

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

FACULDADE DE NUTRIÇÃO

MESTRADO EM NUTRIÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO TECNOLÓGICA DE
CULTURAS LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE
COALHO DO SERTÃO ALAGOANO**

ALÉCIA CRISTINNE SANTOS RAMOS

MACEIÓ

2009

ALÉCIA CRISTINNE SANTOS RAMOS

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO TECNOLÓGICA DE
CULTURAS LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE
COALHO DO SERTÃO ALAGOANO**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Nutrição da Universidade Federal de
Alagoas como requisito à obtenção do título
de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Delgado da Silva

Co-Orientadora: Dr^ª. Izildinha Moreno

MACEIÓ

2009

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- R175c Ramos, Alécia Cristinne Santos.
Caracterização e seleção tecnológica de culturas lácticas isoladas de queijo de colho do sertão alagoano / Alécia Cristinne Santos Ramos, 2009.
109 f. : il.
- Orientadora: Maria Cristina Delgado da Silva.
Co-Orientadora: Izildinha Moreno.
Dissertação (mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Alagoas.
Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Maceió, 2009.
- Bibliografia: f. 61-73.
Inclui apêndices e anexos.
1. Queijo de coalho – Características . 2. Queijo de coalho – Análise.
3. Bactérias lácticas. 4. Propriedades tecnológicas. I. Título.

CDU: 612.39



MESTRADO EM NUTRIÇÃO
FACULDADE DE NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS



Campus A. C. Simões
BR 104, Km 14, Tabuleiro dos Martins
Maceió-AL 57072-970
Fone/ fax: 81 3214-1160

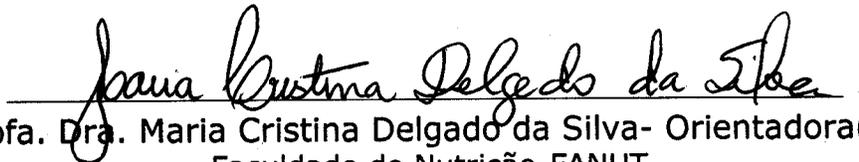
PARECER DA BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE
DISSERTAÇÃO

**"CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO TECNOLÓGICA DE CULTURAS
LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO DO SERTÃO
ALAGOANO"**

por

Alécia Cristinne Santos Ramos

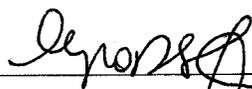
A Banca Examinadora, reunida aos 30 dias do mês de abril do ano de
2009, considera a(o) candidata (o) **APROVADA(O)**.



Profa. Dra. Maria Cristina Delgado da Silva- Orientadora(o)
Faculdade de Nutrição-FANUT
Universidade Federal de Alagoas



Profa. Dra. Edma Carvalho de Miranda
Instituto de Química e Biotecnologia- IQB
Universidade Federal de Alagoas



Prof. Dr. Cyro Rego Cabral Junior
Faculdade de Nutrição-FANUT
Universidade Federal de Alagoas

Dedico a toda minha família, especialmente aos meus pais José Ramos e Margarida, aos meus queridos irmãos Alan e Alex e ao meu amado esposo Ricardo.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus por fazer-Se sempre presente em minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Delgado da Silva, por toda orientação e confiança dedicadas a minha formação.

À Dr^a. Izildinha Moreno, pela orientação, disponibilidade e apoio prestado à distância.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Nutrição (FANUT/UFAL) pela acolhida e incentivo.

Aos estagiários e técnico do Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos (FANUT/ UFAL), em especial: Juliana Moraes, Mariana de Alencar, Leilany Viana e aos “Cantídios” pelo companheirismo e colaboração.

Aos funcionários, bolsistas e estagiários do Laboratório de Microbiologia do TECNOLAT (ITAL) pela ajuda e acolhida no início deste trabalho.

