 de 28 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, caracterizando-se como queijos de alta umidade (entre 46,0 e 54,9g/100g, de acordo com a Portaria nº 146, de 07 de março de 1996). Houve uma maior aceitabilidade do queijo produzido a partir do leite ôhmico se comparado com o queijo produzido a partir do leite pasteurizado. O conhecimento da microbiota do queijo de coalho artesanal poderá ser um passo inicial para ser identificado como produto de indicação geográfica (IG). Os resultados indicam que o aquecimento ôhmico poderá ser introduzida como processo de pasteurização de leite sem influenciar negativamente a sua qualidade.

ABSTRACT

The curdle Cheese traditionally is produced in artisan way in small properties located in the States northeast Brazilian from raw milk without addition of cultures starters. The objective of this work was to characterize microbiot of the curdle cheese produced from raw milk of the milk basin of the State of Pernambuco, north-eastern of Brazil and to test alternative the ohmic heating while of pasteurization of the cow milk to be used for the production of the curdle cheese. A total of 500 bacteria had been isolated in the 5 studied cities, being that 370 samples (74%), had presented characteristics of acid lactic bacteria (BALs). Amongst the BALs the *Lactococcus lactis* presented the frequency of 78,38% in relation to excessively; *Enterococcus faecalis* (18.92%) and *Leuconostoc* spp (2.77%). The BALs identified by morphotintorials tests and biochemists (84.21%) had been confirmed by sequencialting of the gene 16S rRNA. The *Bacillus cereus* enters the not acid lactic bacter got 42.31% of frequency of the averages observed in the studied cities. After to be dealt with by ohmic heating, was observed the absence to fosfatasis and presence to peroxidasis beyond the reduction the microbial load. From the joined Portary in the 146 was evidenced that the cheeses if do not adjust the denomination "average humidity" (of 36,0 45,9g/100g) defined for the curdle cheese for the Resolution in the 7 of 28 of November of 2000 of the Ministry of Agriculture and the Supplying, characterizing themselves as cheeses of high humidity (between 46,0 and 54,9g/100g, in accordance with, of 07 of March of 1996). It was a bigger acceptability of the cheese produced from ohmic if compared milk with the cheese produced from pasteurized milk. The knowledge of microbiot of the artisan curdle cheese could be an initial step to be identified as product of geographic indication (GI). The results indicate that the ohmic heating could be introduced in the process of pasteurization of milk without influencing its quality negative.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura	Título	Página
1	Fluxograma de produção do queijo de coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste Meridional do Estado de Pernambuco.	64
2	Percentual de Bactérias Ácido Láticas – BALs, Identificadas por provas fenotípicas/bioquímicas e por sequenciamento do fragmento 16S rRNA nos 05 municípios estudados da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil.	66

CAPÍTULO 2

Figura	Título	Página
1	Fluxograma de produção do queijo de coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste Meridional do Estado de Pernambuco.	79
2	Freqüências das bactérias não ácido-láticas isoladas no Queijo de Coalho produzido em 05 municípios da bacia leiteira do Estado de Pernambuco – Brasil e identificadas por métodos fenotípicos e bioquímicos.	81

CAPÍTULO 3

Figura	Título	Página
1	Desenho esquemático do sistema utilizado no processo do aquecimento ôhmico do leite utilizado para a produção do queijo de Coalho.	94
2	Fluxograma de produção do queijo de coalho fabricado a partir de leite pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico.	95

- 3 Comparação do rendimento entre os queijos de Coalho, obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratados por aquecimento ôhmico, após sua fabricação. 102
- 4 Comparação entre os parâmetros de textura dos queijos de coalho obtidos a partir de leite cru (C), pasteurizado (P) e tratado por aquecimento ôhmico (H), no produto final (matéria úmida) - após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. 107
- 5 Percentual de aceitabilidade dos queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e por aquecimento ôhmico, após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. 109

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela	Título	Página
1	Bactérias ácido lácticas isoladas das amostras de queijo de Coalho produzidos nos 05 municípios da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil identificados por provas bioquímicas e confirmação por sequenciamento 16S r RNA	67

CAPÍTULO 2

Tabela	Título	Página
1	Bactérias não ácido lácticas isoladas das amostras de queijo de Coalho produzidos nos 05 municípios da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil identificados por provas bioquímicas e confirmação por sequenciamento 16S r RNA	84

CAPÍTULO 3

Tabela	Título	Página
1	Acompanhamento da variação elétrica do aquecedor ôhmico (AOH) durante o tratamento do leite de vaca cru integral durante 15 segundos.	98
2	Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nas amostras de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico.	100
3	Valores obtidos de proteína e cinza dos queijos produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias das 4 amostras.	103

- 4 Valores obtidos de umidade e sinérese dos queijos de Coalho produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias das 4 amostras 104
- 5 Valores para Acidez Livre titulável e pH dos queijos de Coalho produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias de 4 amostras. 105
- 6 Perfil de textura instrumental dos queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico, no produto final (matéria úmida) após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Valores são médias das 4 amostras. 106

Sumário

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	166
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Queijo de Coalho	19
2.2. Bactérias Ácido-Láticas	20
2.2.1 <i>Lactococcus</i>	243
2.2.2 <i>Enterococcus</i>	263
2.2.3 <i>Leuconostoc</i>	25
2.3. Bactérias não Ácido-Láticas	24
2.3.1 <i>Bacillus Cereus</i>	24
2.3.2 <i>Listeria</i>	26
2.3.3 <i>Streptococcus bovis</i>	29
2.3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	30
2.3.5 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	31
2.3.6 <i>Staphylococcus salivarius</i>	31
2.3.7 <i>Klebsiella</i> sp.	32
2.4. Tratamento do leite para fabricação de Queijo de Coalho	32
2.4.1 Constituição do leite	33
2.4.2 Efeito da pasteurização sobre o leite	36
2.5. Aquecimento ôhmico	39
3. OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo Geral	41
3.2 Objetivos Específicos.....	41
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
CAPÍTULO 1	59
DIVERSIDADE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS EM QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO COM LEITE BOVINO NO NORDESTE DO BRASIL	59
RESUMO.....	600
1. Introdução.....	611
2. Materiais e Métodos.....	622
2.1 Amostras de Queijo de Coalho.....	622
2.2 Isolamento das bactérias	633
2.3 Fenotipagem	644
2.4 Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	64

3.Resultados.....	644
4.Discussão.....	677
5.Conclusão.....	69
6.Referência Bibliográficas.....	69
CAPÍTULO 2.....	733
AVALIAÇÃO DAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUZIDO NA REGIÃO AGRESTE DO ESTADO DE PERNAMBUCO UTILIZANDO COMO PARÂMETRO O ÍNDICE BACTERIANO NÃO ÁCIDO-LÁTICO.....	733
RESUMO.....	744
1. Introdução.....	755
2. Materiais e métodos.....	777
2.1 Amostras de queijo de coalho.....	777
2.2 Isolamento das bactérias.....	788
2.3 Identificação por métodos fenotípicos e bioquímicos.....	7979
2.4 Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA.....	7979
3. Resultados e Discussão.....	800
4.Conclusão.....	844
5. Referências Bibliográficas.....	855
CAPÍTULO 3.....	889
EFEITO DO AQUECIMENTO ÔHMICO NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO- QUÍMICAS E SENSORIAIS DO QUEIJO DE COALHO DO BRASIL.....	8989
RESUMO.....	900
1. Introdução.....	911
2. Materiais e métodos.....	922
2.1 Leite.....	922
2.2 Pasteurização.....	922
2.3 Aquecimento ôhmico.....	933
2.4 Eficiência da pasteurização do leite por métodos Ôhmico e convencional.....	933
2.5 Produção do Queijo de Coalho.....	944
2.6 Avaliação do rendimento do processo.....	955
2.7 Determinação da composição centesimal dos queijos.....	955
2.8 Análises físico-químicas nos queijos de Coalho obtidos com leite cru e pasteurizado por método convencional e por aquecimento ôhmico.....	955
2.9 Grau de Sinérese.....	966
2.10 Perfil de textura instrumental dos queijos de Coalho.....	966
2.11 Análise sensorial do queijo de coalho.....	966
3. Resultados e Discussão.....	976
3.1 Pasteurização por aquecimento ôhmico do Leite.....	977
3.2 Percentuais dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru, pasteurizado e por aquecimento ôhmico.....	988

3.3 Avaliação do rendimento do processo e determinação da composição centesimal dos queijos produzidos com leite submetidos a diferentes tipos de pasteurização	1000
3.4 Determinação do perfil de textura instrumental dos queijos	1044
3.5 Teste de Aceitabilidade	1077
4. Conclusão	1088
5. Referências Bibliográficas	1100

1. INTRODUÇÃO

Em Pernambuco, o Queijo de Coalho é um produto artesanal produzido desde a época da colonização. Foram encontrados relatos desta produção desde o ano de 1581, nos documentos oficiais dos cartórios das cidades mais distantes da capital, pessoas simples que desde a infância acompanhavam a produção deste produto que para os pernambucanos e nordestinos representam a própria identidade (ANDRADE, 2009).

Existe desde o ano de 2000 no Estado de Pernambuco, uma preocupação em preservar o patrimônio histórico que é o Queijo de Coalho, a partir da conscientização da importância do produto para a agricultura familiar, sendo considerado um pilar de sustentação forte da economia do Estado (ANDRADE, 2009).

É um produto obtido originalmente com leite cru, que segue uma tradição familiar histórica que ao longo do tempo foi sofrendo algumas modificações devido às exigências da segurança alimentar (ANDRADE, 2009).

A qualidade dos queijos produzidos com leite cru depende da composição físico-química do leite e de sua microbiota endógena, além do ambiente onde ele é produzido. Todos esses fatores contribuem para a qualidade do produto final, e para as características inigualáveis de cada queijo, conhecidas genericamente como “*terroir*” (CASALTA *et al.*, 2009).

Os queijos feitos com leite cru apresentam aroma e sabor mais intensos do que os produzidos com leite pasteurizado, devido às bactérias ácido-lácticas não iniciadoras originárias do leite cru, responsáveis pela sua diferenciação. Assim a biodiversidade destas, na produção dos queijos, é considerada como um fator fundamental para o aspecto e qualidade dos produtos artesanais (FRANCIOSI, *et al.*, 2009).

Existem mais de 1000 tipos de queijos produzidos de forma artesanal e em escala industrial em todo o mundo. A microbiota associada contribui para a biopreservação e o desenvolvimento das qualidades organolépticas do produto.

Essa diversidade microbiana existente forma um ecossistema bastante efetivo para o controle da qualidade e segurança dos queijos (IRLINGER E MOUNIER, 2009).

Diversos grupos microbianos compõem esse ecossistema natural, que é responsável pela diversidade aromática característica do produto artesanal (CASALTA *et al.*, 2009). Na formação do aroma e sabor dos queijos estão envolvidos basicamente quatro caminhos metabólicos; são eles: glicólise, utilização do citrato, proteólise e lipólise. A produção dos componentes do aroma e sabor requer enzimas específicas de cada espécie responsável pela degradação do leite, assim como a complementação dos caminhos metabólicos entre as espécies, que podem levar ao aumento na qualidade e na variedade deles (IRLINGER E MOUNIER, 2009).

Além do aspecto tecnológico dessas bactérias, nos últimos anos grandes esforços têm sido realizados para utilizar as vantagens de atividades antagonistas dos microrganismos nos queijos. Culturas de bactérias lácticas estão sendo usadas para prevenir e controlar microrganismos patogênicos tais como, a *Listeria monocytogenes* e microrganismos que causam deterioração nos alimentos (IRLINGER E MOUNIER, 2009).

O uso de calor para conservar alimentos tem por objetivo a redução da carga microbiana e a desnaturação de enzimas. Vários tipos de tratamento térmico podem ser aplicados, a depender da termossensibilidade do alimento e da sua suscetibilidade à deterioração, bem como da estabilidade requerida do produto final. Um tratamento térmico seguro deve ser selecionado com base no binômio tempo-temperatura requerido para inativar os microrganismos patogênicos e deterioradores mais termorresistentes em um dado alimento e da embalagem (AZEREDO, 2004).

Uma forma de eliminar microrganismos patogênicos no leite e conseqüentemente nos seus derivados através da utilização do calor é a pasteurização. Existem vários tipos de pasteurização consoante o tempo e a temperatura utilizada: *pasteurização lenta*, também conhecida como prolongada, que se realiza através de equipamento de parede dupla, (30 minutos a 62-63 °C); e *pasteurização rápida*, que se realiza por intermédio de

permutadores de placas, (15 segundos a 71-74 °C) (PEREIRA *et al.*, 2007; INFOPEDIA, 2010).

A pasteurização deve ser realizada através da minimização do efeito sobre a composição e características organolépticas do leite cru (ALBERT *et al.*, 2009).

O aquecimento ôhmico é considerado uma alternativa promissora de processamento asséptico de alimentos, onde o calor é gerado pela passagem de uma corrente elétrica alternada através do alimento, que em sua maioria contém espécies de eletrólitos, como sais e ácidos (PAIN *et al.* 1995). Trata-se de uma tecnologia emergente para a pasteurização do leite, pois permite aquecer rapidamente e uniformemente os alimentos, podendo ser considerada um processo HTST (High Temperature Short Time) com vistas a produção de derivados lácteos (PEREIRA *et al.* 2007) dentre estes o queijo de coalho.

Desta forma neste trabalho objetivou-se caracterizar a microbiota bacteriana láctica e não láctica do queijo de coalho produzido a partir de leite bovino cru da bacia leiteira do Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil e testar o aquecimento ôhmico enquanto alternativa de pasteurização do leite a ser utilizado para a produção do queijo de coalho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijo de Coalho

Entende-se por queijo de coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação, é um queijo de média a alta umidade, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variando entre 35,0% e 60,0% (BRASIL,2001).

O queijo Coalho é fabricado com massa crua, semicozida e tradicionalmente consumido fresco. É produzido há mais de 150 anos, em vários Estados da Região Nordeste do Brasil a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado que, além de destruir os microrganismos patogênicos, reduz também o número de Bactérias Ácido Lácticas (BALs), presentes no leite e responsáveis pelas características sensoriais do queijo (GRAPPIN e BEUVIER, 1997).

Antigamente utilizava-se para coagulação do leite o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros. Atualmente esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial (GONDIM 1995; LIMA,1996).

No Nordeste do Brasil, a maior parte da produção de queijo de coalho é obtida em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza essa atividade como importante para o âmbito social e econômico da região (PERRY, 2004).

Apesar de sua importância econômica e grande popularidade, a fabricação de queijo de coalho não conta com tecnologia apropriada para a melhoria de sua qualidade. É necessário que o processo tradicional, geralmente artesanal e a partir de leite cru, acompanhe a evolução das técnicas queijeiras mediante modificações já utilizadas na tecnologia de outros queijos nacionais (FREITAS FILHO *et al.*, 2009)

Os queijos artesanais são regulados tecnicamente através da Instrução Normativa Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento nº. 30, de 26 de junho de 2006, que institui os padrões de identidade e qualidade a estes produtos, inclusive no que concerne importância da qualidade da matéria-prima (BRASIL,2001).

Furtado (2005) relata que a qualidade da matéria-prima, as condições de processamento e o processo de maturação dos queijos são imprescindíveis para a obtenção de produtos de qualidade e para a proteção da saúde do consumidor.

De acordo com Escobar e colaboradores (2001), o queijo de coalho não possui padronização do seu processo de elaboração, sendo comum a utilização de leite cru apresentando grande quantidade de microrganismos. Isto resulta em deterioração e redução da vida útil do produto, e não padronização das características organolépticas.

O leite cru também representa uma importante fonte de transmissão das enfermidades de origem alimentar, pois pode carrear vários patógenos (CHAMBERS, 2002).

Em 2005 cerca de 50% de toda a produção leiteira no Brasil não passou por nenhum tipo de inspeção (IBGE, 2008) e teve como provável destino o comércio informal. O risco torna-se maior devido à usual produção de diversos tipos de derivados com leite cru, como queijos, conservando os eventuais patógenos presentes na matéria prima.

De modo geral o leite produzido na Região Nordeste do Brasil é obtido em condições higiênico-sanitárias deficientes, predominando altas contagens de microrganismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes e presença de patógenos (MATSUBARA,2009).

2.2. Bactérias Ácido-Láticas

Algumas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de caracterizar a microbiota láctica de queijos produzidos a partir de leite cru no Brasil, Argentina

e Inglaterra. O conhecimento desta microbiota láctica pode auxiliar no desenvolvimento de processos que melhorem a qualidade de cada tipo de queijo (CARVALHO, 2007; MEDINA et al., 2001; LÓPEZ-DÍAZ et al., 2000).

A microbiota láctica é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias, com diferentes necessidades fisiológicas, que inclui espécies pertencentes a vários gêneros, entre os quais, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* e *Lactobacillus*. Esses gêneros bacterianos têm em comum serem Gram positivas, catalase negativas, não esporuladas, anaeróbias facultativas, adaptadas a ambientes ricos em nutrientes e produzem ácido láctico como principal produto da fermentação dos carboidratos (POTES e MARINHO, 2007), além de grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais do leite e do queijo em compostos com propriedades sensoriais desejáveis (VILJOEN, 2001).

As bactérias ácido lácticas utilizam preferencialmente, a lactose como fonte de carbono, tendo como produtos de seu metabolismo diversas substâncias antimicrobianas como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no produto alimentício (NAIDU e CLEMENS, 2000).

Segundo Fox e colaboradores (2000), as bactérias ácido lácticas possuem grande importância na produção de queijos. Seu papel principal é a produção de ácido láctico, que por sua vez tem função de melhorar a atividade do coagulante, auxiliar na expulsão do soro da coalhada, reduzindo então o conteúdo de umidade dos queijos, e promover a prevenção do crescimento de bactérias indesejáveis (deteriorantes e patogênicas). A produção do ácido láctico ocorre através da metabolização do principal açúcar do leite, a lactose, e é essencial para preservação do queijo (NAIDU e CLEMENS, 2000; ROSS et al., 2000; ALEXANDRE et al., 2002).

Além disto, as BALs também podem produzir ácidos orgânicos peróxido de hidrogênio, gás carbônico, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no alimento (NAIDU e CLEMENS, 2000).

2.2.1 *Lactococcus*

Os *Lactococcus* são geralmente predominantes em queijos que não sofrem cozimento da massa, sendo os microrganismos mesofílicos mais usados para a produção de ácido nas fermentações lácticas, pois são capazes de converter rapidamente a lactose em ácido láctico. Crescem a 10°C, em pH ótimo de 6,0–6,5, mas não a 45°C. Em temperatura ambiente de 20-30°C, os lactococos levam de 10-20 h para fermentar o leite cru. O número aproximado de células viáveis necessárias para a coagulação do leite é de 10⁸ ml, Teuber (2000), Klijn, Weerkamp e De Vos (1995) isolaram *Lactococos* de diferentes fontes ambientais como solo e água de efluentes, indicando que estes microrganismos podem sobreviver fora do ambiente de laticínios.

Das 5 espécies de *Lactococcus* conhecidas, somente uma, o *Lactococcus lactis*, é significativa na fermentação dos produtos lácteos com produção de diacetil e acetoína. Apresenta significativa contribuição no desenvolvimento de aroma e sabor de queijos pouco ou não curados (FOX *et al.*, 2000). Os *L. lactis* produzem diacetil e acetoína a partir da metabolização do citrato, e são responsáveis pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (HASSAN e FRANK, 2001).

Das subespécies de *Lactococcus lactis* as mais importantes são *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris* – esta última, confere melhor sabor ao queijo (FOX *et al.*, 2000).

2.2.2 *Enterococcus*

Os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente nos queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano (FONTÁN *et al.*, 2001; MEDINA *et al.*, 2001).

A presença destes microrganismos em queijos produzidos com leite pasteurizado ocorre devido à sua capacidade de crescimento em uma ampla faixa de temperatura (10–45°C) e à sua resistência a altas temperaturas. Desta forma, os enterococos podem aumentar durante a refrigeração do leite e sobreviver à pasteurização. No entanto, a alta contaminação de enterococos em alguns queijos industrializados a partir de leite pasteurizado, normalmente resulta de práticas inadequadas de higiene durante a elaboração dos mesmos (GIRAFFA, 2003).

As espécies do gênero *Enterococcus* apresentam geralmente baixa capacidade de reduzir o pH do leite. Durlu-Ozkaya e colaboradores (2001) e Sarantinopoulos e colaboradores (2001) relataram que apenas alguns representantes destas espécies promoveram a redução do pH do leite para 5,0–5,2, após 16–24 horas de incubação a 37°C, sendo o *Enterococcus faecalis* mais eficiente quanto ao poder de acidificação que o *Enterococcus faecium*.

Segundo López-Díaz e colaboradores (2000), os enterococos fazem parte das BAL da microbiota láctica secundária. Eles são encontrados em muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa com uma ampla variedade de espécies deste gênero, sendo *E. faecalis* a espécie predominante no queijos produzidos com leite cru e pasteurizado.

Cogan e colaboradores (1997) encontraram um número significativo de *Enterococcus* em queijos como Feta, Kasseri, Manchego, Majonero.

De acordo com Giraffa (2003) o gênero *Enterococcus* inclui mais de 20 espécies, sendo *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis* as duas espécies mais frequentes em alimentos. Está presente no trato gastrointestinal de mamíferos e também no solo, superfície das águas e plantas.

Os *Enterococcus* chegam aos alimentos através de contaminações intestinais ou ambientais e multiplicam-se durante a fermentação, ocorrendo em grandes números em produtos lácteos (SARANTINOPOULOS et al., 2001). Estes microrganismos sobrevivem a condições adversas, como pH, temperaturas e salinidade extremos (CARIDI et al., 2003). Algumas espécies de *Enterococcus* podem produzir bacteriocinas, motivo pelo qual elas são

aplicadas como fermento láctico primário. Contudo, o seu maior uso ainda é como fermento adjunto (GIRAFFA, 2003).

2.2.3 *Leuconostoc*

Junto com o gênero *Lactococcus*, o gênero *Leuconostoc* têm sido isolado em maior frequência em queijos artesanais fabricados a partir de leite cru (LIMA et al. 2009). São bactérias gram-positivas, pertencentes à família *Leuconostocaceae*, com forma de cocos, que muitas vezes se apresentam em cadeias. São catalase-negativas (o que as distingue dos estafilococos). Todas as espécies deste gênero são heterofermentativas e são capazes de produzir dextrana a partir de sacarose, o que há formação de limo (BJÖRKROTH e HOLZAPFEL, 2006).

O gênero *Leuconostoc* apresenta crescimento ótimo na faixa de temperatura de 20-30°C. As duas espécies associadas aos produtos lácteos são: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *lactis* (FOX et al., 2000).

Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como microrganismo aromatizante. A produção de diacetil, gás carbônico e acetoína a partir do citrato é responsável pelas características organolépticas, consistência, textura e formação de olhaduras em queijos como o Manchego, Danbo, Gouda e outros (DELLAGLIO; DICKS; TORRIANI, 1995, HASSAN e FRANK, 2001).

2.3. Bactérias não Ácido-Láticas

2.3.1 *Bacillus Cereus*

Bacillus cereus são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas e que habitam o solo. Algumas linhagens são prejudiciais aos seres humanos e podem causar doenças transmitidas por alimentos (2-5%), causando graves náuseas, vômitos e diarreia (KOTIRANTA, LOUNATMAA, HAAPASALO, 2000),

isto ocorre devido à sobrevivência dos endosporos bacterianos quando o alimento está mal cozido (TURNBULL, 1991). Outras cepas podem ser benéficas funcionando como probióticos, na alimentação de aves, coelhos e porcos (RYAN e RAY, 2004).

As toxinas produzidas por *B. cereus* são classificadas em quatro grupos: enterotoxinas, hemolisinas (cereolisina e hemolisina II), fosfolipase C (fosfatidilinositol hidrolase, fosfatidilcolina hidrolase e esfingomielinase) e toxina emética (GRANUM, 1994).

As enterotoxinas são responsáveis pela síndrome diarréica, doença provocada pela ingestão de alimentos contaminados com linhagens de *B. cereus* (TAUXE, 2000). No entanto, existem evidências suficientes para se concluir se essa síndrome é causada pela ingestão da toxina pré-formada no alimento ou se a toxina é produzida no intestino (BEECHER et al., 1995). O período de incubação médio da síndrome diarréica varia de seis a 15 horas (DROMIGNY et al., 1994).

Por ser o *B. cereus* um microrganismo formador de esporos é, continuamente, isolado de alimentos lácteos. A presença de *B. cereus* no leite é devida tanto à resistência do microrganismo ao tratamento térmico, quanto à contaminação do alimento após o tratamento (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Christiansson e colaboradores (1999) e Vidal-Martins (2005) realizaram estudos sobre a sobrevivência do microrganismo e verificaram que o DNA de *B. cereus*, isolados antes e após o processamento térmico do leite, apresentaram semelhança genética.

B. cereus é um agente formador de biofilmes, fato que pode facilitar o aumento da taxa de contaminação do leite. Assim, salienta-se que tanto a contaminação anterior ao processamento térmico quanto a que ocorre após o tratamento do leite pode levar a presença desse microrganismo nos diferentes tipos de leite disponíveis ao consumidor (REZENDE-LAGO, 2007).

Não existe uma legislação específica em relação à enumeração de *B. cereus* presente no leite. No entanto, a legislação para o leite UHT estabelece que esse produto não deve apresentar microrganismos patogênicos e

causadores de alterações físicas, químicas e organolépticas após permanecer por sete dias incubado a uma temperatura de 35-37° C (BRASIL, 1996).

Os surtos de intoxicação geralmente estão associados a falhas na conservação dos produtos mediante exposição a tempos e temperaturas inadequadas, elevando a multiplicação microbiana a níveis significativos ($>10^5$ UFC/g), e favorecendo a produção de toxinas (FORSYTHE, 2002).

Vidal-Martins e colaboradores (2005) pesquisando a presença de *B. cereus* em leites UHT, encontraram 11,8% de amostras positivas. Barros e colaboradores (2001) analisaram 72 amostras de leite em pó integral, em São Paulo, com a finalidade de isolar e quantificar *B. cereus* e verificaram que 97,2% das amostras analisadas apresentavam-se em condições adequadas para o consumo. No entanto, após a reconstituição e armazenamento inadequado (20°C/24 horas), 91,6% das amostras foram consideradas potencialmente capazes de provocar toxinfecção alimentar, devido aos níveis elevados de *B. cereus*.

Rangasamy, Iyer, Roginski (1993), ao analisarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados de diferentes lugares em Victoria (Austrália), encontraram *B. cereus* em leites cru, pasteurizado e em pó, iogurte, queijo e sorvete.

2.3.2 Listeria

O gênero *Listeria* tolera altas concentrações de cloreto de sódio (10-12 %), sobrevivendo a 25,5 % de NaCl (DONELLY, 2001). Os microrganismos desse gênero são pequenos bastonetes Gram-positivos, não formam esporos e cápsula, anaeróbios facultativos, móveis, devido à presença de flagelos peritríquios, e, em meio sólido, a 20-25 °C apresentam mobilidade típica de guarda-chuva (BILLE ; ROCOURT, 2003). Crescem numa faixa de temperatura entre -0,4 a 50 °C (LOU ; YOUSEF, 1999), com crescimento ótimo a 30-37 °C (BILLE; ROCOURT, 2003). Embora a faixa de pH entre 5,6 a 9,6 é favoreça o

crescimento (SWAMINATHAN, 2001), também foi constatado o desenvolvimento em pH abaixo de 4,0. A atividade de água ótima é $>0,97$, porém, a mínima varia entre 0,90 - 0,93 (LOU ; YOUSEF, 1999).

De acordo com o *Taxonomic outline of the prokaryotes, Bergey's manual of systematic bacteriology* (GARRITY; BELL.; LILBURN, 2004), O gênero *Listeria* encontra-se classificado na classe *Bacilli*, ordem I *Bacillales*, família IV *Listeriaceae* e apresenta seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. grayi*.

Borges e colaboradores (2009) citam *Listeria monocytogenes* como um importante patógeno de origem alimentar, uma vez que a presença desse microrganismo em alimentos pode causar listeriose. A listeriose causa gastroenterite e, em casos mais graves, ocasiona septicemia, meningite e meningoencefalite. Surtos de listeriose, embora relativamente raros, sempre envolvem mortalidade, sobretudo em grupos de risco bem definidos (idosos, neonatos, gestantes e pessoas imunodeprimidas).

O período de incubação da listeriose varia de horas a semanas, contudo a dose infectante de *L. monocytogenes* para causar a doença ainda não está bem definida. A dose aproximada, relatada de casos, varia de 10^3 a 10^9 UFC/g ou mL (DALTON et al., 1997). Mas há ainda relatos de surtos com contaminação muito baixa (MEAD et al., 1999). A dose infecciosa, também, varia em função da virulência da cepa e da susceptibilidade do indivíduo. Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, podendo haver ou não presença de náusea, vômito, dores e diarreia. Em casos mais graves, ocorre meningite, meningoencefalite, encefalite e septicemia. Em indivíduos saudáveis manifesta-se como gastroenterite caracterizada por febre, vômitos, dor abdominal e diarreia (DONELLY, 2001).

A ocorrência de *L. monocytogenes* em leite e produtos lácteos foi relatada por Kabuki e colaboradores (2004). Entre os produtos lácteos, os queijos são os mais comumente contaminados por essa bactéria, principalmente, os de alta e média umidade.

As maiores taxas de ocorrência de *L. monocytogenes* são observadas em queijo macio (PINTADO et al., 2004) e queijos frescos (SILVA et al., 1998).

Evidencia-se, ainda, que no Brasil, o queijo de coalho e o queijo Minas frescal, são os mais estudados com relação à contaminação por *L. monocytogenes* (SILVA et al., 1998).

Em queijo de coalho, a incidência de *L. monocytogenes* apresenta ampla variação (0 a 19 %), tanto para queijos artesanais como para industrializados. A maior taxa (19 %) de ocorrência do patógeno foi observada em queijo industrializado, armazenado sob refrigeração (BRANCO et al., 2003). Já em queijo artesanal, elaborado a partir de leite cru, a prevalência dessa bactéria foi baixa (0 a 2,3 %) (BORGES et al., 2003; BRANCO et al., 2003; BORGES et al., 2006).

Na indústria de laticínios, as principais vias de introdução desse patógeno são o leite cru, os utensílios e os equipamentos contaminados, o solo transportado pelas botas e roupas dos trabalhadores, o ar, o sistema de ventilação, a água empoçada e/ou condensada e os carros de transporte, além da possibilidade da bactéria carregada por operários ou visitantes doentes. Algumas cepas de *L. monocytogenes* podem permanecer no ambiente de processamento durante meses ou anos (SWAMINATHAN, 2001).

Em Fortaleza, *L. monocytogenes* foi detectada em leite cru, fresco e refrigerado, leite pasteurizado (após 60 horas de estocagem a 4 °C), tanque de recepção do leite cru, caixas plásticas de transporte de leite e em drenos e pisos de uma indústria beneficiadora de leite tipo C (FIGUEIREDO, 2000).

Na Bahia, Silva e colaboradores (2003) observaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em 1% (2/218) das amostras avaliadas de duas indústrias processadoras de queijo Minas frescal. A bactéria foi detectada no leite cru e no piso da sala de estocagem de leite, em apenas uma das indústrias.

Em Juiz de Fora, Brito e colaboradores (2008) avaliaram uma indústria processadora de queijo Minas frescal e isolaram *L. monocytogenes* sorotipo 1/2a, de mesmo perfil genético, em queijos, equipamentos e utensílios. Os autores concluíram que o refrigerador de estocagem era a fonte de contaminação dos queijos.

No Brasil, surtos e casos esporádicos de listeriose causados por alimentos ainda não foram descritos, embora a ocorrência de *L.*

monocytogenes tenha sido relatada em vários tipos de alimentos. Embora o processo de pasteurização adequado assegure a destruição de *L. monocytogenes* no leite, o patógeno tem sido detectado em produtos lácteos (BORGES et al., 2009)

2.3.3 *Streptococcus bovis*

Os *Streptococcus bovis* são bactérias Gram-positivas, catalase e oxidase negativas, não móveis, não esporuladas, que crescem em pares ou cadeias de cocos (SCHLEGEL et al., 2003). É um membro dos estreptococos do grupo D, na classificação Lancefield. A maioria das cepas são alfa, beta ou gama-hemolíticas, mas algumas também apresentam atividade alfa-hemolítica em placas de ágar sangue ovino. *S. bovis* é comumente encontrado no trato digestivo das vacas, ovelhas e outros ruminantes (GHALI, SCOTT, JASSIM; 2004) e têm sido apontadas como agente causal de endocardites e raros casos de septicemia e meningite neonatal (RYAN e RAY,2004).

Quando ruminantes consomem dietas ricas em amido ou açúcar, carboidratos facilmente fermentáveis, promovem a proliferação de *S. bovis* no rúmen. *S. bovis* fermentam estes carboidratos transformando-os em ácido láctico, causando uma diminuição no pH ruminal, e posterior desenvolvimento de reações adversas, como acidose ruminal ou choque de confinamento (ASANUMA e HINO; 2002).

De acordo com Reale e colaboradores (2007) das 18 espécies isoladas em um queijo de leite de ovelha e massa filada produzido na Itália, 4 eram *S. bovis*.

Lima e colaboradores (2009), pesquisando a microbiota do queijo Minas Frescal da Serra do Salitre no Estado de Minas Gerais, isolaram *Streptococcus bovis* no “pingo” utilizado como fermento para a produção do referido queijo.

2.3.4 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria em forma de coco que aparece aos pares no exame microscópico, em cadeias curtas ou em cachos similares aos da uva ou em grupos; Gram positiva, catalase positiva (capaz de converter peróxido de hidrogênio em água e oxigênio) o que torna o teste de catalase útil para distinguir estafilococos de enterococos e estreptococos. Algumas cepas produzem uma toxina protéica altamente termo-estável que causa doença em humanos. A toxina é produto da multiplicação da bactéria nos alimentos deixados em temperaturas inadequadas. Uma pequena porcentagem de *S. aureus* pode ser diferenciada da maioria dos outros estafilococos pelo teste de coagulase: *S. aureus* é principalmente coagulase-positiva, que provoca a formação de coágulos (RYAN ; RAY, 2004; FORSYTHE, 2002; STAMFORD et al., 2006).

Altos níveis de contaminação (10^3 e 10^6 UFC/g) por *S. aureus* têm sido encontrados em queijo de coalho produzido em vários estados do Nordeste, como Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba e Pernambuco (FEITOSA et al., 2003; FLORENTINO ; MARTINS, 1999; MENDES et al., 1999; PAIVA ; CARDONHA, 1999). Esses níveis são preocupantes por não se enquadrarem nos padrões estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde, cujo máximo permitido é 10^3 UFC/g (BRASIL, 2001 ; BRASIL, 1996).

A prevalência de *S. aureus* como agente etiológico da mastite bovina, sua ubiquidade na natureza e o baixo nível socioeconômico dos ordenhadores

muitas vezes portadores assintomáticos e com hábitos higiênicos não-adequados, são fatores que favorecem a contaminação dos queijos (ADAMS ;MOSS, 2000; GOMES ; GALLO, 1995).

2.3.5 *Staphylococcus epidermidis*

É bactéria coagulase negativa e catalase positiva, Gram-positiva, arranjada em cachos e tétrades. É uma espécie comensal da pele e mucosas, responsável principalmente por infecções hospitalares, através de catéteres, sondas (material de plástico) e próteses devido sua capacidade de formar biofilmes. A identificação da espécie pode ser feito após prova de catalase e coagulase com um antibiograma que evidencie sua sensibilidade a Novobiocina (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Embora *S. epidermidis* seja coagulase-negativa, algumas pesquisas têm demonstrado que essas bactérias podem produzir enterotoxinas (RODRIGUEZ et al., 1996; VERNOSY-ROZAND *et al.*, 1996) e, portanto, ser considerada um potencial causador de intoxicação alimentar (CARMO et al., 2002).

2.3.6 *Staphylococcus salivarius*

De acordo com Bergan e Kocur (1982) *Staphylococcus salivarius* também conhecido como *Stomatococcus mucilaginosus* ou *Micrococcus mucilaginosus* é uma bactéria Gram-positiva, catalase variável, considerado normal da cavidade oral e respiratório, sendo descrito como um patógeno

humano, podendo contaminar alimentos a partir da não utilização das boas práticas de fabricação pelos manipuladores (ASCHER et al., 1991).

O novo gênero foi criado devido a composição incomun de ácidos graxos na parede celular e na produção variável da catalase (AL-FIAR et al., 1995).

2.3.7 *Klebsiella* sp.

De acordo com Silva, Junqueira, Silveira (2001) o gênero *Klebsiella* faz parte do grupo coliforme fecal, este é restrito aos coliformes que vivem exclusivamente no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente.

É um gênero de bactérias bacilares gram-negativas, não-móveis, capsuladas, da família *Enterobacteriaceae*. Ocorrem em fezes, na água, no solo, no trato gastrointestinal, em vegetais e frutas e nos cereais. Provoca pneumonias, infecções no trato urinário, infecções nos serviços de cuidados intensivos e infecções neonatais (GRIMONT, GRIMONT, 2005).

Em um levantamento das condições sanitárias relacionadas à produção de leite e queijo no município de Seropédica- Rio de Janeiro – Brasil, pesquisadores isolaram *Klebsiella* spp. atribuindo sua presença à contaminação fecal (ZEGARRA et al., 2009).

2.4. Tratamento do leite para fabricação de Queijo de Coalho

No Nordeste predominam queijos fabricados com leite cru sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais que não adotam as Boas Práticas de Fabricação. Assim, os produtos resultantes

não apresentam qualidade e padronização (FREITAS FILHO et al., 2009; FEITOSA et al., 2003; NASSU et al., 2001).

2.4.1 Constituição do leite

O leite é composto por: água, glicídios (basicamente lactose), gordura, proteína (principalmente caseína e albumina), minerais e vitaminas (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001). O leite bovino contém, em média, 4,8% de lactose, 4,0% de gordura, 3,5% de proteínas, 0,7% de sais e o restante de água (MONTEIRO; PIRES; ARAÚJO, 2007).

O leite de algumas espécies animais, particularmente a bovina, contém 80% de suas proteínas como caseínas e o restante (20%) são representadas pelas proteínas do soro (KRÜGER et al., 2003). As principais proteínas do soro do leite de vaca são a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001). Entretanto, estas têm importância secundária para produção de queijo, uma vez que se mantêm solúveis durante o processo de produção e se perdem no soro. Uma exceção é o queijo ricota que é basicamente composto de soroproteínas (PORTO; SANTOS; MIRANDA, 2005).

As caseínas são altamente digestíveis no intestino, se configurando como uma fonte de aminoácidos de alta qualidade (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001), além de serem o principal componente de formação dos queijos. Estas podem ser obtidas a partir do leite, principalmente por dois processos: precipitação ao se atingir o pH isoeletrico, mediante adição de ácido (pH 4,6, 20°C); e coagulação pela ação de enzimas proteolíticas encontradas no rumem de bezerros (quimosina e pepsina), como no processo industrial de obtenção de queijos (KRÜGER et al., 2003, BOBBIO; BOBBIO, 1992). As caseínas são organizadas em micelas, partículas de 0,1 a 0,2 μ m de diâmetro (KRÜGER et al., 2003).