À Prof^a. Cristina Normande, coordenadora do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos (FANUT/ UFAL), e em especial à técnica Sineide pela amizade e incentivo durante todo este tempo.

À Prof^a. Dr^a Giselda Macena, coordenadora do Laboratório de Bromatologia (FANUT/ UFAL), e aos colegas Sarah Gurgel, Genildo Cavalcante e Caterine Cabral pela colaboração nas análises físico-químicas.

À Prof.^a Dr^a. Sônia Salgueiro, coordenadora do Laboratório de Enzimologia e Biotecnologia Vegetal e ao Prof^o. João Batista, coordenador do Laboratório de Análise Instrumental do CEFET, pela disponibilidade no uso de alguns equipamentos.

Aos parceiros do SENAI-AL e SEBRAE-AL, Israel Moura e Sérgio Godoy, pela contribuição na realização deste trabalho.

Às colegas Morganna Moraes, Thaísa Porto e Glaucevane Guedes pela amizade e convivência.

À CAPES, FINEP, SEBRAE e UFAL pelo apoio financeiro recebido.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, não citados aqui, mas igualmente merecedores da minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
RESUMO	x
ABSTRACT.....	xi
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos.....	15
1.1.1 Geral.....	15
1.1.2 Específicos.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Queijo de Coalho.....	18
2.1.1 Produção de queijo de coalho.....	18
2.1.2 Características sensoriais do queijo de coalho.....	19
2.1.3 Características físico-químicas do queijo de coalho.....	20
2.1.4 Características microbiológicas do queijo de coalho.....	21
2.2 Bactérias Lácticas (BAL).....	22
2.2.1 <i>Leuconostoc</i>	22
2.2.2 <i>Pediococcus</i>	23
2.2.3 <i>Streptococcus</i>	23
2.2.4 <i>Enterococcus</i>	24
2.2.5 <i>Lactococcus</i>	25
2.2.6 <i>Lactobacillus</i>	25
2.3 Fermentos Lácticos.....	26
2.4 Propriedades Tecnológicas das BAL em queijos.....	27
3 METODOLOGIA	30

3.1 Material.....	30
3.1.1 Amostras.....	30
3.2 Métodos.....	30
3.2.1 Definição do fluxograma de processamento do queijo de coalho.....	30
3.2.2 Análise sensorial de amostras de queijo de coalho.....	30
3.2.3 Análise físico-química dos queijos.....	30
3.2.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos queijos.....	31
3.2.5 Isolamento e caracterização de BAL.....	31
3.2.5.1 Meios e condições de isolamento.....	31
3.2.5.2 Isolamento, purificação e caracterização das Bactérias ácido lácticas.....	32
3.2.5.3 Características de crescimento das BAL em leite tornassolado.....	33
3.2.6 Determinação das propriedades funcionais tecnológicas das BAL.....	33
3.2.6.1 Aceitação organoléptica em leite.....	33
3.2.6.2 Capacidade de produção de ácido láctico.....	34
3.2.6.3 Capacidade aromatizante.....	34
3.2.6.4 Atividade proteolítica.....	34
3.2.7 Identificação taxonômica das BAL selecionadas.....	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Fluxograma de processamento do queijo de coalho.....	37
4.2 Avaliação sensorial dos queijos.....	41
4.3 Avaliação das características físico-química dos queijos.....	42
4.4 Avaliação da qualidade microbiológica dos queijos.....	44
4.5 Isolamento e caracterização de BAL.....	46
4.6 Avaliação das propriedades funcionais tecnológicas das BAL.....	49

4.6.1 Avaliação da capacidade de acidificação.....	50
4.6.2 Capacidade aromatizante.....	52
4.6.3 Atividade proteolítica.....	53
4.7 Identificação taxonômica das BAL selecionadas.....	54
6 CONCLUSÕES.....	58
7 REFERÊNCIAS.....	61
APÊNDICE A: Artigo submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz.....	74
ANEXOS.....	96