Outro componente importante no leite é a lactose, seu principal glicídio, sendo este um dissacarídeo composto pelos monossacarídeos D-glicose e D-galactose, ligados por ponte glicosídica β -1,4. Este componente aparece essencialmente no leite, tendo importante papel em sua síntese, muito embora tenha sido identificado em algumas frutas. Não é tão doce quanto outros dissacarídeos, como a sacarose (açúcar glicose-glicose), ou os monossacarídeos frutose ou glicose (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001).

A importância tecnológica dos carboidratos refere-se, essencialmente, ao fato de que servirão como substrato para bactérias lácticas, que ao fermentarem a lactose, vão produzir ácido láctico e outros metabólitos de interesse na fabricação de derivados lácteos (por exemplo, o ácido láctico é essencial para a produção de iogurte e as proteases e lipases são essenciais para a maturação dos queijos, conferindo as características peculiares de cada produto, dependendo da cultura utilizada). Ainda, outros glicídios podem ser encontrados no leite, porém em concentrações muito baixas (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001).

O componente lipídico do leite é formado por uma mistura complexa, sendo os triglicerídeos os lipídeos mais importantes (98%). Os lipídeos têm menor densidade que a água, de forma que quando o leite cru é centrifugado, a gordura se separa resultando numa camada de creme. A quantidade de glóbulos de gordura é tanta que eles podem também carregar algumas proteínas do leite de forma que o creme também contém uma pequena quantidade de proteína. (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001)

A estabilidade da emulsão pode estar comprometida quando o leite cru fica sem agitação por algum tempo, o que resulta na subida do creme para o topo. Visando evitar esta separação usa-se o processo de homogeneização do leite que consiste em romper os glóbulos de gordura em tamanhos bem menores, o suficiente para que não consigam subir e formar creme sob condições normais de armazenagem. Este evento é importante para o processamento, armazenamento e consumo do leite, além de influenciar positivamente o rendimento dos queijos fabricados com leite

homogeneizado, pela redução das perdas de gordura no soro, e acelerar o processo de maturação, por gerar uma maior superfície de contato do glóbulo de gordura que ficará mais exposto às lipases responsáveis pela sua degradação(GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001).

Ainda com relação à fabricação de queijos, a gordura do leite é essencial, pois, fica retida em grande parte na malha de caseína, fazendo parte do produto final. Por se apresentar em glóbulos no leite, a gordura influencia decisivamente na palatabilidade do queijo além de sofrer, durante a maturação, lipólise, permitindo a liberação de ácidos graxos de cadeia mais curta que vão contribuir para o sabor e o *flavor* do produto. Também influencia na consistência e na textura dos queijos (GONZÁLEZ; DÜRR; FONTANELI, 2001)

Porém, além dos constituintes do leite, é preciso atentar-se para a qualidade microbiológica da matéria-prima, pois, esta também se configura como fator de elevada importância quando se trata de elaboração de queijos. O leite não se encontra isento de diversos microrganismos após sua retirada do úbere mesmo quando obtidos de animais saudáveis. A contagem e o tipo de microrganismos é bem variado (10^3 - 10^6 UFC/ml), podendo ser benéficos ou maléficos para o homem. Além disso, a atividade microbiana incontrolável é prejudicial tornando o leite inadequado para consumo mesmo com prevalência de uma microbiota benéfica, há a necessidade de refrigerar o leite a temperaturas inferiores a 5°C após sua retirada do úbere (PEREDA, 2005).

O resfriamento não é garantia total para a qualidade do leite, pois, “a deterioração do leite é conseqüência, sobretudo do crescimento de microrganismos psicrófilos, que produzem lipases e proteases termoestáveis que não são desnaturadas durante a pasteurização”. Essas bactérias têm temperatura de multiplicação entre 0°C e 20°C, sendo assim, necessário o controle para que a contagem inicial do leite seja a menor possível (FORSYTHE, 2002).

2.4.2 Efeito da pasteurização sobre o leite

A aplicação do calor como método de conservação necessita de um rigoroso controle, sob pena de destruir o alimento, ao invés de contribuir para a sua conservação (SILVA ; ALMEIDA, 2000).

O tratamento térmico do leite origina a desnaturação das proteínas. O efeito varia dependendo da severidade do aquecimento desde a desnaturação parcial, durante a pasteurização, até a total na esterilização convencional. As imunoglobulinas são as proteínas mais lábeis e em ordem crescente de estabilidade, a albumina sérica, β - lactoglobulina e α -lactoalbumina (VARNAM ; SUTHERLAND, 1995).

A desnaturação das proteínas desempenha um importante papel no desenvolvimento do aroma de cozido. Este aroma não é perceptível no leite pasteurizado, porém forma parte do sabor característico do leite esterilizado (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

A desnaturação é tão mais importante quanto mais alta a temperatura. Pode constatar-se que uma pasteurização realizada em condições ótimas não ocasiona uma desnaturação apreciável. No leite pasteurizado podem ocorrer maiores perdas por ação de luz, sendo os aminoácidos mais afetados a metionina, o triptofano e a tirosina. (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

As caseínas não se comportam, frente ao aquecimento, como as proteínas solúveis. Para poder constatar alguma modificação, é necessário o aquecimento a temperaturas muito elevadas, superiores a 120°C, durante 10 minutos (VEISSEYRE, 1988).

Após a pasteurização observam-se perdas do aminoácido lisina, decorrentes da Reação de *Maillard*, na qual grupamentos amina de alguns aminoácidos unem-se a lactose. A intensidade e a temperatura do tratamento térmico afetam o valor nutricional do leite. Quanto maior a temperatura utilizada durante o tratamento térmico, maior a velocidade da Reação de *Maillard* e, portanto maiores as perdas de lisina. As perdas de lisina podem chegar a 4% por tratamento UHT direto e por volta de 5,5% pelo UHT indireto. As perdas de

lisina na pasteurização são de aproximadamente 1 a 2%, podendo ter maiores perdas por ação da luz (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

As perdas de lisina na pasteurização em relação aos outros tratamentos térmicos são pequenas. Os componentes da matéria gorda são pouco sensíveis aos tratamentos térmicos moderados. É preciso alcançar temperaturas muito superiores a 100°C e realizar um aquecimento prolongado durante várias horas a 70-80°C para detectar uma degradação dos glicerídeos que se traduzem pela formação de δ -lactonas, a partir da hidrolização dos hidroxiácidos graxos. Pode evidenciar-se a formação de metil cetonas a partir dos ácidos β -cetônicos procedentes da hidrólise dos glicerídeos (VEISSEYRE, 1988).

Estes produtos não são desejáveis, pois alteram o sabor do leite. As quantidades presentes no leite pasteurizado são pequenas em comparação com as que se encontra no leite que foi submetido a tratamentos térmicos mais severos e no caso das metil-cetonas, as quantidades presentes são somente um pouco superiores as que se encontram no leite não aquecido (VARNAM e SUTHERLAND, 1995; VEISSEYRE, 1988).

As vitaminas lipossolúveis A, D, E e as vitaminas hidrossolúveis biotina, ácido nicotínico, ácido pantotênico e riboflavina são relativamente estáveis ao calor e não se produzem perdas muito significativas das mesmas devido à pasteurização. Durante a pasteurização perde-se menos de 10% de ácido fólico, tiamina, vitamina B6 e vitamina B12. As perdas mais importantes se produzem na vitamina C, cujo conteúdo total (ácido ascórbico e ácido dehidroascórbico) se reduz a 10-25% durante a pasteurização. A perda do conteúdo total de vitamina C se deve quase por completo a instabilidade da forma oxidada, o ácido dehidroascórbico, ao calor. Esta perda pode ser reduzida, limitando-se a quantidade de oxigênio dissolvido no leite (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

Os sais do leite, no que diz respeito ao seu comportamento frente aos tratamentos térmicos, são de dois tipos: os que não sofrem nenhuma modificação como o sódio, potássio, cloro e enxofre e os que resultam afetados

pelo aquecimento como cálcio, magnésio, citrato e fosfato. O tratamento modifica os equilíbrios dos sais de cálcio produzindo uma diminuição do cálcio solúvel e a precipitação do fosfato de cálcio. Durante a pasteurização estes efeitos só têm importância em circunstâncias excepcionais, apesar do papel que desempenha o leite como, importante fonte de cálcio na dieta (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

Cerca de 40% a 50% do cálcio solúvel aparece na fase coloidal, com diminuição da absorção deste pelo organismo, logo este leite não deve ser utilizado como única fonte de cálcio para crianças e mulheres na fase pré-menopáusia (NETO et al., 2002).

A formação de lactulose, dissacarídeo formado por um resíduo de frutose e um resíduo de galactose, aumenta com a temperatura do tratamento térmico. Isto não é desejável, pois a lactulose não é hidrolisada pelas enzimas dos mamíferos, porém pode ser fermentada no intestino grosso produzindo flatulências. Este problema não parece importante com as quantidades presentes no leite pasteurizado (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

O escurecimento do leite durante o aquecimento se deve a reação entre o grupo aldeído da lactose e o grupo amino das proteínas (Reação de *Maillard*) e a polimerização (caramelização) das moléculas de lactose. Também é possível que a lactose se decomponha por oxidação em ácidos orgânicos, o que explicaria em parte o aumento de acidez que se produz durante a esterilização do leite. No meio alcalino, a termodestruição da lactose pode dar lugar à aparição de uma cor cinza, mais ou menos escura, que se observa freqüentemente nos processos de cocção (AMIOT, 1991).

No tratamento de pasteurização várias enzimas do leite são inativadas e as provas da inativação enzimática como o teste da fosfatase alcalina, são utilizadas desde muitos anos para comprovar que o leite tem recebido uma pasteurização adequada (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

As lipases naturais do leite também se inativam, uma vez que a membrana do glóbulo graxo está muito danificada podendo haver alguma atividade residual. No entanto, a principal proteinase do leite, plasmina, é muito resistente à pasteurização. Os plasminógenos parecem ser menos afetados do

que a plasmina ativa e o grau de ativação dos plasminógenos podem aumentar depois da pasteurização devido à inativação de compostos que normalmente atuam como inibidores. Portanto, a pasteurização não tem um efeito importante sobre o nível de atividade proteolítica total, já que se produz um certo grau de inativação da plasmina e, dependendo do tratamento aplicado, a enzima pode ser totalmente inativadas (VARNAM; SUTHERLAND, 1995).

O tratamento térmico altera o teor de nutrientes, principalmente o das vitaminas hidrossolúveis e também provoca mudanças nas características sensoriais que variam em ambos os casos em função do tempo e temperatura do tratamento, sendo maiores nos tratamentos mais severos (NETO et al., 2002).

2.5. Aquecimento ôhmico

O aquecimento ôhmico é considerado uma técnica promissora de processamento asséptico de alimentos. O calor é gerado pela passagem de uma corrente alternada através do alimento, que contém espécies de eletrólitos, como sais e ácidos, que possibilitam a passagem da corrente elétrica. Assim, o calor gerado passa internamente pelo alimento (PAIN et al.1995).

Fetterman (1928) desenvolveu um processo de pasteurização de leite por aquecimento ôhmico, que afeta os microrganismos e enzimas presentes neste alimento. De 1928 a 1938, mais de 200 milhões de litros de leite foram pasteurizados nos EUA mediante este processo (MOSES, 1938). Mas o efeito do campo elétrico nos alimentos, só começou a ser estudado a partir dos anos 60 (BENDICHO et al., 2002).

Além do tipo de câmara e pulsos, há outros parâmetros que afetam a eficiência do tratamento ôhmico. Os fatores de maior relevância são: características elétricas do alimento, intensidade do campo elétrico aplicado, duração do tratamento, temperatura de tratamento (PETTIT et al., 2002), tipo e

forma de microorganismo ou enzima (BENDICHO et al., 2002) e pH do meio (GARCIA et al., 2005). No que se refere à intensidade do campo elétrico, os limites são dados por dois pontos importantes: se ele for muito baixo não será capaz de inativar os microrganismos, se for muito alto pode causar ruptura dielétrica no alimento.

Um estudo completo sobre a aplicação do aquecimento ôhmico no processamento térmico de alimentos incluindo modelagem, segurança, viabilidade e avaliação econômica, foi apresentado no Simpósio patrocinado pelo IFT, citado por Sastry e Kim (1996). Um trabalho realizado por Reznick (1996) com alimentos fluidos, vem completar esses estudos, onde o autor mostrou que vários parâmetros afetam a eficiência do processo, tais como resistência elétrica dos produtos e as mudanças de temperatura.

No que se refere à temperatura de tratamento, quanto maior for sua magnitude, mais efetivo será o tratamento, porém o objetivo principal do estudo desta tecnologia tem sido substituir o tratamento térmico. Para o valor de pH a relação é inversa, ou seja, quanto menor for o valor do pH do alimento, mais efetivo será o tratamento (GARCIA et al., 2005).

Segundo Pereira e colaboradores (2007) é escassa a bibliografia a respeito dos efeitos que a pasteurização ôhmica poderá ter sobre a qualidade tecnológica do leite.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a Microbiota Lática e Não Lática do Queijo de Coalho produzido a partir de leite cru na Região Agreste Meridional do Estado de Pernambuco e a utilização do aquecimento Ôhmico no Processamento do leite bovino para a produção de Queijo de Coalho.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar a microbiota láctica do queijo de coalho produzido a partir de leite cru através de métodos fenotípicos e bioquímicos e por sequenciamento do gene 16S rRNA.
- Identificar a microbiota não láctica do queijo de coalho produzido a partir de leite cru através de métodos fenotípicos e bioquímicos e por sequenciamento do gene 16S rRNA.
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do queijo de coalho produzido a partir do leite de vaca no Estado de São Paulo Brasil, tratado por método convencional de pasteurização e por aquecimento ôhmico.
- Avaliar a aceitabilidade do queijo de coalho produzido a partir do leite de vaca no Estado de São Paulo – Brasil, tratado por método convencional de pasteurização e por aquecimento ôhmico por um painel não treinado composto por 31 provadores oriundos da região nordeste do Brasil.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.R.; MOSS, Y.M.O. Food microbiology. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. p. 258-263.

ALBERT, C.S.; M'ANDOKI, Z.S.; CSAPÓ-KISS, Z.S.; CSAPÓ, J. The effect of microwave pasteurization on the composition of milk. Acta Univ. Sapientiae, Alimentaria, 2, 2 (2009) 153–165

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal Minas cheese against indicator microorganisms. Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia, v.54, p.424-428, 2002.

AL-FIAR, F.; ELLIS, M.; QADRI, H.; ERNST, P. *Stomatococcus Mucilaginosus* Meningitis In A Patient With Acute Lymphoblastic Leukemia Annals of Saudi Medicine, v. 15, n. 4, 1995

AMIOT, J. Ciência y tecnologia de la leche: Principios y aplicaciones. Zaragoza: Acribia, 1991. 547p.

ANDRADE, M. do C. Queijo de Coalho. Pesquisa Escolar On-Line, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://www.fundaj.gov.br>>. Acesso em: 6 ago. 2009.

AQUINO, F.T.M. Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1983.

ASANUMA, N.; HINO, T. (2002). Egulamento de fermentação de uma bactéria ruminal, *Streptococcus bovis*, Com especial referência à acidose ruminal . *Sci Animal. J.* 73 (5): 313-325. doi:10.1046/j.1344-3941.2002.00044.x. <http://www.ingentaconnect.com/content/bsc/asj/2002/00000073/00000005/art00001>.

ASCHER, D.P.; ZBICK, C.; WHITE, C.; FISHER, G.W. Infection due to *Stomatococcus mucilaginosus*: 10 cases and review. *Review Infectology Disease* 1991;13:1048-52.

AZEREDO, H. M.C. de. Fundamentos de estabilidade de alimentos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2004. 195 p.

BASTOS, M. do S.R.; NASSU, R.T.; BORGES, M. de F.; SILVA, J.B. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no Estado do Ceará, visando a implantação das Boas Práticas de Fabricação. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 57, n. 321, p. 130- 136, jul./ago. 2001.

BARROS, V.R.M.; PANETTA, J.C., MIGUEL, O. Ocorrência e níveis de *Bacillus cereus* no leite em pó integral comercializado na capital do estado de São Paulo, Brasil – 1987/1988. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*, v.4, p.45-51, 2001.

BENDICHO, S.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; MARTÍN, O. (2002) Milk Processing by High Intensity Pulsed Electric Fields. *Food Science & Technology* 13:195-204.

BILLE, J.; ROCOURT, J. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington D. C.: ASM, 2003. v. 1, chap. 33, p. 461-471.

BJÖRKROTH, J., E W. HOLZAPFEL. 2006. Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*, p.267 -319. In M. Dworkin (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, vol. 4, 3rd ed. Springer-Verlag, New York, NY.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. *Química do Processamento de Alimentos*. São Paulo: Varela, 1992.

BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. *Revista Brasileira CEPPA*, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BORGES, M.F.; ANDRADE, A. P. C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. *Listeria monocitógenes* em leite e produtos lácteos, Fortaleza : Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 31p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 119).

BORGES, M. F.; NASSU, R. T.; ARCURI, E. F.; KUAYE, A. Y. Avaliação da contaminação por coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. em uma indústria processadora de queijo de coalho. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 61, p. 309-314, 2006.

BRANCO, M. A. A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T.; BORGES, M. F.; SILVA, M. C. D.; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393-408, jun./dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 jul.2001a, p.13-15.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02/01/2001. p. 1-54.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico para Rotulagem de Produto de Origem Animal Embalado. Instrução Normativa nº. 22, de 24/11/2005. Brasília: Diário Oficial da União, 2005.

BRITO, J. R.; SANTOS, E. M. P.; ARCURI, E. F.; LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; SOUZA, G. N.; CERQUEIRA, M. M. P. O.; BELTRAN, J. M. S.; CALL, J. E.; LIU, Y.; PORTO-FETT, A. C. S.; LUCHANSKY, J. B. Retail survey of Brazilian milk and Minas Frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. Applied and Environmental Microbiology, v. 74, n.15, p. 4954-4961, 2008.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. Food Microbiology, v. 20,n. 2, p. 201-209, 2003.

CARMO, L.S. et al. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária, Belo Horizonte, v.47, n.2, p.113-122, 1995.

CARMO, L.S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, London, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G. Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 2007. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CASALTA, E.; SORBA, J-M.; AIGLE, M.; OGIER, J-C. (2009) Diversity and dynamics of the microbial community during the manufacture of Calenzana, an artisanal Corsican cheese. *International Journal of Food Microbiology*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.05.022.

CHAMBERS, J. V. The microbiology of raw milk. In: ROBINSON, R.K. *Dairy microbiology Handbook: The microbiology of milk and milk products*. 3. ed. New York: John Wiley and Sons, 2002. p.39-90.

CHRISTIANSSON A.; BERTILSSON, J.; SVENSSON, B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *Journal. Dairy Science.*, v.82, p.305-314, 1999.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P. S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOUPOULOS, G. LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M. C.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 64, n. 3, p. 409-421, Aug., 1997.

DALTON, C. B.; AUSTIN, C. C.; SOBEL, J.; HAYES, P. S.; BIBB, W. F.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M. E.; GRIFFIN, P. M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*, Boston, v. 336, n. 2, p. 100-105, Jan. 1997.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L. M. T.; TORRIANI, S. The genus *Leuconostoc*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. The genera of lactic acid bacteria. London: Chapman & Hall, 1995, v. 2.

DROMIGNY, E.; VINCENT, P.; JOUVE, J.L. *Bacillus cereus*. In: BOURGEOIS, C.M.; MESCLE, J.F.; ZUCCA, J. (Eds). *Microbiología alimentaria*. Zaragoza: Acribia, 1994. p.107-11.

DONNELLY, C. W. *Listeria monocytogenes*. In: HUI, Y. H.; PIERSON, M.D.; GORHAM, J. R. (Ed.). Foodborne disease handbook. 2nd ed. New York: M. Dekker, 2001. v. 1, chap. 10, p. 213-246.

DURLU-OZKAYA, F.; XANTHOPOULOS, V.; TUNAIL, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI. E.; Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, n. 5, p. 861-870, Nov., 2001.

ESCOBAR, C. A. M. et al. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H. de F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de salmonella sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 23, n. 3, set./dez. 2003

FETTERMAN, J.C. (1928) The Electrical Conductivity Method of Processing Milk. *Agricultural Engineering* 4:407-408.

FIGUEIREDO, E. A. T. Ocorrência do gênero *Listeria* e avaliação da diversidade genética de *Listeria monocytogenes* através do random amplified polymorphic DNA (RAPD) e sua distribuição em uma linha de processamento de leite pasteurizado tipo C. 2000. 100 p. Tese (Doutor em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no Estado da Paraíba. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FONTÁN, M. C. G.; FRANCO, I.; PRIETO, B.; TORNADIJO, M. E.; CARBALLO, J. Microbiological changes in ‘San Simón’ cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. Food Microbiology, London, v. 18, n. 1, p. 25-33, Feb. 2001.

FORSYTHE, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre, Art Med Editora, 424 p., 2002.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. Fundamentals of cheese science. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000 . 587p.

FRANCIOSI, E.; SETTANNI, L.; CAVAZZA, A.; POZNANSKI, E. (2009) Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow’s milk. International Dairy Journal, v. 19, p. 3 – 11.

FREITAS FILHO, J. R. DE; SOUZA FILHO, J. S. DE; OLIVEIRA, H. B. DE; ÂNGELO, J. H. B.; BEZERRA, J. D. C. Avaliação Da Qualidade Do Queijo “Coalho” Artesanal Fabricado Em Jucati – Pe EXTENSIO: Revista Eletrônica de Extensão v. 6 • n. 8 • dezembro de 2009 • ISSN 1807-0221

FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção, 2^o. ed. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200 p.

GARCIA, D.; GÓMEZ, N.; RASO, J.; PAGÁN, R. (2005) Bacterial Resistance after Pulsed Electric Fields Depending on the Treatment Medium pH. *Innovative food science & emerging technologies* 6:388-395.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic outline of the prokaryotes. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed., 2004.

GHALI, M.B., SCOTT, P.T. e AL JASSIM, R.A.M. 2004. Characterization of *Streptococcus bovis* from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. *Letter Applied Microbiology* 39(4):341–346

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, v. 88, n. 2-3, p. 215-222, Dec, 2003. Review.

GOMES, H. de A.; GALLO, G. R. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* e produção de enterotoxinas por linhagens isoladas a partir de leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo minas frescal comercializados em Piracicaba - SP. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 15, n. 2, p. 158-161, jul./dez. 1995.

GONZÁLEZ, F. H. D.; DÜRR, J. W.; FONTANELI, R. S. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras. Porto Alegre: UFRGS, 2001.

GRANUM, P.E. *Bacillus cereus* and its toxins. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, v.76, p.61S-66S, 1994.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possibles implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*. Barking, v.7, n.12, p.751- 871, dec.1997.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. Genus XVI. *Klebsiella trevisan* 1885. In: GARRITY, G.M. (ed.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria Part B*. 2 ed. Nova Iorque: Springer, 2005. p. 685-693.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter cultures and their use. In: MARTH, E. H.; STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*, 2^a ed. New York: Marcel Decker, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 26 jan. 2008.

INFOPÉDIA [Em linha]. Porto: Porto Editora, 2003-2010. [Consult. 2010-06-13]. Disponível na www: <URL: [http://www.infopedia.pt/\\$pasteurizacao](http://www.infopedia.pt/$pasteurizacao)>.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. (2009) Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 20, p. 142 – 148.

KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*, Lancaster, v. 87, n. 9, p. 2803-2812, Sept. 2004.

KLIJN, N.; WEERKAMP, A. H.; de VOS, W. M. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, p. 788-792, 1995.

KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; HAAPASALO, M. (2000). "Epidemiologia e patogênese da *Bacillus cereus* infecções ". *Micróbios Infect* 2 (2): 189-98. doi:10.1016/S1286-4579 (00) 00269-0. PMID 10742691

KRÜGER, C. C. H.; COMASSETTO, M. C. G.; CANDIDO, L. M. B.; BALDINI, V. L. S.; SANTTUCCI, M. C.; SGARBIERI, V. C. Biscoitos tipo "cookie" e "snack" enriquecidos, respectivamente com caseína obtida por coagulação enzimática e caseinato de sódio. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*. Campinas, v. 23, n. 1, p.81-86, jan/abr., 2003.

LIMA, C.D.L.C. LIMA, L.A., CERQUEIRA, M.M.O.P. , FERREIRA; E.G. , ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia* [online]. 2009, vol.61, n.1, pp. 266-272. ISSN 0102-0935.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M.; ALONSO, C.; ROMÁN, C.; GARCÍA-LÓPEZ, M. L.; MORENO B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiology*, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, Feb., 2000.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: RYSER, E.; MARTH, E.H. (Ed.). *Listeria*, listeriosis and food safety. 2nd ed. New York: M. Dekker. 1999. chap. 6, p. 131-224.

MATSUBARA, M. T. Impacto Da Implantação De Boas Práticas De Ordenha Na Redução Da Contaminação Do Leite Em Propriedades Do Agreste Pernambucano. Dissertação de Mestrado em Ciência Animal Universidade Estadual de Londrina 2009, 49p

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infection Disease*, Atlanta, v. 5, n. 5, p. 607–625, Sep./Oct. 1999.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALEZ, S.; OLIVER, G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, v. 64, n. 4, p. 559-663, Apr., 2001.

MENDES, E.S.; LIMA, E.C.; NUMERIANO, A.K.M.; COELHO, M.I.S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126, nov./dez. 1999.

MONTEIRO, A. A.; PIRES, A. C. S.; ARAUJO, Emiliane Andrade. *Tecnologia de Produção de Derivados do Leite*. Viçosa: UFV, 2007.

MOSES, B.D. (1938). Electric Pasteurization of Milk. *Agricultural Engineering* 12:525-526.

NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. *Probiotics: natural food antimicrobial systems*. Boca Raton: CRC, 2000. p.431-462.

NASSU, R.T.; MOREIRA, C.G.; ROCHA, R.G. de A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; MACEDO, A.A.M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzido no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 21-126, jul./ago. 2000.

NASSU, R. T.; ARAÚJO, R. S.; BORGES, M. F.; LIMA, J. R.; MACÊDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Diagnóstico das condições de processamento de

produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

NETO, L. G. G., et al. Influência do tratamento UAT no valor nutritivo do leite. Leite e derivados, São Paulo, vol. 12, n. 67, p. 36-39, nov./dez. 2002.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DAMBROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A. ; QUAGLIA, N. C. E CELANO, G. V. . Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.98, n.1, p.73-79, 2005.

PAIN, J.P.; DORNIER, M.; BAUDEZ, P. Le chauffage ohmique; Innovation industrielle pour le traitement UHT des produits particulaires, Ind. Alim. et Agric., v.112, n.6, p. 405-450, 1995.

PAIVA, M.S.D.; CARDONHA, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33-37, jan./fev. 1999.

PEREDA, J. A. O. (org.). Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre: Artmed, 2005.v.2.

PEREIRA, R.N.A, MARTINS, R.C., TEIXEIRA, J.A. E VICENTE, A.A. Caracterização Do Perfil De Ácidos Gordos Livres Durante A Pasteurização Convencional E Ôhmica, LEITE I+D+T p. 6 -8, 2007

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

PETTIT, B.; RITZ, M.; FEDERIGHI, M. (2002) Nouveaux Treatments Physiques de Conservation des Aliments

PINTADO, C. M. B. S.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M. A. S. S. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiology*, Amsterdam v. 21, n. 2, p. 213-216, Apr. 2004.

POTES, M. E. E MARINHO, A. A. Utilização de diferentes meios de cultura na identificação e recuperação de bactérias lácticas. *Revista Portuguesa de Ciência Veterinária* p.145-151v.102 (561-562) 2007.

PORTO, L. M.; SANTOS, R. C. S.; MIRANDA, T. L. S. Determinação das melhores condições operacionais do processo de produção da ricota. *B. CEPPA*, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 173-182, jan./jun., 2005.

RANGASAMY, P.N.; IYER, M.; ROGINSKI, H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. *Aust. J. Dairy Technol.*, v.48, p.93-95, 1993.

REALE, S.; VITALE, F.; SCATASSA, M. L.; CARACAPPA S.; CURRÒ V.; TODARO M. Molecular characterization of dominant bacterial population in "Vastedda della Valle del Belice" cheese: preliminary investigation. *ITALIAN Journal Animal Science* v. 6 (SUPPL. 1), 595-597, 2007.

REZENDE-LAGO, N.C.M.; ROSSI JR., O.D.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. AMARAL, L.A.. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. *Arquivo Brasileiro Medicina. Veterinaria. Zootenia*. [online]. 2007, vol.59, n.6, pp. 1563-1569. ISSN 0102-0935. doi:

10.1590/S0102-09352007000600032.

REZNICK, D. Ohmic heating of fluid foods. In: Ohmic heating for thermal processing of foods: government, industry and academic perspectives – overview outstanding symposia in food science & technology. Food Technology, 50(5): 250-251, 1996.

RODRIGUEZ, L. et al. Gram-positive, catalase cocci from dry cured Iberian ham and their enterotoxigenic potential. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.62, n.6, p.1897-1902, 1996.

ROSS, R. P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. Trends in Food Science & Technology, New York, v. 11, n. 3, p.96-104, mar., 2000.

RYAN, K.J.; RAY, C.G. (2004). Sherris Medical Microbiology (4^a ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.

SARANTINOPOULOS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAKI, M. D.; REA, M. C.; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal, v. 11, n. 8, p. 621-647, 2001.

SASTRY, S.K.; KIM, H.J. Ohmic heating for thermal processing of foods: government, industry and academic perspectives - overview outstanding symposia in food science & technology. Food Technology., v. 50, n.5, p. 241-245, 1996.

SCHLEGEL, L., GRIMONT, R., AGERON, E., GRIMONT, P.A.D., BOUVET, A.. 2003. Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov.

and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov. International Journal Systematic Evolution Microbiology 53:631-645

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Food Protection, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, Mar. 1998.

SILVA, P. H. F.; ALMEIDA, M. C. F. Estabilidade térmica do leite. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15, Juiz de fora, 2000. Anais do XV Congresso nacional de laticínios. Juiz de Fora: EPAMIG- Centro Tecnológico – ILTC, 2000. 500p. p. 157-163.

SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 2001. p.105

SILVA, I. M. M.; ALMEIDA, R. C. C.; ALVES, M. A. O.; ALMEIDA, P. F. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 81, n. 3, p. 241-248, Mar. 2003.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite *in natura*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n.1, p. 41-45, 2006.

SWAMINATHAN, B. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. (Ed.). Food microbiology, fundamentals and frontiers. 2nd ed., Washington D. C.: ASM, 2001. chap. 18, p. 383-409.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. *Microbiologia* 2008. 5^a.ed.

TAUXE, R. Foodborne disease in Mandell Douglas and Benett's Principles and

Practice of Infectious Diseases 2000

TEUBER, M. Fermented milk products. In: LUND, B. M.; BAIRD-PARKER, T. C.; GOULD, G. W. The microbiological safety and quality of Food. Gaithersburg: Aspen Publishers, Inc. p. 535-589, 2000. v. 1.

TURNBULL, P.C.B.; KRAMER, J.H. *Bacillus* pp 296-303 1996. In: MANUAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 5th ed. Balow, A American Society for Microbiology. Washington D.C. USA.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Leche e productos lácteos: tecnología, química y microbiología. Zaragoza: Acribia, 1995. 476p.

VEISSEYRE, R. Lactología técnica: composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. 2o ed. Zaragoza: Acribia, 1988. 629p.

VERNOZY-ROZAND, C. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococcal isolated from goats and cheese. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.30, n.3, p.271-280, 1996.

VILJOEN, B.C. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. International Journal Microbiology, v.69, p.37-44, 2001.

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

ZEGARRA, J. J. Q.,¹ BOTTEON, R.DE C.C. M., OLIVEIRA, B. C.R. DA S., BOTTEON, P. DE T.L., SOUZA , M. M. DE pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção

familiar no Município De Seropédica, Rio de Janeiro *Ciência Animal Brasileira*,
v. 10, n. 1, p. 312-321, jan./mar. 2009

CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido ao periódico internacional FOOD
MICROBIOLOGY

Diversidade da População de Bactérias Ácido-Láticas em Queijo de Coalho Artesanal Produzido com leite bovino no Nordeste do Brasil

**Torquato M. S. Neto¹; José A. C. Teixeira²; Lucília M. A. R. Domingues²;
Jose L Lima-Filho,³ ; , Maria T. H. Cavalcanti⁴, Ana L. F.Porto,^{4*}**

**¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Rua Manoel de Medeiros s/n – Dois Irmãos –PE –**

**²IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia
Biológica, Universidade do Minho, - 057 Braga, Portugal**

**³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco,
Avenida Prof. Luis Freire, 0740-540, Recife, PE, Brasil**

**^{4*}Departamento de Morfologia Animal e Fisiologia - Universidade Federal
Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil**

RESUMO

O Queijo de Coalho é tradicionalmente produzido de modo artesanal em pequenas propriedades localizadas nos estados do Nordeste Brasileiro a partir do leite cru sem adição de culturas iniciadoras. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a microbiota ácido-láctica do Queijo de Coalho produzido a partir de leite cru da bacia leiteira do Estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil, utilizando métodos morfofisiológicos e sequenciamento do gene 16S rRNA. Um total de 500 bactérias foram isoladas nos 5 municípios estudados, sendo que 370 delas (74%), apresentaram características de bactérias ácido – lácticas (BALs). Dentre as BALs o *Lactococcus lactis* apresentou a frequência de 78,38%; *Enterococcus faecalis* (18,92%) e *Leuconostoc* spp (2,77%). Foram escolhidas ao acaso 38 bactérias ácido-láticas para identificação por seqüenciamento do 16S rRNA, destas 84,21% foram confirmadas como BALs. A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o queijo de coalho apresenta uma microbiota predominantemente representada por BALs. O conhecimento da microbiota do queijo de coalho artesanal produzido em Pernambuco-Brasil poderá ser um passo inicial para o processo para obtenção do título de produto com Indicação Geográfica (IG).

Palavras chave: Queijo de Coalho artesanal, bactéria ácido láctica, seqüenciamento 16SrRNA, microbiota

1. Introdução

O Queijo de Coalho é um produto tradicionalmente produzido em pequenas propriedades localizadas nos Estados do Nordeste Brasileiro, tais como Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte e Paraíba. De maneira geral é produzido com leite de vaca cru sem a adição de bactérias iniciadoras, possuindo um formato retangular e sabor levemente ácido, de massa crua ou levemente cozida a partir do aquecimento da coalhada pela adição de soro aquecido a 80°C. Essas variações contribuem para uma grande diversidade na microbiota do produto (Leite Júnior et al., 2000).

Segundo Andrade (2009) para se obter um produto de qualidade não há necessidade de grandes investimentos em equipamentos, o que torna o queijo de coalho uma boa opção econômica para pequenos produtores. Embora simples, o processo vem sendo a cada dia aperfeiçoado com relação aos cuidados com a qualidade do produto. Em algumas fazendas, há um controle mais eficiente com relação à sanidade do rebanho, controle da acidez, embalagem e transporte, utilização das Boas Práticas de Fabricação – BPFs, para uma maior segurança do consumidor.

Muitos produtos lácteos, como queijo, e especialmente os artesanais, apresentam um complexo ecossistema microbiano, que é responsável pela grande diversidade de sabores e texturas a eles associados. O estudo dessa microbiota representa a possibilidade de uma ampliação no conhecimento existente quanto à contribuição na qualidade organoléptica dos produtos, assim como da genética populacional em estudo (Ogier et al., 2004).

Tradicionalmente, a análise dos microrganismos dominantes em queijos, tem sido realizada por cultivo, seguida da caracterização e identificação por métodos fenotípicos, bioquímicos e fisiológicos; entretanto, na última década, o perfil de populações microbianas tem sido identificado e caracterizado com utilização de métodos moleculares que permitem a detecção direta do DNA e RNA dos ecossistemas (Nikolic et al., 2008).

O objetivo deste trabalho foi estudar a microbiota ácido-lática do queijo de coalho elaborado a partir do leite cru produzido em cinco municípios na

região Agreste Meridional do Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, utilizando métodos morfofisiológicos e seqüenciamento do gene 16S rRNA.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras de Queijo de Coalho

As amostras de Queijo de Coalho produzido a partir de massa crua foram coletadas em laticínios situados nos municípios de Cachoeirinha (CA), São Bento do Una (SBU), Capoeiras (CAP), Buíque (ML) e Pesqueira (PESQ), localizados na região Agreste, considerada a maior produtora de queijo artesanal do Estado de Pernambuco.

Foram coletados no local de produção um total de cinco amostras de queijo produzido no mês de Janeiro de 2008, com leites crus e processados tradicionalmente todos obedecendo ao fluxograma apresentado na Figura 1, sendo uma amostra por fábrica.

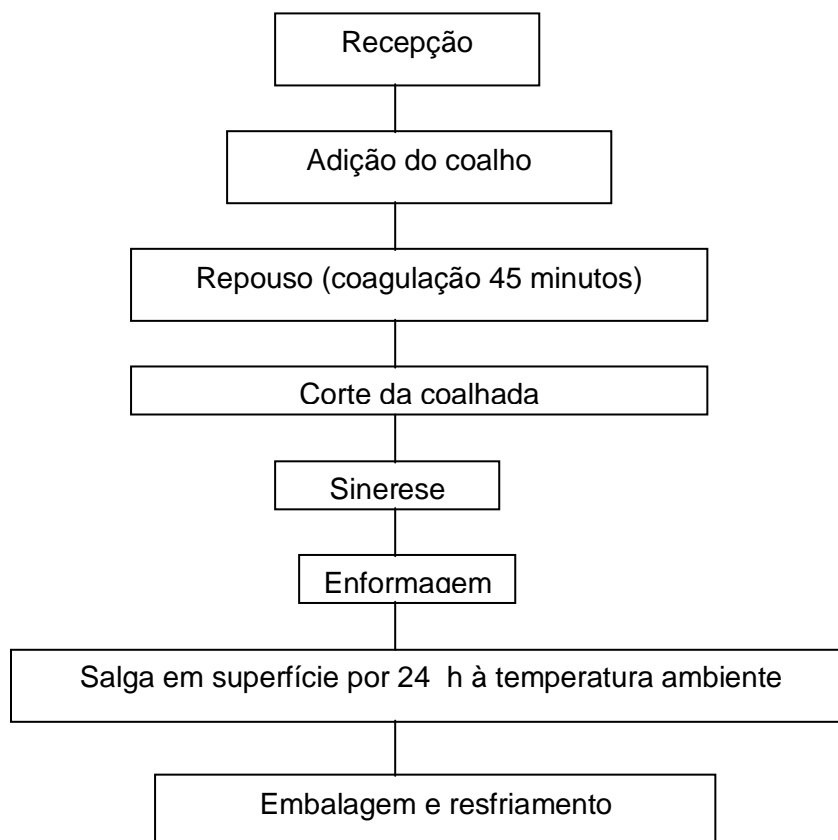


Figura 1. Fluxograma de produção do Queijo de Coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste do Estado de Pernambuco.

As amostras de queijos inteiros com 1 quilo de peso, em embalagens seladas, previamente refrigerados a 5°C após a sua fabricação, foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório para posterior análise.