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Fluxograma de processamento do queijo de coalho A.....	40
Figura 2 Fluxograma de processamento do queijo de coalho B.....	41
Figura 3 Fluxograma de processamento do queijo de coalho C.....	42
Figura 4 Reação de atividade de catalase pelos microorganismos isolados de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	49
Figura 5 Distribuição do crescimento de microorganismos em diversos meios de cultura na forma de cocos, bastonetes e cocobacilos isolados de amostras de queijo de coalho do sertão alagoano.....	49
Figura 6 Características de crescimento das BAL em leite tornassolado.....	51
Figura 7 Defeitos organolépticos das BAL isoladas.....	52
Figura 8 Capacidade de acidificação das culturas lácticas selecionadas.....	53
Figura 9 Atividade proteolítica das culturas lácticas isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	55

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Meios de cultura e condições de cultivo utilizados para os diferentes grupos de BAL.....	34
Tabela 2	Características sensoriais das amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	43
Tabela 3	Caracterização físico-química de amostras de queijo de coalho do sertão alagoano.....	45
Tabela 4	Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	47
Tabela 5	Distribuição do número de colônias de BAL isoladas em cada meio de crescimento específico.....	48
Tabela 6	Avaliação da produção de ácido pelos microrganismos isolados de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	50
Tabela 7	Capacidade aromatizante de culturas lácticas isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	54
Tabela 8	Classificação dos gêneros de BAL isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	56
Tabela 9	Espécies de BAL isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.....	57

RESUMO

Buscando caracterizar físico-química, sensorial e microbiologicamente queijo de coalho preparado com leite cru, desenvolveu-se este projeto. Visitas periódicas foram realizadas a três laticínios do sertão de Alagoas para elaboração do fluxograma de processamento do queijo de coalho e coleta de amostras para realização de análises microbiológicas (coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.), físico-químicas (pH, acidez, gordura, cinzas, umidade, proteína total e cloretos) e sensoriais (aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor). Foram também isoladas e identificadas as bactérias lácticas (BAL) predominantes nestes queijos e realizou-se estudo de suas propriedades tecnológicas com finalidade de desenvolver um fermento láctico adequado para preservar as características originais do queijo de coalho do sertão quando o mesmo é produzido com leite pasteurizado. As análises sensoriais indicaram discrepâncias entre as amostras dos três laticínios, provavelmente devido aos distintos procedimentos de processamento observados principalmente em relação às etapas de salga, pasteurização e aquecimento da massa. As análises físico-químicas indicaram serem os queijos de média a alta umidade e com baixo teor de gordura. As condições higiênico-sanitárias do produto final quanto à contagem de *E. coli*, e *S. aureus* foram consideradas insatisfatórias, apesar da ausência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*. Dentre as BAL (109) isoladas foram encontrados os gêneros *Streptococcus* (41,9%), *Enterococcus* (16,3%), *Pediococcus* (9,3%), *Leuconostoc* (9,3%), *Lactobacillus* (4,6%) e *Lactococcus* (2,3%). As principais espécies identificadas foram *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*. Dentre esses isolados 24 mostraram-se produtores rápidos de ácido indicando seu potencial de uso. Outras propriedades de relevância tecnológica observadas foram capacidade proteolítica e de produção de aroma. Contudo, estudos adicionais serão necessários para avaliar o desempenho dessas culturas no processamento do queijo de coalho a partir de leite pasteurizado. Além disso deve-se avaliar a virulência das cepas de *Streptococcus* isoladas.