2.2 Isolamento das bactérias

As amostras de queijo foram pesadas e maceradas na proporção de 1 g para 9 mL em uma solução de citrato trissódico esterilizado (2% p/v), com o auxílio de processador de alimentos comercial até obter um homogenato, que foi centrifugado a 6.297,6 x g. O precipitado (1,5 g) obtido foi macerado e centrifugado por 3 vezes, em seguida foi usado para o isolamento bacteriano

O precipitado obtido anteriormente foi completamente vertido e inoculado em 02 tubos contendo LDR 10% (leite desnatado reconstituído a 10%) e incubado nas temperaturas de 30°C e 37°C por 18 a 24 horas (1 tubo a 30°C e

outro a 37°C). Após o crescimento, comprovado por coagulação do leite, foi procedido o plaqueamento e sucessivas purificações dos microrganismos nos meios Ágar MRS e Ágar M17(37°C e 30°C) e Ágar Muller-Hinton a 37° C por 18 a 24 horas (CARVALHO,2007). As colônias foram escolhidas ao acaso para posterior identificação por métodos bioquímicos e por sequenciamento do seu DNA.

2.3 Fenotipagem

Com as bactérias isoladas foram realizados testes preliminares como Coloração de Gram (Gram Color Kit - Liofilchen Diagnostici- Roseto degli Abruzzi-Italy) e catalase (teste de Catalasi / Oxy Teste - Liofilchen Diagnostici-Roseto degli Abruzzi-Italy). A partir dos resultados obtidos, as bactérias ácido-lácticas foram confirmadas por outros testes tais como: morfologia, esporulação e motilidade (CARVALHO,2007).

Após a identificação as bactérias ácido – lácticas foram estocadas a – 20°C em LDR 10 % contendo 3 % de glicerol.

2.4 Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA

A identificação molecular foi realizada utilizando primers específicos para BALs, por meio de seqüenciamento no laboratório DNA Vision localizado em Liège – Bélgica utilizando o protocolo de rotina do laboratório. Foram escolhidas randomicamente 38 placas contendo as colônias purificadas e previamente identificadas por métodos bioquímicos, da seguinte forma: 17 placas da amostra CA, 04 de SBU, 09 de CAP, 03 de ML e 05 de PESQ.

O DNA foi extraído a partir de colônias bacterianas puras e um fragmento do gene 16S foi amplificado e sequenciado. As seqüências obtidas foram comparadas ao banco de dados BIBI Database (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>)

3.Resultados

Foram isoladas 500 bactérias dos 5 municípios estudados, sendo que 370, ou seja 74%, apresentaram características de bactérias ácido – lácticas (BALs) de acordo com os resultados obtidos nos testes de coloração de Gram, catalase, presença de esporos e motilidade.

De acordo com a Figura.02 o queijo produzido no município de Capoeiras foi o que apresentou a maior freqüência de BALs, tanto por identificação por provas morfofintoriais e bioquímicas (90%) quanto por sequenciamento do gene 16S r RNA (88,88%), seguido pelos municípios de Cachoeirinha (72% e 90%), Buíque (80% e 33,33%), São Bento do Una (60% e 50%) e Pesqueira (60% e 25%)

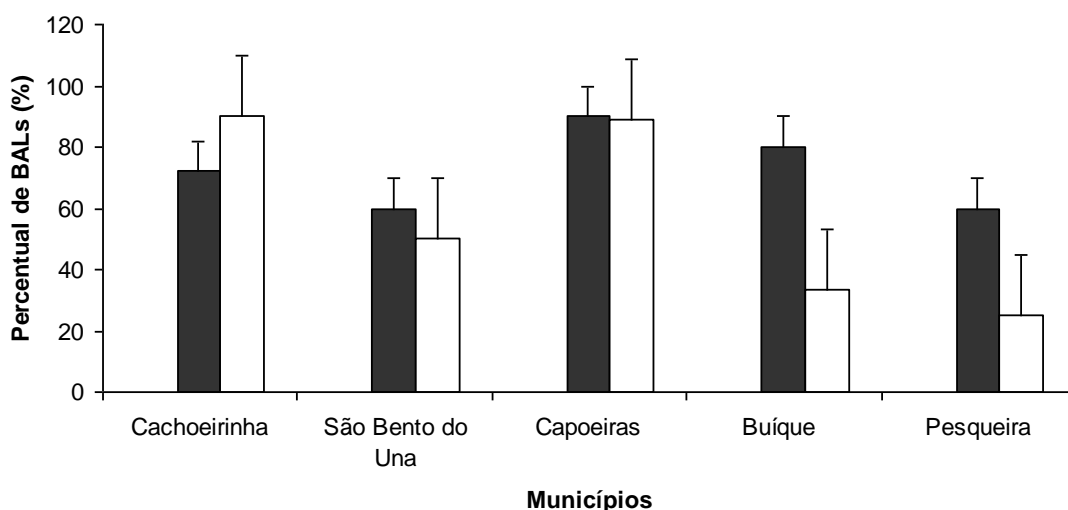


Figura 02. Percentual de Bactérias Ácido Lácticas – BALs, Identificadas por provas fenotípicas/bioquímicas e por sequenciamento do fragmento 16S rRNA nos 05 municípios estudados da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil. Identificação por provas bioquímicas ■ e □ Identificação por sequenciamento.

A espécie isolada em maior número nos 05 municípios foi *Lactococcus lactis* (78,38%) que obteve a maior freqüência em relação às demais BALs como *Enterococcus faecalis* (18,92%) e *Leuconostoc* spp.(2,7%).

Dos constituintes da microbiota do queijo de Coalho analisados por métodos morfo-bioquímicos, 84,21% foram confirmados pelo sequenciamento do gene 16S r RNA (Tabela 01)

Tabela 01. Bactérias ácido-láticas isoladas das amostras de queijo de Coalho identificados por provas bioquímicas e confirmação por sequenciamento 16S rRNA produzidos nos 05 municípios estudados da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil.

TIPO DE IDENTIFICAÇÃO		
	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR
AMOSTRA/ MUNICÍPIO		
CACHOEIRINHA	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
BUÍQUE	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
CAPOEIRAS	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Leuconostoc spp.</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Leuconostoc citreum</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Enterococcus italicus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
PESQUEIRA	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
SÃO BENTO DO UNA	<i>Leuconostoc spp.</i> <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Leuconostoc lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

4. Discussão

Alimentos típicos e tradicionais representam um importante patrimônio para uma determinada região e uma grande oportunidade para o desenvolvimento de áreas rurais.

Esta é a razão pela qual se busca a Denominação de Origem Controlada (DOC) do Queijo de Coalho, produzido na bacia leiteira do Estado de Pernambuco – Brasil, representando dessa feita, o primeiro passo para expansão do mercado.

Neste trabalho, buscamos definir a microbiota mais representativa no processo visando a obtenção da DOC para o Queijo de Coalho. Objetivamos conhecer as BALs responsáveis por características únicas dessa variedade de queijo.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, o grupo das bactérias ácido – lácticas representaram a maior proporção dentre as bactérias isoladas, tendo sido o *Lactococcus lactis* a principal espécie encontrada, por ser o queijo de coalho, de massa fresca e de consumo rápido sem maturação.

Bactérias ácido-lácticas têm sido observadas em altos valores em relação a outros grupos encontrados em queijos artesanais, produzidos a partir de leite cru e pasteurizado na Sicília- Itália (Randazzo et al., 2002, 2006).

Avaliando a microbiota láctica de queijos de coalho artesanais produzidos no Ceará, Cavalcanti (2007), relata que o gênero *Lactococcus* é predominante em queijos que não sofrem cozimento de massa. Fortina et al. (2003) observaram que dos microrganismos isolados de queijos artesanais Toma piemontese, protegido pela denominação de origem na Itália, 67% eram representados pelo gênero *Lactococcus* o que corrobora com os dados obtidos nesse trabalho. Torres-Llanes et al. (2006) encontraram em queijos de massa fresca produzidos a partir de leite de vaca no México, uma predominância de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, Dolci et al. (2008) relatam que das bactérias identificadas o *L. lactis* subsp. *lactis* foi a que apresentou maior frequência.

O *Lactococcus lactis* subespécies *lactis* e *cremoris*, contribuem significativamente para o sabor do queijo de coalho, assim como suas

interações com outras bactérias (*Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc* sp.) encontradas no produto e descritas neste trabalho. A participação efetiva desta espécie e suas subespécies, no sabor de produtos lácteos entre eles o queijo, já foi confirmado por Teuber (1995), que relata que das espécies de *Lactococcus* conhecidas a única que contribui significativamente para a produção de produtos lácteos é o *Lactococcus lactis* sendo as subespécies *lactis* e *cremoris* as mais importantes no desenvolvimento do sabor dos queijos.

O gênero *Enterococcus* é um grupo bacteriano complexo, diverso e importante encontrado em uma grande variedade de produtos alimentícios, dentre os quais leite e queijos. Eles possuem papel relevante no desenvolvimento das características organolépticas (sabor e aroma) dada a proteólise e formação de componentes voláteis no produto final (Cogan et al., 1997). Em adição a essas propriedades tecnológicas, muitas espécies de *Enterococcus*, principalmente *E. faecalis* e *E. faecium*, podem produzir uma variedade de bacteriocinas ativas contra patógenos tais como *Bacillus cereus* (Valenzuela et al. 2009) encontrados nos alimentos.

Carvalho (2007) identificou 0,6% de *Leuconostoc* sp. em suas amostras de Queijo de Coalho produzidos no Ceará a partir de massa pré-cozida. Este gênero, assim como o gênero *Enterococcus* tem importância tecnológica próxima (aromatizante), conferindo ao queijo uma identidade própria.

Cibik e colaboradores (2000) analisando amostras de queijos franceses tradicionais maturados, através de técnicas moleculares encontraram uma frequência de *Leuconostoc spp.* (14%) acima da encontrada neste estudo 2,63%. Apesar da sua presença, o papel desta espécie em tecnologias tradicionais, ainda não foi determinada, dada a falta de critérios de identificação da linhagem.

De acordo com Delgado e Mayo (2004) os testes bioquímicos e fisiológicos em queijos artesanais espanhóis, são pouco eficientes em separar biótipos atípicos de espécie fenotipicamente relacionada, entretanto no nosso estudo foi encontrada a confirmação de 84,21% das bactérias identificadas por provas bioquímicas e submetidas ao sequenciamento do gene 16S r RNA.

Diop e colaboradores (2007) afirmam que os resultados da identificação bioquímica indicam um percentual de similaridade de 91% entre as

identificações bioquímica e molecular para algumas bactérias ácido lácticas isoladas de alimentos fermentados do Senegal - África, sendo priorizada a identificação molecular devido a sua concordância com a análise morfológica previamente realizada, estando próximo dos nossos resultados que apresentaram 84,21% de similaridade.

5. Conclusão

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o queijo de coalho produzido pelos Cinco Municípios da Bacia Leiteira de Pernambuco possui uma microbiota representada basicamente por bactérias ácido-lácticas, dentre as quais se destacam os *Lactococcus lactis* subesp. *lactis* e *cremoris*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc* spp. Estes dados são úteis para caracterização desse tipo de queijo artesanal, que apresenta uma microbiota láctica específica, que se manteve constante nos municípios estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa sanduiche concedida para Universidade do Minho, ao órgão de fomento tecnológico – FACEPE; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, a todos os produtores de queijo de coalho que disponibilizaram as suas amostras.

6. Referência Bibliográficas

Andrade, M. do C., Queijo de Coalho. Pesquisa Escolar On-Line, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://www.fundaj.gov.br>>. Acesso em: 27 novembro. 2009.

Carvalho, J. D. G. Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas.

2007. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

Cavalcante¹ J. F.M., Andrade N. J. de, Furtado M. M., Ferreira C.L.de L.F., Pinto², C. L. de O., Elard E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena *Ciência Tecnologia Alimentar*, Campinas, v. 27, n.1, pp. 205-214, 2007

Cibik, R. ; Lepage, E. ; Tailliez, P. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification, *Systematic and Applied Microbiology* v. 23, n. 2, pp. 267-278, 2000.

Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E.. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal Dairy Reseursh.* v. 64, pp. 409–421.1997.

Delgado, S., Mayo, B. Phenotypic and genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus* spp. Strains isolated from Northern Spain starte-free farmhouse cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam v.90 n.3 pp. 309-319, 2004.

Diop, M. B. et al. Bacteriocin producers from tradiotional food products. *Biotechnological Agronomy Society Enviromental.* Belgiun v.11 n.4, pp.275-281, may. 2007.

Dolci, P. Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., Cocolin L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria *Food Microbiology* v. 25 p. 392–399. 2008.

Fortina, M. G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. & Manachini, P. L. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an

artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology* n. 20, pp. 397–404, 2003.

Leite Junior, A.F.S., Florentino, E. R., Oliveira, E.B. Qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. *Rev Hig Alimentar* 4:53-59, 2000.

Nikolic M., Terzic-Vidojevic A., Jovcic B., Begovic J., Golic N., Topisirovic L. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese *International Journal of Food Microbiology* n.122 pp.162–170, 2008

Ogier, J.-C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J. –Y., Delacroix-Buchet, A. . Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n.9, pp. 5628-5643. 2004.

Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., Vaughan, E.E., Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Applied. Environ. Microbiology* v. 68, pp.1882–1892, 2002.

Randazzo, C.L., Vaughan, E.E., Caggia, C., Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *Int. Journal of Food Microbiology* v.109, pp. 1–8. 2006.

Teuber M., The genus *Lactococcus*. In: B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, Editors, *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic & Professional, London, p. 173–234. 1995

Torres-Llannes, M. J.; Valejo-Cordoba, B.; Díaz-Cinco, M. E.; Mazorra-Manzano, M. A.; Gonzalez-Córdova, A. F. Characterization of the natural

microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. *Food Control*, n.17, pp.683-690, 2006.

Valenzuela A. S. Omar N. B., Abriouel H., Lopez R. L., Veljovic K., Canamero M. M., Topisirovic M.K. L., Galvez A. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* n. 20 pp. 381–385, 2009.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser enviado ao periódico internacional Food control

Avaliação das Práticas de Fabricação do Queijo de Coalho Artesanal Produzido na Região Agreste do Estado de Pernambuco Utilizando como Parâmetro o Índice Bacteriano Não Ácido-Lático

Torquato M. S. Neto ¹; José A. C. Teixeira ²; Lucília M. A. R. Domingues ²;
José.L. Lima-Filho ³ ; Maria T. H. Cavalcanti ⁴; Ana L. F. Porto ^{4*} .

¹Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Rua Manoel de Medeiros s/n – Dois Irmãos –PE – CEP 52.171-900

²IBB-Instituto de Biotecnologia e Bioengenharia, Centro de Engenharia Biológica,
Universidade do Minho, 4710 - 057 Braga, Portugal

³Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida
Prof. Luis Freire, CEP 0740-540, Recife, PE, Brasil

^{4*}Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural
de Pernambuco, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

RESUMO

O queijo de Coalho é produzido há mais de 150 anos, em vários Estados da região Nordeste do Brasil sendo fabricado a partir do leite cru e consumido tradicionalmente fresco. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o ecossistema bacteriano não ácido-lático no queijo de Coalho produzido em cinco municípios da Bacia Leiteira do Estado de Pernambuco, Brasil. As amostras de queijo de Coalho utilizados neste estudo foram produzidas com leite cru e de forma artesanal. A avaliação microbiológica das bactérias não ácido-láticas foi realizada por métodos fenotípicos e bioquímicos, além do sequenciamento do gene 16 S rRNA. Um total de 500 bactérias foram isoladas e identificadas fenotipicamente. Dos queijos de Coalho produzidos nos 5 municípios estudados, 26% eram não ácido-láticas, tais como: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus salivarius*, *Streptococcus bovis*, *Listeria spp.*, *Klebsiella spp.*, *Bacillus sp.* Dentre estas, o *B. cereus* apresentou maior frequência (42,31%). Após o sequenciamento do gene 16S rRNA, das 38 amostras analisadas 23,69% foram identificadas como bactérias não ácido-láticas, 77,78% *Streptococcus bovis*, 11,11% *Klebsiella oxytoca*, 11,11% *Escherichia coli*. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de melhoria das boas práticas de fabricação de queijo de Coalho artesanal pelos produtores dos municípios avaliados.

Palavras chave: artesanal, patogênica, molecular, seqüenciamento

1. Introdução

A Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, define este produto como um queijo de consistência semi dura e elástica, com textura compacta e macia, podendo apresentar algumas olhaduras. Apresenta cor branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, com aroma, também ligeiramente ácido, que lembra massa de queijo coagulada (BRASIL, 2001).

A legislação brasileira estabelece que o leite utilizado na fabricação de queijos deve ser submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (BRASIL, 1996). Apesar disso, somente as unidades produtoras sob inspeção é que promovem o tratamento térmico do leite (NASSU et al., 2001). O queijo de coalho artesanal tem sido produzido em grandes quantidades, a partir de leite cru, em pequenas indústrias do Nordeste Brasileiro, sendo tradicionalmente produzido em Pernambuco (PEIXOTO et al., 2007).

Além de ser fonte de bactérias ácido lácticas, o leite cru também é a principal fonte de microrganismos patogênicos nos queijos de Coalho artesanais. Contudo, a presença de bactérias não ácido-láticas em queijos fabricados com leite pasteurizado ocorre devido à contaminação pós-pasteurização (GRAPPIN e BEUVIER, 1997).

Muitas bactérias contribuem positivamente para a qualidade organoléptica de queijos ou de produtos lácteos fermentados, enquanto outras podem ter um efeito adverso ou podem representar um risco para a saúde do consumidor (OGIER et al., 2004).

Vários estudos sobre a qualidade microbiológica do queijo de Coalho relataram a ocorrência de bactérias não ácido-láticas além, dos limites estabelecidos pela legislação (FEITOSA et al., 2003, BASTOS et al., 2001; NASSU et al., 2000; e PAIVA CARDONHA, 1999, SANTOS et al., 1995). Entre as bactérias não ácido-láticas foram detectadas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

Avanços na biotecnologia e principalmente no campo da biologia molecular (reação em cadeia de polimerase, clonagem e seqüenciamento de

DNA) têm permitido o desenvolvimento de técnicas que não exigem o cultivo de microrganismos (independente da cultura), permitindo o estudo aprofundado da microbiota (ROSSETTI e GIRAFFA, 2005).

A identificação dos microrganismos nos alimentos é realizada principalmente por métodos bioquímicos e fenotípicos. No entanto, estes métodos são muito demorados e nem sempre sensíveis. Em resposta a esta situação, métodos baseados em biologia molecular têm sido desenvolvidos para a identificação até o nível de subespécies de microrganismos. As técnicas moleculares fornecem ferramentas adequadas para a classificação e acompanhamento do desenvolvimento de microrganismos envolvidos na transformação de alimentos (GERMOND et al., 2003; ROSSETTI e GIRAFFA, 2005).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar o ecossistema bacteriano não ácido-lático isolado a partir de amostras de queijo de Coalho produzidos com leite cru, através de métodos fenotípicos e bioquímicos de identificação e por sequenciamento do gene 16S rRNA.

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras de queijo de coalho

As amostras de Queijo de Coalho produzidas a partir de massa crua foram coletadas em laticínios situados nos municípios de Cachoeirinha (CA), São Bento do Una (SBU), Capoeiras (CAP), Buíque (ML) e Pesqueira (PESQ), localizados na região Agreste, considerada a maior produtora de queijo artesanal do Estado de Pernambuco.

Foram coletados no local de produção um total de cinco amostras de queijo produzidas no mês de Janeiro de 2008, com leite cru e processadas tradicionalmente de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 01, sendo uma amostra por fábrica.

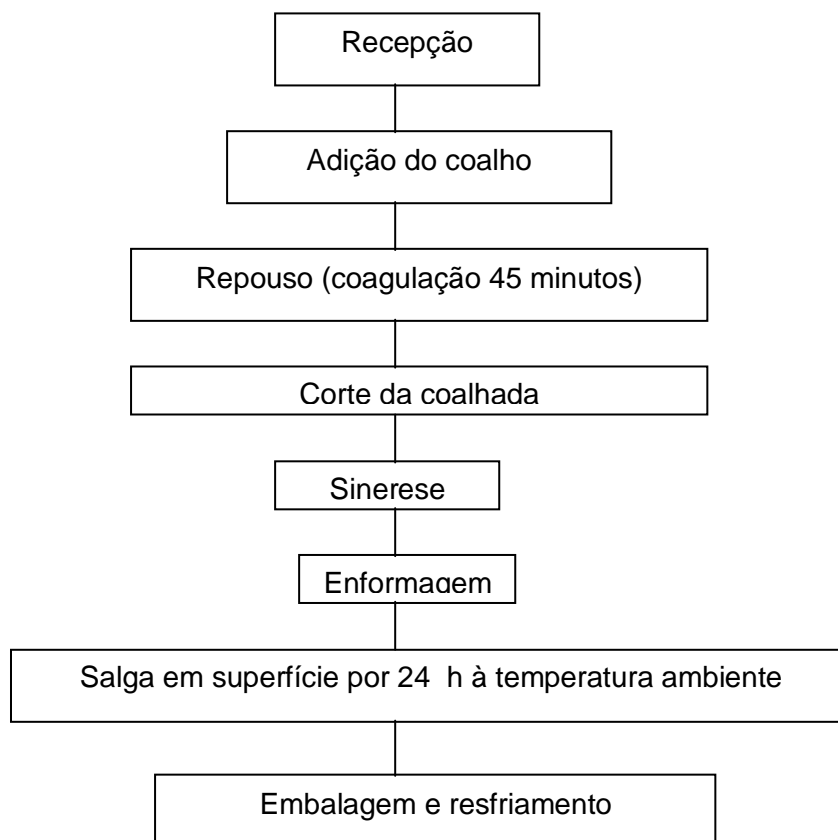


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo de coalho artesanal fabricado a partir de leite cru pelos produtores na região Agreste do Estado de Pernambuco.

As amostras de queijos inteiros com 1Kg de peso, em embalagens seladas, previamente refrigerados a 5°C após a sua fabricação, foram transportadas em caixas isotérmicas até o laboratório para posterior análise.

2.2 Isolamento das bactérias

As amostras de queijo foram pesadas e maceradas na proporção de 1 g para 9 mL em uma solução de citrato trissódico esterilizado (2% p/v), com o auxílio de processador de alimentos comercial até obter um homogenato, que foi centrifugado a 6.297,6 x g. O precipitado (1,5 g) obtido foi macerado e centrifugado por 3 vezes, em seguida foi usado para o isolamento bacteriano

O precipitado obtido anteriormente foi completamente vertido e inoculado em 02 tubos contendo LDR 10% (leite desnatado reconstituído a 10%) e incubado nas temperaturas de 30°C e 37°C por 18 a 24 horas (1 tubo a 30°C e

outro a 37°C). Após o crescimento, comprovado por coagulação do leite, foi procedido o plaqueamento e sucessivas purificações dos microrganismos nos meios Ágar MRS e Ágar M17(37°C e 30°C), Ágar Muller-Hinton a 37° C por 18 a 24 horas (CAVALCANTI, 2007). As colônias foram escolhidas ao acaso para posterior identificação por métodos fenotípicos e bioquímicos e por sequenciamento do seu DNA.

2.3 Identificação por métodos fenotípicos e bioquímicos

Com as bactérias isoladas foram realizados testes preliminares tais como: Coloração de Gram (Gram Color Kit - Liofilchen Diagnostici- Roseto degli Abruzzi-Italy) e catalase (teste de Catalasi / Oxy Teste - Liofilchen Diagnostici-Roseto degli Abruzzi-Italy). A partir dos resultados obtidos, as bactérias ácido lácticas foram confirmadas por outros testes tais como: morfologia, esporulação e motilidade.

Para identificação das bactérias consideradas não ácido-láticas foram utilizados kits comerciais, para: *Staphylococcus* (Microgen™Staph - ID System - Microgen Bioproducts), *Streptococcus* (Strpto Sistema 9R - Liofilchen Diagnostici), *Bacillus* (Microgen™Bacillus - ID System - Microgen Bioproducts) e *Lysteria* pelo método descrito por Rodrigues e colaboradores (2003).

2.4 Identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA

A identificação molecular foi realizada por meio de seqüenciamento no laboratório DNA Vision localizado em Liège – Bélgica utilizando o protocolo de rotina do laboratório. Foram escolhidas randomicamente 10 placas contendo as colônias purificadas e previamente identificadas por métodos bioquímicos, da seguinte forma: 01 placa da amostra CA, 02 de SBU, 01 de CAP, 02 de ML e 04 de PESQ.

O DNA foi extraído a partir de colônias bacterianas puras e um fragmento do gene 16S foi amplificado e seqüenciado. As seqüências obtidas foram comparadas ao banco de dados BIBI Database (<http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>)

3. Resultados e Discussão

Um total de 500 bactérias foi isolado nos 5 municípios estudados, sendo que 370 amostras, ou seja 74%, apresentaram características de bactérias ácido – lácticas (BALs) de acordo com os resultados obtidos nos testes de coloração de Gram, catalase, presença de esporos e motilidade. Bactérias ácido-lácticas têm sido observadas em grande número em queijo Pecorino artesanal produzido no sul da Itália por outros autores em relação a outros grupos de microrganismos (RANDAZZO *et al.*, 2006).

Os dados obtidos através das provas bioquímicas demonstram que além das bactérias lácticas encontradas, foram identificadas bactérias não ácido lácticas, sugerindo a contaminação do queijo, quer seja na matéria-prima (leite) ou mesmo no produto acabado. De acordo com os métodos fenotípicos e bioquímicos de identificação 26% das bactérias foram identificadas como bactérias não ácido-lácticas. As freqüências das bactérias não ácido-lácticas identificadas estão demonstradas na Figura 02.

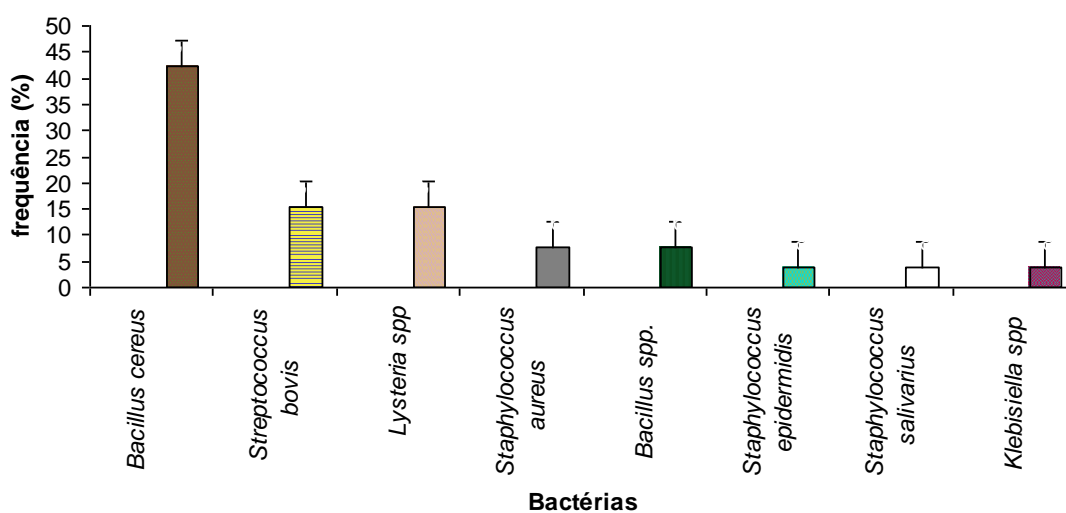


Figura 02. Freqüências das bactérias patogênicas isoladas no queijo de Coalho produzido em 05 municípios da bacia leiteira do Estado de Pernambuco – Brasil e identificadas por métodos fenotípicos e bioquímicos.

O *Bacillus Cereus* apresentou maior frequência dentre as bactérias não ácido-láticas identificadas por provas bioquímicas (42,31%). Siafaras e colaboradores (2008) relatam que das 56 bactérias não ácido-láticas isoladas em amostras de queijo grego produzido a partir de leite de ovelha, encontradas, 5,36 % foram de *B. cereus*.

Randazzo e colaboradores (2006) encontraram maior frequência de *Streptococcus bovis* no queijo Pecorino fabricado a partir do leite de ovelha cru, enquanto que Carvalho (2007) encontrou uma frequência de 14,6% do gênero *Streptococcus* em queijo de coalho obtido a partir de coalhada pré-cozida, abaixo do encontrado nesse estudo que foi de 18% de *Streptococcus bovis*.

Dentre as bactérias não ácido-láticas detectadas por Bastos e colaboradores (2001), que estudaram a implantação das Boas Práticas de Fabricação em uma indústria produtora de queijo de coalho no Estado do Ceará destacaram-se *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

O isolamento de *L. monocytogenes* em queijos artesanais e industrializados indica que nem sempre os procedimentos tecnológicos e higiênico-sanitários empregados são suficientes para evitar a presença e multiplicação desses microrganismos, o que mostra a necessidade de intensificação do controle oficial sobre a produção de queijos, tanto artesanais, sem qualquer tipo de fiscalização, bem como sobre os industrializados (SOUZA,2002).

Souza (2002) identificou *Listeria* sp. em 17,1% das amostras de queijo de coalho artesanal comercializados em Fortaleza-CE, enquanto que neste estudo foi observada uma frequência de 4%. Feitosa e colaboradores (2003) detectou uma frequência de 9% de *Listeria* sp. em amostras de queijos de Coalho produzidos no Rio Grande do Norte, resultados superiores aos obtidos no presente trabalho.

A ocorrência de *S. aureus* tem sido relatada em estudos sobre a qualidade microbiológica do queijo de Coalho nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte (FEITOSA et al., 2003; BORGES et al., 2003), o que corrobora com os descritos neste trabalho, e estão relacionados com a forma de elaboração do queijo, quase sempre produzidos de forma artesanal e normalmente a partir de leite cru, sem os devidos cuidados de higiene ou em

pequenas indústrias que não adotam Boas Práticas de Fabricação (BORGES et al., 2003).

Santana et al. (2008) identificou o gênero *Klebsiella* (6,7%) em queijos de coalho produzidos a partir de leite cru e comercializados em 15 pontos de venda do Mercado Central de Aracaju - SE , Brasil, esses resultados são maiores do que os encontrados neste estudo (2,38%).

Amostras das bactérias foram randomicamente selecionadas e após o sequenciamento do gene 16S rRNA (Tabela.01) obtivemos os seguintes resultados: das 38 amostras analisadas, 23,69% foram identificadas como bactérias não ácido-láticas, destas 77,78% eram *Streptococcus bovis*, 11,11 % *Klebsiella oxytoca*, e 11,11% *Escherichia coli* (Tabela 01).

Tabela 01. Bactérias não ácido-láticas isoladas das amostras de queijo de Coalho produzidos nos 05 municípios da Região Agreste Meridional – Pernambuco – Brasil identificados por provas bioquímicas e confirmação por sequenciamento 16S rRNA .

TIPO DE IDENTIFICAÇÃO		
AMOSTRA/ MUNICÍPIO	Método Bioquímico	Sequenciamento do 16S rRNA
CACHOEIRINHA	<i>Staphilococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
BUÍQUE	<i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus bovis</i>	<i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus bovis</i>
PESQUEIRA	<i>Bacillus</i> sp. <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Klebisiella oxytoca</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus bovis</i> <i>Streptococcus bovis</i>
SÃO BENTO DO UNA	<i>Bacillus</i> sp. <i>Streptococcus bovis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus bovis</i>

Em inspeção realizada por Bastos e colaboradores (2001) em laticínio localizado no município Buenos Aires - Ceará foram encontradas algumas falhas em procedimentos de higiene e sanitização (com reflexão sobre a qualidade dos queijos de coalho) notando-se a necessidade da implementação das Boas Práticas de Fabricação para o controle dos pontos críticos do processo de produção.

Altos níveis de contaminação (10^3 e 10^6 UFC / g) por *S. aureus* têm sido encontrados em queijo de coalho produzido em diversos Estados do Nordeste: Rio Grande do Norte (PAIVA CARDONHA, 1999), Ceará (FEITOSA et al., 2003), Paraíba (FLORENTINO e MARTINS, 1999) e Pernambuco (MENDES et al., 1999). Estes níveis são preocupantes, uma vez que não se enquadram às normas estabelecidas pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Saúde, estando o máximo permitido em 10^3 UFC / g (BRASIL, 2001 e 1996).

4. Conclusão

As características higiênico-sanitárias da produção artesanal do queijo do Coalho dos 05 municípios da Região Agreste Meridional do Estado de Pernambuco-Brasil avaliados, demonstraram a presença de bactérias patogênicas que estão associadas à qualidade da matéria-prima (principalmente a elaboração do queijo a partir do leite sem tratamento térmico), e às condições de fracionamento do queijo de coalho e manuseio durante a sua comercialização. Se faz necessária a implantação das boas práticas de produção do queijo de coalho nesses municípios.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa sanduiche concedida, ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, a todos que fazem a Universidade do Minho, em especial ao Departamento de Engenharia biológica e a todos os produtores de queijo de coalho que disponibilizaram as suas amostras.

5. Referências Bibliográficas

Bastos, M. do S.R.; Nassu, R.T.; Borges, M. de F.; Silva, J.B. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no Estado do Ceará, visando a implantação das Boas Práticas de Fabricação. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 57, n. 321, pp. 130- 136, 2001.

Borges, M. F. de ; Feitosa, T ; Nassau, Tieko R. ; MUNIZ, C.R. ; Azevedo E. H. F. de ; Figueiredo, E. A. T. de . Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil.. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba, v. 21, n. 1, pp. 31-40, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 07/03/1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11/03/1996. p. 3977-3978.

BRASIL.Instrução Normativa nº 30 de 26 de julho de 2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF,16/07/2001. Seção 1, p. 14-15.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 02/01/2001. p. 1-54.

Carmo, L.S.; Dias, R.S.; Linardi, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas Cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiology, v.19, p.9-14, 2002.

- Carvalho, J. D. G. Caracterização da Microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- Cibik, R. ; Lepage, E. ; Tailliez, P. Molecular diversity of *Leuconostoc mesenteroides* and *Leuconostoc citreum* isolated from traditional French cheeses as revealed by RAPD fingerprinting, 16S rDNA sequencing and 16S rDNA fragment amplification, *Systematic and Applied Microbiology* v. 23, n. 2, pp. 267-278, 2000.
- Cavalcante, J. F. M.; Andrade, N. J.; Furtado, M. M. ; Ferreira, C. L. L.F.; Pinto, C. L. O.; Elard, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, v.27, n.1, pp. 205-214, 2007.
- Feitosa, T.; Borges, M. F.; Nassu, R. T.; Azevedo, E. H. F.; Muniz, C. L. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microorganismos indicadores higiênicos sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia Alimentar*. v.23, p.162-165, 2003.
- Florentino ER, Martins RS. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no Estado da Paraíba. *Revista Higiene Alimentar*, v.13, n. 59, p. 43-48, 1999.
- Germond, J. E., Lapierre, L., Delley, M., Mollet, B., Felis, G. E., Dellagio, F. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. *Molecular Biology Evolution*, v. 20, p. 93-104, 2003.
- Grappin, R., Beuvier E.. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. *International Dairy Journal*. 7:751-761, 1997.

- Mendes, E.S.; Lima, E.C.; Numeriano, A.K.M.; Coelho, M.I.S. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e coliformes em queijos de “coalho” comercializados em Recife. *Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 66/67, p. 122-126,. 1999.
- Nassu, R.T.; Moreira, C.G.; Rocha, R.G. de A.; Feitosa, T.; Borges, M. de F.; Macedo, A.A.M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzido no Estado do Rio Grande do Norte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 55, n. 315, p. 21-126, 2001.
- Ogier, J.-C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V., Gruss, A., Leveau, J. –Y., Delacroix-Buchet, A.. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 9, p. 5628-5643, 2004.
- Paiva, M.S.D.; Cardonha, A. M. S. Queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, n. 61, p. 33-37, jan./fev. 1999.
- Peixoto A. M. S., Praça E. F.; Góis V. A. A Potencialidade Microbiológica De Coagulação Do Coalho Líquido Artesanal *Revista Verde (Mossoró – RN – Brasil)* v.2, n.2, p. 52 – 64, 2007.
- Randazzo, C.L; Valghan, E.E; Caggia, C. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal Food Microbiology*. v.25, p.01-08, 2006
- Rodrigues, D.A.; Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T. Avaliação da eficiência de três ágaros seletivos no isolamento de *Listeria monocytogenes*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23 p. 87-92, 2003.

- Rossetti, L., Giraffa, G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, v. 63, p.135 – 144, 2005.
- Santos, F. A.; Nogueira, N. A. P.; Cunha, G. M. A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 31-361, 1995.
- Santana, R.F. Santos, D.M. Martinez, A.C.C. Lima, Á.S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.6, p.1517-1522, 2008
- Siafras, G.; Hatzikiamari, M.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Tzanetakis, N. Antibacterial activities of the surface microflora of Kefalograviera cheese. *Food Control*, v.19 p.898-905, 2008.
- Souza, R.A. Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE. Fortaleza,. 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará (UFCE) 2002.

CAPÍTULO 3

Artigo a ser enviado ao periódico internacional Journal of Dairy Science

Efeito do Aquecimento Ôhmico nas Características Físico-químicas e Sensoriais do Queijo de Coalho do Brasil

Santos Neto, T. M. ¹; Pessoa Jr, A.¹; Penna, T.C.V. ²; Saad, S.M.I.². Teles, E.O.³, Cavalcanti, M. T. H.¹, J. A. Teixeira ⁴, A. A. Vicente ⁴, Porto, A. L. F.¹*

^{*1} Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos- Labtecbio - Departamento de Morfologia Animal e Fisiologia - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, PE, Brasil

² Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B16, Cidade Universitária, - São Paulo – Brasil

³ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal - VPS
Laboratório de Higiene Alimentar, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, B16, Cidade Universitária, - São Paulo – Brasil

⁴ Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710 – 057 Braga, Portugal

RESUMO

Processo de aquecimento ôhmico é uma tecnologia emergente para a pasteurização do leite, uma vez que permite aquecer rapidamente e uniformemente os materiais que lhe são submetidos, podendo ser considerado um processo HTST (High Temperature Short Time). O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e sensoriais do queijo de coalho produzido a partir do leite de vaca no Estado de São Paulo – Brasil, tratado por método convencional de pasteurização e por aquecimento ôhmico, além do teste de aceitabilidade. Os valores médios encontrados para os parâmetros físico-químicos foram: pH-6,6; umidade-59,27g/ 100g; cinzas-2,33g/100g; carboidrato – 7,77 g/100g; acidez-0,942 (g/100g de ácido láctico); proteína - 13,06g/100g; peso-1,551Kg; sinerese 57mL. Quanto aos resultados referentes a textura, quando os queijos foram comparados entre si, não foram detectadas diferenças para os parâmetros elasticidade, adesividade, coesividade e dureza, havendo diferença entre os padrões de gomosidade e mastigabilidade entre os queijos obtidos a partir de leite tratado por aquecimento ôhmico e pasteurizado. Todos os queijos de Coalho artesanais feitos com leite tratado por aquecimento ôhmico obtiveram boa pontuação no teste de aceitabilidade, enquanto que os queijos de coalho feitos com leite pasteurizado, não alcançaram o índice mínimo de aceitação. Estes resultados indicam que o tratamento ôhmico poderá ser introduzido enquanto processo de pasteurização de leite para a produção de queijo de Coalho já que não influenciou negativamente a sua qualidade físico-química e organoléptica.

Palavras chave: queijo artesanal, bactéria ácido láctica, pasteurização, aquecimento ôhmico

1. Introdução

O leite é um dos mais antigos alimentos dos seres humanos, Brito e colaboradores (2006) o apontam como um alimento considerado perfeito, por fornecer nutrientes importantes à alimentação humana. Por conseguinte, o queijo, uma das formas mais antigas de alimento manufaturado. O queijo é o alimento que se obtém pela coagulação e fermentação do leite de vaca, de cabra, de ovelha, etc., e cuja massa, de consistência variável (para untar, cortar ou para ralar) é comprimida e moldada, adquirindo forma característica (FERREIRA, 1986).