Palavras chaves: queijo de coalho, características, bactérias lácticas, propriedades tecnológicas

ABSTRACT

This project was developed aiming to establish physico-chemical, sensory and microbiological characteristics of “coalho” cheese (rennet coagulated cheese) prepared from raw Milk. Three processing plants were periodically visited in order to establish the coalho cheese preparation flow chart, and to collect samples for microbiological (coliforms at 35°C, thermotolerant coliforms, yeasts and molds, generic *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.), physico-chemical (pH, titratable acidity, fat, ashes, moisture, total protein and chlorides) and sensorial (appearance, odor, texture / mouth feel and taste). Lactic bacteria (LAB) were also isolated and identified as the major component of the microflora. Their technological properties were evaluated in order to develop an starter culture that could be used to produce “coalho” cheese from pasteurized milk, with the same characteristics of the raw milk cheese. Sensorial analysis indicated that the cheeses from the three plants had different characteristics, probably derived from the different processing conditions observed during salting, pasteurization and heating of the curd. Physico-chemical analysis showed that the cheeses have medium to high moisture content and low fat. The sanitary and hygienic conditions of the final product were considered inadequate considering *E. coli* and *S. aureus* countings, although no *Salmonella* or *L. monocytogenes* were detected. Amongst the LAB isolates (109) the following genera could be identified: *Streptococcus* (41,9%), *Enterococcus* (16,3%), *Pediococcus* (9,3%), *Leuconostoc* (9,3%), *Lactobacillus* (4,6%) and *Lactococcus* (2,3%). The major species identified were: *Streptococcus vestibularis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus bovis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*. Twenty four of the LAB isolates were fast acid producers indicating their usefulness as starter culture. Other technologically relevant properties observed among these 24 strains were proteolytic capacity and flavor producing. Properties. However, additional studies are necessary to evaluate these cultures in the processing of the “coalho” chesse from pasteurized milk, as well as the virulence of the *Streptococcus* strains isolated.

Key words: coalho cheese, characteristics, lactic acid bacteria, technological properties.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Entende-se por queijo de coalho, aquele 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 (BRASIL, 2001a). Este produto é classificado como queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida que apresenta um teor de gordura nos sólidos totais, variando de 35% a 60% (BRASIL, 2001a). Em geral, apresenta textura compacta e macia, sabor brando e ligeiramente ácido, podendo ser salgado, e odor ligeiramente ácido. De acordo com a legislação brasileira em vigor o queijo de coalho deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 2001a).

O queijo de coalho, típico da região nordeste, faz parte da cultura, modo de vida e hábitos de consumo do nordestino, além de ser um alimento de elevado valor nutricional. Sua produção no sertão de Alagoas é baseada em técnicas tradicionais, cuja matéria-prima utilizada pela maioria das empresas ainda é o leite cru. Relatos na literatura têm demonstrado elevada contagem de coliformes termotolerantes nos queijos produzidos a partir de leite cru (ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2000; ALMEIDA FILHO & NADER FILHO, 2002). A contagem de coliformes termotolerantes acima do limite máximo recomendado pela legislação brasileira (BRASIL, 2001b), evidencia ineficiência ou ausência de controle de matéria-prima, do processo de fabricação e/ou do produto acabado, fatores estes, que podem possibilitar a multiplicação microbiana de patógenos, tais como, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* (SOUSA, 1999; RAPINI *et al.*, 2004).

Atualmente, o queijo de coalho, vem sendo produzido em várias regiões do Brasil em escala industrial, com emprego do processo de pasteurização do leite devido à exigência estabelecida pela legislação brasileira (BRASIL, 2001a), com o intuito de garantir a segurança para os consumidores. No entanto, quando o leite é pasteurizado, além da destruição de microrganismos patogênicos e deterioradores indesejáveis, há também destruição de Bactérias Lácticas (BAL), as quais são benéficas, advindas do leite cru e responsáveis pelas características organolépticas do queijo de coalho, peculiares da região e tão apreciadas pelos consumidores (CAVALCANTE *et al.*, 2007; CARVALHO, 2007).

As BAL constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, podendo ser cocos ou bacilos não esporulados, não reduzem nitrato a nitrito, mas utilizam o lactato presente no substrato. São capazes de

produzir substâncias com atividade antimicrobianas como, ácidos orgânicos (ácido láctico), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil e substâncias antimicrobianas de natureza protéica, denominadas bacteriocinas. Alguns destes compostos como o acetaldeído e o diacetil participam da formação de “flavour” em queijos (PRADO *et al.*, 2000; DABÉS, SANTOS & PEREIRA, 2001; GUEDES NETO *et al.*, 2005). A ação antagonista de espécies de BAL contra microrganismos indesejáveis em alimentos têm sido descrita por vários pesquisadores (VAUGHAN *et al.*, 1994; BREASHERS & DURRE, 1999; URAZ *et al.*, 2001; ALEXANDRE *et al.*, 2002; CARIDI, 2003; GUEDES NETO *et al.*, 2005). Esses trabalhos mostraram que muitas BAL isoladas de leite e queijos apresentaram poder de inibição frente a deteriorantes como *Pseudomonas* spp. e bactérias do grupo coliformes e frente a patógenos como *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., demonstrando a importância do uso desses microrganismos para a conservação de alimentos no controle de patógenos. Essa aplicação pode ser importante para o queijo de coalho.

As BAL dividem-se em homofermentativas, que produzem a partir de carboidratos fermentáveis, prioritariamente ácido láctico (90-95%) como produto final (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, enterococos, lactococos, pediococos, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* e outras espécies de lactobacilos do grupo I) e em heterofermentativas (*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus fermentarum* e outros lactobacilos do grupo III), segundo Gasson & de Vos (1994) *apud* Brolazo (2003). No metabolismo heterofermentativo, devido a diferentes sistemas enzimáticos, são formadas quantidades equimolares de ácido láctico, CO₂ e de etanol. Esta diferença de produtos finais proporciona características de sabor e aroma variados, dependendo da combinação de microrganismos utilizados na composição da cultura láctica (BROLAZO, 2003).

As variadas culturas lácticas ou fermentos normalmente utilizados na produção de queijos, são combinações de várias espécies de culturas microbiologicamente puras selecionadas, que exercem papel importante para recuperação de características desejáveis, aos quais foram reduzidas com a pasteurização do leite. Tais culturas contribuem de forma significativa na formação de características peculiares de sabor, aroma e às alterações de textura das diferentes variedades de queijos. Para isto, é necessário que as espécies envolvidas entrem em ação simbiótica e se manifestem estáveis às condições definidas para produzir um efeito gerador de aromas devido a seu metabolismo, promovendo um resultado tecnológico muito superior no que se refere à padronização da qualidade do

produto resultante, além de apresentar capacidade acidificante que facilite a ação do coalho e auxilie na expulsão do soro (MASSAGUER, 2005; CAVALCANTE *et al.*, 2007).

As culturas lácticas selecionadas é um ingrediente de grande importância no processo de fabricação da maioria dos queijos, já que, garante as características típicas de aroma e sabor. No entanto, à medida que as culturas lácticas comerciais são mais difundidas entre os produtores, devido à eficiência e superioridade das linhagens que as compõem, diminuem, por outro lado, a diversidade bacteriana, e dificultam o isolamento de linhagens típicas brasileiras, uma vez que a maior parte dessas é desenvolvida por empresas multinacionais (CAVALCANTE *et al.*, 2003).

Portanto, para preservar as características sensoriais do produto artesanal nos queijos elaborados com leite pasteurizado, conforme recomendação da legislação brasileira, tem se buscado selecionar linhagens que sejam parte da microbiota presente no leite cru e nos queijos artesanais característico de cada região, de modo a obter fermentos lácticos apropriados para adição ao leite tratado termicamente. Além disso, a avaliação de parâmetros sensoriais, físico-químicos e microbiológicos das condições higiênico-sanitárias do queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas, proporcionará maior subsídio para uma padronização no processamento deste produto, atendendo assim, a legislação em vigor.