Dentre os queijos fabricados no Brasil, o queijo de coalho, em particular, é produzido tradicionalmente na região Nordeste do Brasil com leite cru em especial nos Estados da Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Ceará, e bastante consumido pela população em todas as faixas de renda (NASSU et al., 2003).

Entretanto, segundo a Legislação Federal Brasileira, para a produção de derivados de leite, a matéria-prima precisa ser pasteurizada para garantir a inocuidade do produto final (ARAÚJO et al., 2009).

A pasteurização de leite é um processo que utiliza o calor para eliminação de microrganismos patógenos e que precede a fabricação de queijo. Realiza-se por intermédio de equipamentos (permutadores de placas), que estão freqüentemente associados à acumulação de sólidos à superfície, reduzindo significativamente a eficiência na transferência de calor e aumentando a diminuição de pressão ao longo do equipamento (PEREIRA et al., 2007).

O leite pasteurizado, para ser considerado apto para o consumo e de boa qualidade, deve apresentar características sensoriais normais, teor de gordura original para leite integral, 3% de gordura para leite padronizado, acidez entre 0,14 a 0,18 g de ac. láctico/100 mL, estabilidade ao teste de Alizarol 72% (v.v -1), densidade relativa (15/15 °C, g.mL⁻¹) entre 1,028 a 1,034, extrato seco desengordurado mínimo de 8,4% e índice crioscópico máximo de -0,530 °H (BRASIL, 2002).

Para a fabricação de derivados do leite ocorrem mudanças sensoriais no produto final quando da utilização do leite pasteurizado, daí a importância da utilização de novas tecnologias para manter a qualidade organoléptica do produto tornando-o ainda mais próximo do artesanal (ROCHA, 2004).

O aquecimento ôhmico é considerado uma alternativa promissora de processamento asséptico de alimentos, onde o calor é gerado pela passagem de uma corrente elétrica alternada através do alimento, que em sua maioria contém espécies de eletrólitos, como sais e ácidos (PAIN et al., 1995). Trata-se de uma tecnologia emergente para a pasteurização do leite, pois permite aquecer rapidamente e uniformemente os alimentos, podendo ser considerado um processo HTST (High Temperature Short Time) com vistas a produção de derivados lácteos como o queijo de coalho (PEREIRA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas do queijo de Coalho produzido a partir do leite de vaca no Estado de São Paulo – Brasil, tratado por método convencional de pasteurização e aquecimento ôhmico, além da realização do teste de aceitabilidade.

2. Materiais e métodos

2.1 Leite

Foram coletadas 04 amostras de leite cru e pasteurizados por método tradicional, nos meses de novembro e dezembro de 2009, oriundos de uma mesma Agroindústria localizada no bairro do Braz da cidade de São Paulo - SP – Brasil.

2.2 Pasteurização

Foram utilizadas quatro amostras (A, B, C e D) de 10 litros de leite de vaca pasteurizado em um sistema de permutador de placas (Milde, 40.000l/h), com variação da temperatura de 72° a 75°C durante 15 segundos.

2.3 Aquecimento ôhmico

Foram colhidas quatro amostras de 20 litros de leite cru, destes, 10 litros de cada amostra foram posteriormente submetidos ao aquecimento ôhmico a 300V, de forma contínua utilizando o sistema descrito na Figura 01.

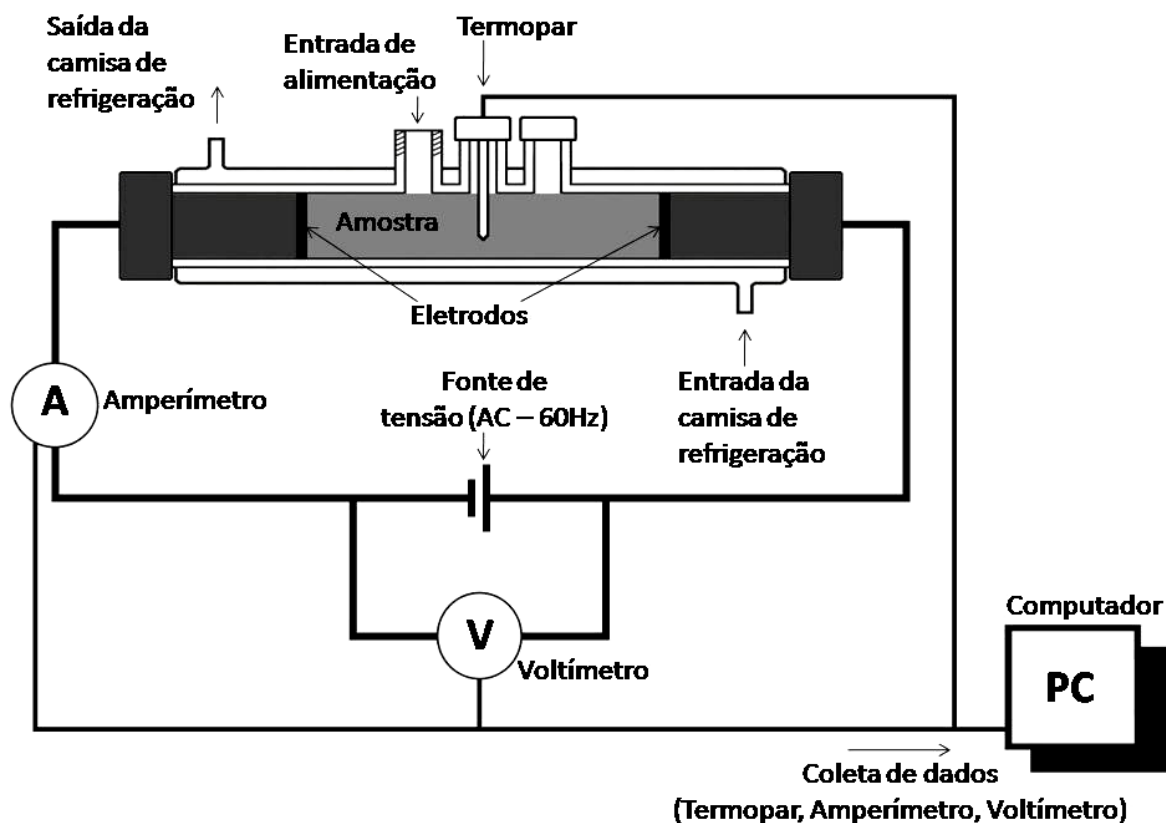


Figura 01- Desenho esquemático do sistema utilizado no processo do aquecimento ôhmico do leite utilizado para a produção do queijo de Coalho.

2.4 Eficiência da pasteurização do leite por métodos Ôhmico e convencional

A eficiência do tratamento do leite foi comprovada através das provas em ambos os tratamentos quanto à atividade das enzimas fosfatase alcalina, peroxidase, e contagem total de microrganismos de acordo com os métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes (BRASIL, 1981).

2.5 Produção do Queijo de Coalho

A fabricação do queijo de coalho seguiu o fluxograma abaixo a partir do leite pasteurizado por métodos tradicional e ôhmico, sendo suprimida a etapa de adição do cloreto de cálcio quando utilizado o leite cru para a fabricação do queijo de coalho.

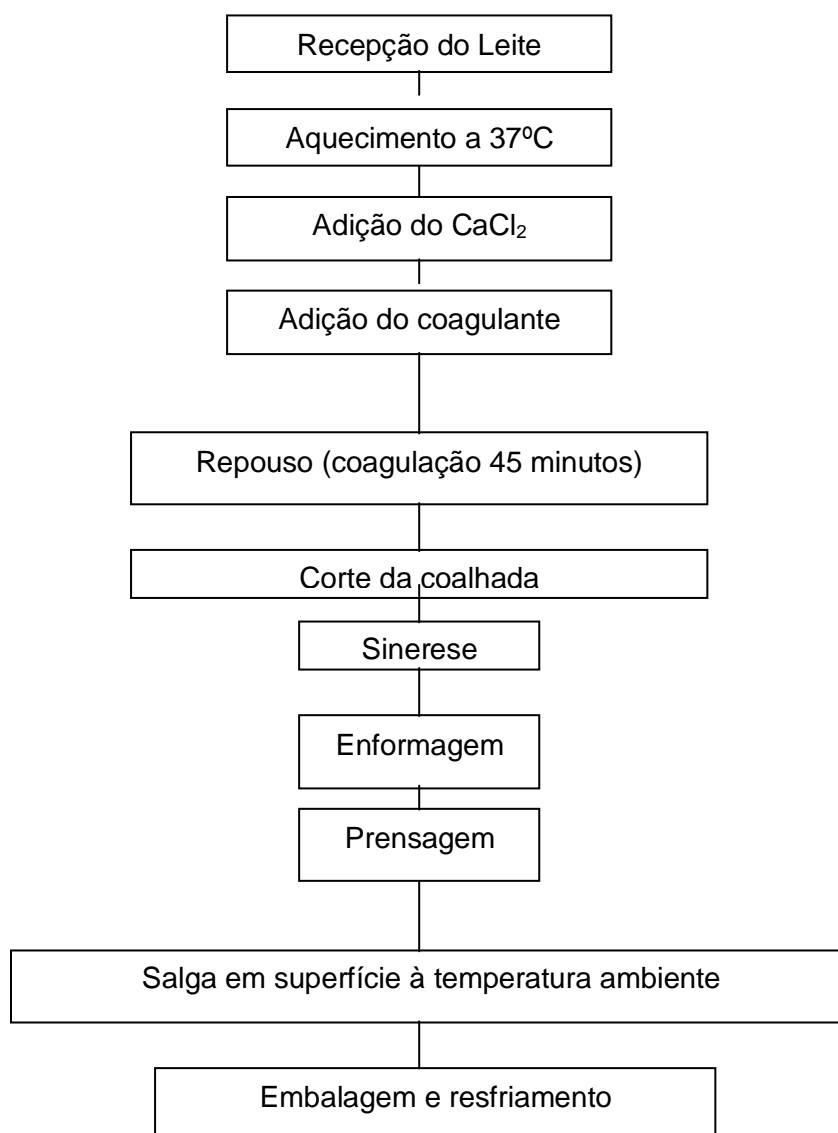


Figura 02. Fluxograma de produção do queijo de Coalho fabricado a partir de leite pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico.

2.6 Avaliação do rendimento do processo

O rendimento do processo foi expresso de acordo com a fórmula abaixo, onde o volume do leite é dividido pela massa obtida na produção (BURITI, 2005).

$$\text{Rendimento} = \left| \frac{\text{volume de leite utilizado na produção (mL)}}{\text{massa de queijo obtida na produção (g)}} \right| \times 100$$

2.7 Determinação da composição centesimal dos queijos

A composição em proteína foi determinada através do método de Kjeldahl segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

As determinações do teor de cinzas foram realizadas segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1985).

O teor de carboidratos foi calculado por diferença para se obter 100% no total de constituintes do leite.

2.8 Análises físico-químicas nos queijos de Coalho obtidos com leite cru e pasteurizado por método convencional e por aquecimento ôhmico

A determinação do teor de umidade foi realizada a 70°C, em estufa a vácuo (Marconi MA030112, Piracicaba, Brasil), utilizando 5 g de amostras trituradas em “Bag Mixer” (Interscience, St. Nom, França). A acidez livre titulável foi determinada segundo o INSTITUTO ADOLFO LUTZ, (1985). O pH foi medido em pH-Analyser Modelo 300M (Analyser Comércio e Indústria Ltda., São Paulo, Brasil), empregando-se um Eletrodo tipo Penetração modelo 2A04-IF (Analyser, São Paulo, Brasil);

2.9 Grau de Sinérese

O grau de sinerese foi determinado de acordo com a fórmula abaixo (BURITI, 2005):

$$\text{sinerese} = \left| \frac{\text{massa de queijo obtida na produção (g)}}{100} \right| \times \left| \text{quantidade de soro liberada em cada embalagem (g)} \right|$$

2.10 Perfil de textura instrumental dos queijos de Coalho

O perfil de textura dos queijos foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras cilíndricas de diâmetro e altura constantes, utilizando placa de alumínio retangular de 10 x 9 cm, em analisador de textura TA-XT2 (Stable Micro System, Haslemere, Inglaterra).

Esta determinação foi realizada após 07 (sete) dias de armazenamento sob 5°C de refrigeração.

Os dados foram coletados através do programa “Texture Expert for Windows” – versão 1.20 (Stable Micro Systems), com a análise dos parâmetros de dureza, coesividade, adesividade, elasticidade, mastigabilidade e gomosidade.

Para a realização das análises, os seguintes parâmetros foram empregados: amostras cilíndricas de queijo com altura de 3 cm e diâmetro de 2 cm, distância e velocidade de compressão de 6 mm e de 2,0 mm/s, respectivamente. As amostras, após serem cortadas, foram mantidas refrigeradas a 5±1°C até o momento do teste.

2.11 Análise sensorial do queijo de coalho

Realizou-se análise sensorial mediante teste de aceitação, com 31 provadores não treinados para os queijos de coalho produzidos com leite cru e

pasteurizado através de método tradicional e por aquecimento ôhmico, após 07 dias de fabricação conservados a 5°C, utilizando escala hedônica (LAWLESS e HEYMANN, 1999).

As amostras foram servidas em temperatura ambiente, sendo quarteadas e padronizadas no formato de cubos de aproximadamente 3 cm³, acondicionadas em copos plásticos descartáveis (50 mL), devidamente codificadas em números aleatórios de três dígitos, acompanhadas de biscoito tipo *Cream Cracker*, copo com água (para remoção de sabor residual) e da ficha de avaliação, apresentadas simultaneamente aos provadores.

A aceitação global foi avaliada, utilizando a escala hedônica estruturada mista de nove pontos (1 – Desgostei muitíssimo; 2 – Desgostei muito; 3 – Desgostei moderadamente; 4 – Desgostei ligeiramente; 5 – Nem gostei/ nem desgostei; 6 – Gostei ligeiramente; 7 – Gostei moderadamente; 8 – Gostei muito; 9–Gostei muitíssimo).

3. Resultados e Discussão

3.1 Pasteurização por aquecimento ôhmico do Leite

De acordo com o descrito na Tabela 01, houve variação tanto na amperagem inicial (leite cru a 5°C) quanto na final (leite cru a 75°C). Isso se deve as características elétricas do alimento (Pettit et al., 2002) e pH do meio (Garcia et al., 2005).

Tabela 01. Acompanhamento da variação elétrica do aquecedor ôhmico (AOH) durante o tratamento do leite de vaca cru integral durante 15 segundos.

	AMOSTRAS			
	A	B	C	D
Parâmetros elétricos do AOH				
<i>Voltagem aplicada (V)</i>	300	300	300	300
<i>Amperagem Média Inicial (A)</i>	0,278	0,2511	0,231	0,2362
<i>Amperagem Média Final (A)</i>	0,701	0,6312	0,668	0,6101

3.2 Percentuais dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do leite cru, pasteurizado e por aquecimento ôhmico

A Tabela 02 mostra os índices físico-químicos e microbiológicos do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Pode-se observar que houve eficiência no tratamento ôhmico, por verificar a ausência da enzima fosfatase alcalina e atividade da peroxidase em todas as amostras, indicando que todas atingiram a temperatura de pasteurização. Resultado idêntico foi encontrado por Zocche e colaboradores (2002), que trabalharam estudando a qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado no Paraná não havendo superaquecimento, pois a peroxidase se mostrou presente em todas as amostras. O superaquecimento altera a composição do leite e parâmetros microbiológicos.

Após o tratamento por aquecimento ôhmico, houve uma diminuição da carga microbiana (tab. 02), que atingiu os parâmetros exigidos pela legislação, máximo de $3,0 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹(BRASIL, 2002).

Tabela 02. Resultados das análises físico-químicas e microbiológicas nas amostras de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico.

Tipo de tratamento	Parâmetros	Amostras			
		A	B	C	D
Cru	Fosfatase alcalina	positiva	positiva	positiva	positiva
	Peroxidase	positiva	positiva	positiva	positiva
	Gordura (%)	5,2	3,6	4,3	4,8
	Acidez (°D)	14	15	16	16
	EST (%)	14,24	12,22	13,17	13,67
	ESD (%)	9,04	8,72	8,87	8,87
	Contagem padrão em placa(UFC/ml)	$6,3 \times 10^4$	$5,5 \times 10^5$	$3,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^5$
Pasteurização	Fosfatase alcalina	negativa	negativa	negativa	negativa
	Peroxidase	positiva	positiva	positiva	positiva
	Gordura (%)	3,5	3,6	3,5	3,5
	Acidez (°D)	13	15	16	16
	EST (%)	11,99	11,83	12,35	12,13
	ESD (%)	8,49	7,23	8,85	8,63
	Contagem padrão em placa(UFC/ml)	<1,0 est.	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$3,9 \times 10^4$
Aquecimento ôhmico	Fosfatase alcalina	negativa	negativa	negativa	negativa
	Peroxidase	positiva	positiva	positiva	positiva
	Gordura (%)	3,8	3,6	4,0	3,8
	Acidez (°D)	14	16	16	16
	EST (%)	12,57	12,21	12,70	12,45
	ESD (%)	8,77	8,51	8,70	8,65
	Contagem padrão em placa(UFC/ml)	$8,4 \times 10^3$	8×10^4	$2,5 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$

EST(extrato seco total); ESD (extrato seco desengordurado).

Houve uma variação dos percentuais de gordura, extrato seco total e desengordurado se compararmos o leite cru original e o submetido ao tratamento por aquecimento ôhmico, se mantendo em conformidade aos padrões estabelecidos pela Instrução Normativa nº 51/2002 (BRASIL, 2002).

3.3 Avaliação do rendimento do processo e determinação da composição centesimal dos queijos produzidos com leite submetidos a diferentes tipos de pasteurização

Neste trabalho, utilizou-se o rendimento denominado econômico, para avaliar os queijos estudados. Existem dois tipos de rendimento: o chamado rendimento econômico, que se refere à quantidade de massa de queijo produzida em relação ao volume de leite utilizado na produção, e o rendimento técnico, que se refere ao aproveitamento dos constituintes do leite que são transferidos ao queijo, ou seja, o aproveitamento de elementos como a gordura, proteínas, totais (ou somente caseína), extrato seco total desengordurado, entre outros (ALEGRO, 2003).

Se compararmos as médias dos rendimentos dos queijos de Coalho produzidos a partir do leite cru (15,34%) e tratado por aquecimento ôhmico (15,51%) não houve diferença no rendimento obtido ($p < 0,05$), havendo diminuição se compararmos ao queijo de Coalho produzido a partir do leite pasteurizado (14,62%) em sistema de placas (Figura 03).

Pode ocorrer a diminuição do rendimento do queijo, bem como alteração em suas propriedades reológicas e sensoriais, em decorrência da proteólise não específica em níveis elevados. A diminuição do rendimento seria provocada pela perda de substâncias nitrogenadas e gordura para o soro. A maior taxa de proteólise seria responsável também por modificações indesejáveis na textura do queijo (LÓPEZ et al., 1997).

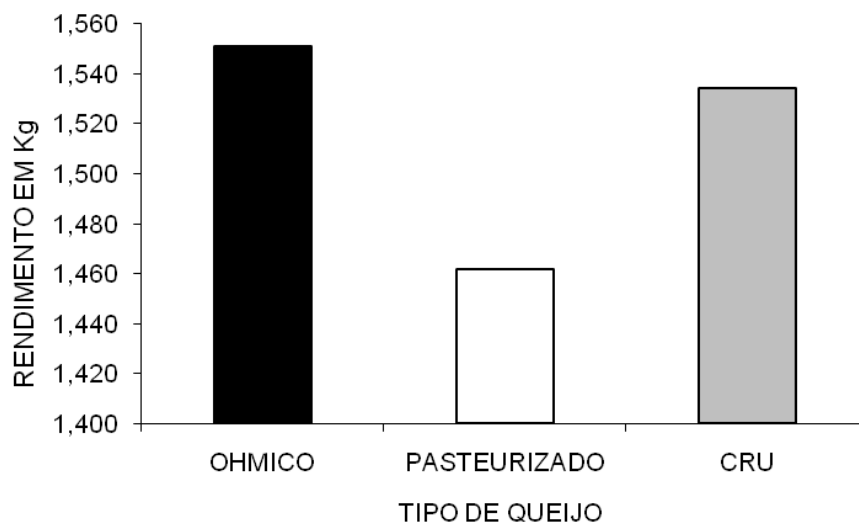


Figura 03. Comparação do rendimento entre os queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico, após a sua fabricação.