Assim, a presente pesquisa teve como objetivo isolar e identificar a microbiota láctica presente em amostras de queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas, bem como avaliar as características físico-químicas, sensoriais e a flora contaminante, com o intuito de selecionar culturas lácticas que possam servir para produção de um fermento láctico.

1.1 Objetivos

1.1.1 Geral

Caracterizar o queijo de coalho proveniente do sertão alagoano quanto aos aspectos sensoriais, físico-químicos e microbiológicos e identificar as bactérias lácticas naturalmente presentes e responsáveis pelo “flavour” deste produto.

1.1.2 Específicos

- Acompanhar o processamento do queijo de coalho a fim de elaborar o fluxograma de processo;
-

- Avaliar parâmetros sensoriais do queijo de coalho, através do encaminhamento de amostras para o ITAL para realização de análise;
 - Determinar parâmetros físico-químicos de amostras de queijo de coalho, através das análises de pH, acidez, gordura, cinzas, umidade, proteína total e cloretos;
 - Avaliar a qualidade microbiológica do queijo de coalho, através da contagem de microrganismos indicadores (coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Escherichia coli*) e pesquisa de microrganismos patogênicos (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.).
 - Isolar e identificar a microbiota láctica presente em amostras de queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas;
 - Determinar as propriedades tecnológicas das BAL isoladas de amostras de queijo de coalho, quanto à capacidade de acidificação, capacidade aromatizante e atividade proteolítica.
 - Identificar em nível de espécie somente as linhagens de interesse industrial, e armazenar para posterior produção de um fermento láctico que será utilizado na fabricação do queijo de coalho do sertão alagoano.
-

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Queijo de Coalho

2.1.1. Produção de queijo de coalho

A produção de queijos no mundo é um dos exemplos clássicos de conservação de alimentos, provavelmente antecedendo a era cristã. A conservação dos mais importantes constituintes do leite, como a gordura e as proteínas, na forma de queijos, explora dois princípios clássicos de conservação de alimentos, isto é, a fermentação láctica, a redução da atividade de água e a adição de sal (FOX, 1993). Mesmo com o aumento da produção de alguns alimentos fermentados em escala industrial, ainda existem regiões no mundo onde estes produtos são fabricados de maneira artesanal, incluindo vários queijos, carnes e vegetais fermentados. Na realidade, muitos destes produtos têm se destacado no mercado por conservar propriedades sensoriais características que, de acordo com muitos consumidores, desaparecem nos produtos quando industrializados (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

Dentre os queijos de fabricação artesanal no Brasil, o queijo de coalho se destaca como um dos principais e, seu consumo já faz parte do hábito alimentar da população, tanto no nordeste como, mais recentemente, nos grandes centros da região sudeste, destacando-se Rio de Janeiro e São Paulo, onde o produto tem excelente mercado (MANDACARU, 2009). Na região nordeste a produção de queijo de coalho artesanal representa uma atividade de importância social, econômica e cultural. Apesar de não apresentar sofisticação tecnológica, esta produção inclui-se entre os poucos empreendimentos adequados para modificar perfil social e econômico de pequenos municípios da região. Além disso, desempenha importante papel no desenvolvimento da agricultura familiar em pequenos municípios localizados nas bacias leiteiras (CERRI, 2002; BORGES, 2006).

Atualmente, o estado de Alagoas dispõe de duas bacias leiteiras significativas. A primeira e maior delas, também conhecida como “Bacia Leiteira Tradicional”, situa-se na região do Agreste (compreende 5 municípios) e no Sertão Alagoano (compreende outros 13 municípios), tendo os municípios de Batalha e Major Izidoro como os maiores expoentes. A principal atividade do Arranjo Produtivo Local referente ao seguimento laticínios (APL-laticínio) é a produção de queijo de coalho, atingindo no ano de 2007 um total de 1985 toneladas (SEBRAE/AL, 2008). O queijo de coalho produzido no sertão alagoano apresenta forte tradição e reconhecida procedência e por isso os produtores locais

e as entidades governamentais e empresariais têm buscado o resgate da qualidade, identidade e higiene dos queijos do sertão alagoano (SEBRAE/AL, 2008).

Embora o processo de fabricação do queijo de coalho seja regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, observa-se uma grande variação nos atributos sensoriais desse produto devido, principalmente, ao tipo de leite utilizado, cru ou pasteurizado, quando o produto é obtido por processo artesanal ou industrial respectivamente (CABEZAS *et al.*, 2007). Contudo, outros fatores intrínsecos de cada laticínio podem exercer influência sobre o produto.

A tecnologia de elaboração do queijo de coalho artesanal apresenta algumas etapas que a distinguem de outros queijos, principalmente a utilização do leite cru, o cozimento da massa, a adição do coalho e a salga diretamente na massa. O leite cru é fonte de bactérias lácticas peculiares da região, que são responsáveis pelas características organolépticas do queijo de coalho, no entanto, apresenta características intrínsecas também favoráveis ao crescimento de microrganismos patogênicos e deterioradores. O coalho é adicionado a fim de proporcionar a coagulação do leite e expulsão do soro, e esta etapa geralmente acontece em torno de 40 minutos. O emprego de coalho natural de estômagos de bezerro não é recomendado, em virtude do alto grau de contaminação microbiana que pode ocasionar (BRASIL, 2001a; CARVALHO, 2007). A salga tem três importantes funções: atuar como conservante, contribuir diretamente no sabor e ser fonte de sódio. Por ser o maior determinante da atividade de água no queijo, exerce controle sobre o crescimento microbiano e a atividade enzimática, e na formação simultânea de aroma e sabor desejáveis (PEREZ, 2005).

2.1.2. Características sensoriais do queijo de coalho

Com relação aos atributos sensoriais do queijo de coalho, os consumidores têm buscado sabores originais que é proporcionado pela microbiota natural do leite cru. No entanto, quando o leite é pasteurizado grande parte desta microbiota é removida, influenciando negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo (GRAPPIN & BEUVIER, 1997).

Mendes *et al.* (2002) compararam sensorialmente o queijo de coalho produzido de acordo com as seguintes técnicas: A – leite cru, B - leite pasteurizado e o C - leite pasteurizado e adição de fermento láctico. Nenhum desses queijos foi considerado ideal quanto aos atributos avaliados, sendo o queijo A o de melhor aparência, o queijo B o de melhor aroma e o queijo C o de melhor textura. Segundo Peláez & Requena (2005), as

diferenças entre a qualidade sensorial de amostras de queijos fabricados com leite pasteurizado e com leite cru dependem, principalmente, da complexidade e da diversidade da microbiota láctica presente.

Perez (2005) visando comparar a aceitação entre amostras de queijos de coalho comercializados no município de Campinas-SP demonstrou que as marcas avaliadas apresentaram perfis sensoriais distintos e suas características foram marcantes e bem definidas. A marca C foi a preferida pelos provadores que declararam ser o sabor, a característica mais apreciada nesse queijo.

2.1.3. Características físico-químicas do queijo de coalho

Embora exista uma legislação brasileira (BRASIL, 2001a) que define alguns parâmetros para fabricação do queijo de coalho, ainda existe hoje, uma falta de padronização no processo, acarretando diferenças nas características físico-químicas deste produto, refletindo assim a falta de identidade e qualidade do mesmo. As diferenças na sua composição físico-química podem ser verificadas em várias regiões do nordeste, como no estado do Ceará, onde o queijo é classificado como extra gordo ou duplo creme, gordo e de média umidade com teor médio de proteína em 25,02%, acidez 0,26% e pH 5,2 (FEITOSA, 1984; SEBRAE/CE, 1998; NASSU *et al.*, 2001a).