Os valores médios para proteína e cinzas obtidos nesse trabalho foram próximos entre o queijo produzido com leite cru e o tratado por aquecimento ôhmico (Tabela 03) estando em ambos os casos, acima da média encontrada para o queijo de coalho produzido a partir do leite pasteurizado em sistema fechado de placas, confirmando a diferença quanto ao rendimento.

Nassu e colaboradores (2003) encontraram valores para proteínas de 20,52% nos queijos de Coalho produzidos a partir de leite pasteurizado no Estado do Rio Grande do Norte, maiores aos encontrados neste estudo tanto para os produzidos a partir de leite pasteurizado (12%), quanto para os produzidos a partir do leite tratado por aquecimento ôhmico (13,6%). Buriti e colaboradores em 2005, trabalhando com queijo minas pasteurizado produzido no Estado de São Paulo, encontraram valores de proteína de 12%, percentual igual ao encontrado nesse trabalho.

Tabela 03. Valores obtidos de proteína e cinza dos queijos produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias das 4 amostras.

Tipo de tratamento da matéria prima	Proteína (%)	Cinzas (%)
Sem tratamento	13,93	2,44
Pasteurizado	12	2,38
Aquecimento ôhmico	13,06	2,33

Os valores de umidade e sinerese dos queijos produzidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico estão apresentados na Tabela 04. Pode-se verificar que os maiores valores de umidade (59,39%) foram observados com o queijo produzido com leite cru, enquanto para sinerese os maiores valores (54%) foram atingidos com o queijo produzido com leite pasteurizado.

Ferreira e Freitas Filho (2008) em estudo do queijo de Coalho produzido a partir de leite cru no Município de Barreiros-PE encontraram índice máximo de umidade (40,62%) inferior aos nossos achados (59,39%).

De acordo com Brasil (2001) o queijo de coalho produzido no presente estudo a partir de leite pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico (Tabela 04) é classificado como queijo de muito alta umidade (superior a 55,05%), o que não corrobora com os dados encontrados por Sena et al., 2000, NASSU et al., 2001 e 2003, que os classificaram como de média umidade obtendo os seguintes valores respectivamente: 48,1% ,41,77% e 43,77%. A diferença encontrada se deve a diferenças na matéria prima utilizada e no seu processamento.

Tabela 04. Valores obtidos de umidade e sinérese dos queijos de Coalho produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias das 4 amostras.

Tipo de tratamento da matéria prima	Umidade (%)	Sinérese (%)
Sem tratamento	59,39	48,5
Pasteurizado	55,10	54
Aquecimento ôhmico	57,60	52

Os valores de acidez livre titulável e pH dos queijos produzidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico estão apresentados na Tabela 05. Pode-se verificar que os maiores valores de acidez (1,44 %) foram observados com o queijo produzido com leite cru, enquanto para pH os maiores valores foram atingidos com o queijo produzido com leite pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico, respectivamente 6,7 e 6,6.

Os resultados encontrados por Ferreira e Freitas Filho, (2008) e Nassu (2003), quando estudaram queijos de Coalho produzidos a partir de leite cru no Estado de Pernambuco e pasteurizado no Rio Grande do Norte, observaram os seguintes valores para acidez titulável, respectivamente: 1,47% e 0,30%, enquanto que os valores obtidos neste trabalho foram inferiores para os queijos produzidos com leite cru e superiores para os queijos produzidos com leite pasteurizado e tratados por aquecimento ôhmico.

Nassu em 2003, obteve pH de 5,59 para queijos produzidos com leite pasteurizado no Rio Grande do Norte, valores estes menores que os obtidos para os queijos produzidos neste estudo. A legislação federal brasileira não estabelece padrões para a quantidade de acidez e pH para queijo de Coalho, enquanto a legislação estadual padroniza estes parâmetros.

Tabela 05. Valores para Acidez Livre titulável e pH dos queijos de Coalho produzidos a partir do leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico. Valores são médias de 4 amostras.

Tipo de tratamento da matéria prima	Acidez livre titulável (%)	pH
Sem tratamento	1,448	6,46
Pasteurizado	0,569	6,73
Aquecimento ôhmico	0,942	6,60

3.4 Determinação do perfil de textura instrumental dos queijos

De acordo Guinard e Mazzucchelli (1996) por muitos anos, a textura esteve esquecida enquanto atributo, já que recebia pequena atenção, quando comparada ao sabor. Posteriormente, a textura passou a ser considerada um dos maiores determinantes da preferência e aceitação de alimentos e bebidas (Buriti et al., 2005).

Os testes instrumentais de textura são geralmente baseados em força de compressão, com a função de simular a mastigação entre os molares. A amostra é submetida a duas “mordidas” ou corridas, que simulam o ato de mastigação. Quando o pistão deforma a amostra, o movimento do suporte é detectado e uma curva de força - compressão é traçada. A partir dessa curva, obtêm-se os parâmetros primários - dureza, coesividade, adesividade, elasticidade e secundários - mastigabilidade e gomosidade, que compõem as características mecânicas dos queijos (FOX et al., 2000).

No presente trabalho, foram analisados os perfis instrumentais de dureza, coesividade, elasticidade, adesividade, mastigabilidade e gomosidade

dos queijos produzidos com leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico e estão apresentados na Tabela 06.

Quanto aos perfis de gomosidade e mastigabilidade houve uma diferença considerável entre os índices encontrados para os queijos de Coalho produzidos a partir do leite tratado por aquecimento ôhmico e o pasteurizado por método tradicional em sistema de placas, estando muito próximos aos encontrados para o queijo de Coalho produzido a partir do leite cru (Figura 04).

Tabela 06. Perfil de textura instrumental dos queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e tratado por aquecimento ôhmico, no produto final (matéria úmida) após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Valores são médias das 4 amostras

Parâmetros	Tipo de tratamento		
	Sem tratamento	Pasteurização	Aquecimento ôhmico
Adesividade	- 0,022	-0,021	-0,019
Elasticidade	0,829	0,837	0,829
Coesividade	0,751	0,755	0,754
Gomosidade	3,522	4,514	3,150
Mastigabilidade	2,925	3,785	2,617
Dureza	0,518	0,543	0,516

A Normativa nº30 do MAPA, estabelece que o queijo de Coalho produzido a partir de leite pasteurizado sensorialmente deverá apresentar consistência semi-dura, elástica; textura macia, compacta ou aberta com olhaduras mecânicas pequenas (BRASIL, 2001).

De acordo com Fox e colaboradores (2000) a adesividade é definida como a força requerida para remover o queijo que adere à boca, geralmente ao palato, durante o processo normal de mastigação os valores de adesividade dos queijos produzidos neste trabalho não diferiram entre si ($p < 0,05$), entretanto o queijo de Coalho produzido com o leite tratado por aquecimento ôhmico apresentou o maior valor (média -0,022) (Tabela 06),.

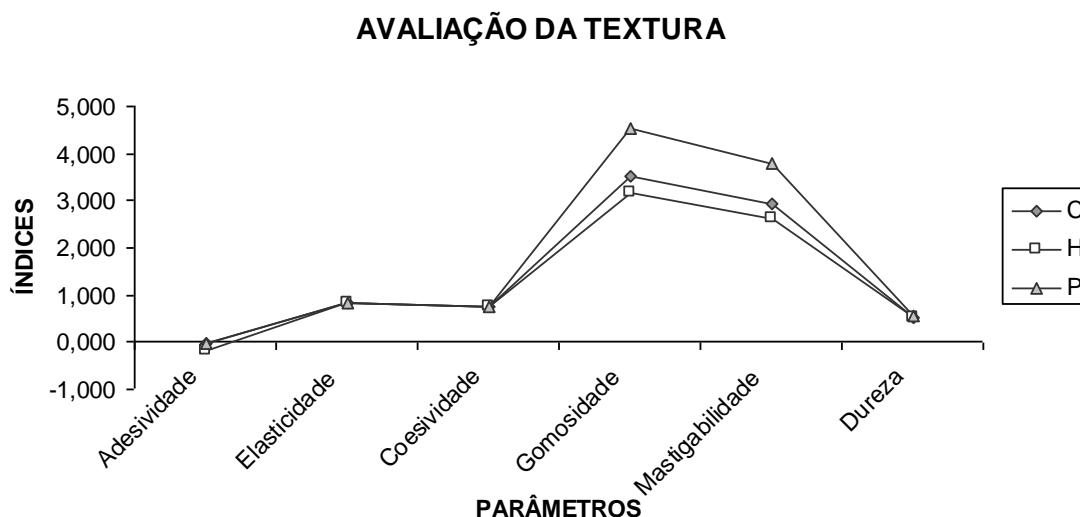


Figura 04. Comparação entre os parâmetros de textura dos queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru (C), pasteurizado (P) e tratado por aquecimento ôhmico (H), no produto final (matéria úmida) - após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Segundo Fox e colaboradores (2000), elasticidade refere-se ao grau de recuperação da deformação causada a um pedaço de queijo depois que a força de deformação é removida. Quanto a este parâmetro, os valores obtidos para todos os queijos produzidos neste trabalho não foi detectada diferenças entre eles.

A coesividade é definida como a extensão que um queijo pode ser deformado até que haja ruptura da sua estrutura (FOX et al., 2000). Todos os queijos estudados apresentaram comportamento semelhante, quanto ao parâmetro coesividade (Figura 04).

A gomosidade foi definida por Fox e colaboradores (2000), como a energia necessária para desintegrar um pedaço de queijo, tornando-o apto a ser deglutido. Os resultados de gomosidade para os queijos de coalho obtidos a partir de leite cru e tratado por aquecimento ôhmico apresentaram médias similares, 3,522 e 3,150, respectivamente (Tabela 06).

O tempo ou o número de mastigações necessárias para o queijo estar pronto para ser deglutido foi definido por Fox e colaboradores (2000) como mastigabilidade, e é um parâmetro de textura derivado da dureza.

Durante o armazenamento refrigerado, houve um aumento significativo na dureza para os queijos de Coalho produzidos com leite pasteurizado ($p < 0,05$),

acompanhado do aumento significativo da sinerese, bem como para a mastigabilidade. Os queijos de coalho produzidos a partir de leite cru e tratado por aquecimento ôhmico apresentaram valores de dureza muito semelhantes (Figura 04).

Rocha e colaboradores (2006) verificaram que os valores de dureza instrumental variaram entre os queijos minas de diferentes marcas comerciais analisados. Esta variação pode estar relacionada, segundo os autores, a fatores como o nível de contaminação, visto que os queijos com menores níveis de contaminação apresentaram valores de dureza instrumental semelhantes. O que corrobora com os dados obtidos neste estudo.

3.5 Teste de Aceitabilidade

Os resultados obtidos da análise sensorial baseada na aceitabilidade estão apresentados na Figura 05. Os maiores percentuais de aceitabilidade foram obtidos para os queijos de Coalho produzidos com leite cru e tratados por aquecimento ôhmico.

Os resultados demonstram que os queijos de coalho obtidos a partir do leite tratado por aquecimento ôhmico apresentaram valores de aceitabilidade próximos aos queijos de coalho obtidos a partir de leite cru.

De acordo com Araújo e colaboradores (2009), todos os queijos de coalho artesanais feitos com leite cru de diferentes produtores da região do Seridó (Currais Novos/RN) obtiveram boa pontuação na avaliação, enquanto que os queijos de Coalho feitos com leite pasteurizado da mesma região, não alcançaram o índice mínimo de aceitação, o que corrobora com os dados apresentados neste trabalho.

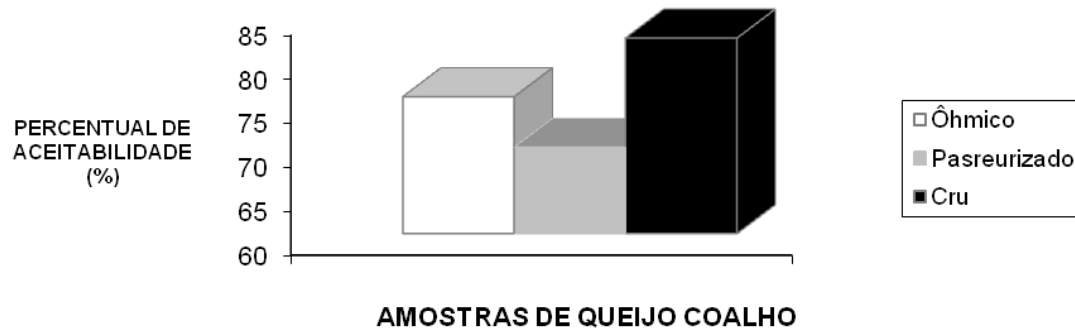


Figura 05. Percentual de aceitabilidade dos queijos de Coalho obtidos a partir de leite cru, pasteurizado e por aquecimento ôhmico, após 7 dias de armazenamento a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$.

4. Conclusão

As características físico-químicas do leite não foram alteradas pelo tratamento por aquecimento ôhmico e sua eficiência foi comprovada por testes enzimáticos e microbiológicos. O rendimento da produção do queijo de coalho obtido por aquecimento ôhmico foi similar ao produzido com leite cru. Houve uma maior aceitabilidade do queijo de coalho produzido a partir de leite tratado por aquecimento ôhmico, que o produzido a partir de leite pasteurizado.

A análise sensorial dos queijos produzidos com leite tratado por aquecimento ôhmico, demonstrou benefícios sensoriais ao produto, uma vez que as suas características foram mantidas, apresentando boa aceitabilidade.

Estes resultados indicam que o tratamento por aquecimento ôhmico poderá ser uma alternativa enquanto processo de pasteurização de leite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES pela bolsa sanduíche concedida para Universidade do Minho e Universidade de São Paulo (PROCAD-NF 2007), aos órgãos de fomento tecnológico – FACEPE; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA, a todos os produtores de queijo de Coalho que disponibilizaram as suas amostras.

5. Referências Bibliográficas

ALEGRO, J.H.A. Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura. São Paulo, 84p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo 2003.

ARAÚJO, M.C. G. de; SANTOS, R. A. dos; SILVA, C.P. A.e; CIRILO, R. de L.; CIRILO, R. de L.; MARQUES, R. C.P. Análise Sensorial E Teste De Aceitação Do Queijo De Coalho Produzido Com Leite Cru E Pasteurizado Na Cidade De Currais Novos. *Holos*, p. 25, v. 4 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos Técnicos de identidade e qualidade de manteiga da terra ou manteiga de garrafa, queijo de coalho e queijo de manteiga. Instrução Normativa nº30, de 26/06/ 2001. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 jul.2001, p.13-15.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Laboratório Nacional de Referência Animal. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes. II – Métodos Físicos e Químicos. Brasília, 1981. 217p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro de 2002. Seção 1

Brito, J. R. F., Sandra Maria Pinto, Maria Aparecida V. P. Brito. Boas Práticas de Produção de Leite Bovino na Agricultura Familiar. In: Felon do Nascimento Neto, Org. Recomendações básicas para a aplicação das boas

práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 195-205 2006.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; SAAD, S.M.I. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal*, v.15, p.1279-1288, 2005.

FERREIRA, A. B. de H. Novo Dicionário Aurélio. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1838 p. 1986.

FERREIRA, W. L.; FREITAS FILHO, J.R. DE Avaliação Da Qualidade Físico - Químicos Do Queijo Coalho Comercializado No Município De Barreiros-Pe, *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR - Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil
ISSN: 1981-3686 / v. 02, n. 01: p. 127-133, 2008.

FARKYE, N. Y. Cheese technology. *International Journal of Dairy Technology*, v.57, n.2/3, p.91-98, 2004.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P.L.H. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen p. 587, 2000.

GARCIA D, GÓMEZ N, RASO J, PAGÁN R Bacterial Resistance after Pulsed Electric Fields Depending on the Treatment Medium pH. *Innovative food science & emerging technologies* 6:388-395 2005.

GUINARD, J.X.; MAZZUCHELLI, R. The sensory perception of texture and mouthfeel. *Trends in Food Science & Technology*, v.7, p.213-219, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: IAL, p.207-208; p.232-234; p.237-238. 1985.

LAWLESS, H.T.; HEYMANN, H. *Sensory evaluation of foods: principles and practices*. Gaithersburg: Aspen, 827p. 1999.

LEHNINGER, A.L. Biochemistry. 2.ed. New York: Worth Publishers, 1104p. 1981.

LÓPEZ, M. B.; JORDÁN, M.J.; HELLIN, P.; CASTILLO, M.; LAENCINA, J. Kinetics of k-casein hidrolisis by different rennets and coagulant enzymes in Murciano-Granadina goat milk. Milchwissenschaft, v. 52, n.7, p. 370 – 373. 1997.

NASSU, R.T.; ARAÚJO, R. dos S.; GUEDES, C.G M; ROCHA, R.G. de A.; Diagnóstico das condições de processamento e Caracterização Físico química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte. Fortaleza, CE Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa Agroindústria Tropical, n..11, p.24, 2003. Disponível em: <
http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/BolPesq/bd_11.pdf> Acesso em:30 out. 2007.

NASSU, R.T; ARAÚJO, R. dos SANTOS; BORGES, M.DE FÁTIMA, LIMA, J.R; MACEDO, B.A; LIMA, M.H.P; BASTOS, M. do SOCORRO R. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Fortaleza: Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa Agroindústria Tropical, n.1, p.28, 2001. Disponível em: <
http://www.cnpat.embrapa.br/publica/pub/BolPesq/p&d_1.pdf> Acesso em:26 out. 2007.

OLIVEIRA, A.J. de; CARUSO, J.G.B. Leite: obtenção e qualidade do produto fluido e derivados. Piracicaba: FEALQ, 80p. 1996.

PAIN, J.P.; DORNIER, M.; BAUDEZ, P. Le chauffage ohmique; Innovation industrielle pour le traitement UHT des produits particulaires, Ind. Alim. et Agric., v.112, n.6, p. 405-450, 1995.

PEREIRA, R.N.A, MARTINS, R.C., TEIXEIRA, J.A. E VICENTE, A.A. Caracterização Do Perfil De Ácidos Gordos Livres Durante A Pasteurização Convencional E Ôhmica, LEITE I+D+T p. 6 -8, 2007.

PETTIT B, RITZ M, FEDERIGHI M Nouveaux Treatments Physiques de Conservation des Aliments: Revue Bibliographique. Revue de Médecine Vétérinaire v.53 p. 547-556. 2002.

ROCHA, G. L. Influência do tratamento térmico no valor nutricional do leite fluido. Goiás, 53p. (Trabalho de Conclusão de Curso em Engenharia de Alimentos) - Universidade Católica de Goiás 2004.

ROCHA, J.S; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.58, n.2, p.263-272, 2006.

SENA, M.J.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; MORAIS, C.F.A.; CORREA, E.S.; SOUZA, M.R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. Higiene Alimentar, São Paulo, v.14, n.74, p.41-44, jul. 2000.

SOARES, J. B; CASEMIRO, A. R. S; ALBUQUERQUE, L. M. B. Métodos de coloração In: Microbiologia básica, 2. ed. Fortaleza: Editora da UFC, p.175 1991.

ZOCHE, F.; BESSOT, L. S.; VARCELLOS, V. C.; PARANHOS, J. K.; ROSA, S. T. M.; RAYMUNDO, N. K. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. Archives of Veterinary Science, Curitiba, v.7, n.2, p.59-67, 2002.