No Recife, o queijo é classificado em semi gordo e de alta umidade (SENA *et al.*, 2000), em Sergipe, como de alta umidade a muita alta umidade, com índice de acidez variando de 0,3% a 1,71% (SENA *et al.*, 2000) e no estado da Paraíba, em gordo, de média umidade a alta umidade, com teor de proteína variável de 21,78% a 23,47% (AQUINO, 1983). Também foram encontrados teores variáveis de sal de 1,5% a 3,0%, valores médios de cloretos 1,91%, acidez 0,44%, e pH na faixa de 4,9 a 6,37 para as diversas regiões do Ceará (BRANCO, 2002; NASSU *et al.*, 2001a; SEBRAE/CE, 1998). Segundo a legislação em vigor (BRASIL, 2001a) o queijo de coalho deve apresentar teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35 a 60% e umidade entre 36 a 54,9% (média a alta umidade).

A falta de uniformidade nas características físico-químicas do queijo de coalho se deve a composição do leite, o qual não sofre nenhum tipo de padronização, e as variáveis do processo que são as principais fontes de variação com importância tecnológica que exercem influência na qualidade e nas características do produto final (PEREZ, 2005).

2.1.4. Características microbiológicas do queijo de coalho

Os queijos são considerados um veículo freqüente de bactérias patogênicas de origem alimentar e, em especial os queijos produzidos de forma artesanal. Dentre estes, destaca-se o queijo de coalho por ser comumente elaborado a partir de leite cru e sob condições insatisfatórias de higiene em pequenas queijarias que não adotam de forma plena as Boas Práticas de Fabricação (BPF). Portanto, a contaminação microbiológica deste produto assume destacada relevância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (BORGES, 2006).

Vários estudos têm classificado o queijo de coalho, principalmente o artesanal, como impróprio para o consumo humano devido ao elevado nível de contaminação por bactérias patogênicas, dentre estas, a *E. coli* enteropatogênica, *L. monocytogenes*, *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005).

Contagens elevadas de microrganismos do grupo coliformes termotolerantes são frequentemente observadas no queijo de coalho, sugerindo que foram produzidos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. A presença desses coliformes no alimento é indicativa de que houve contato direto com material fecal (DUARTE *et al.*, 2005). *S. aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar pela enterotoxina estafilocócica (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Salmonella spp., bactéria responsável por casos de toxinfecções alimentares, é comumente detectada em amostras de queijo de coalho (FLORENTINO & MARTINS, 1999; BORGES *et al.*, 2003). Esta bactéria é encontrada no trato intestinal de animais domésticos e silvestres, especialmente aves e répteis e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água (FEITOSA *et al.*, 2003)

A presença de *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo de coalho evidenciada por vários pesquisadores (BORGES *et al.*, 2003; BRANCO *et al.*, 2003; BRUNO *et al.*, 2005) deve servir de alerta às autoridades sanitárias quanto ao perigo do consumo deste produto por parte da população. O risco aumenta quando o produto é consumido sem prévio tratamento térmico (BRANCO *et al.*, 2003).

As vias de contaminação do queijo de coalho, podem ser o leite, o manipulador e o ambiente de processamento. No leite cru, a principal fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico. Estudos realizados nas indústrias revelaram que a contaminação cruzada após a pasteurização do leite é a fonte mais relevante de contaminação dos queijos por patógenos (BORGES, 2006).

2.2 Bactérias Lácticas (BAL)

Bactérias Lácticas (BAL) é um termo genérico utilizado para definição de um grupo de bactérias que apresentam diferentes características morfológicas, metabólicas, fisiológicas e taxonômicas e que apresentam como principal função metabólica a produção de ácido láctico a partir de carboidratos (MORENO, 2003).

A natureza acidúrica ou acidófila dessas bactérias, e sua notável habilidade de adaptação a condições adversas, conjuntamente com a elevada taxa de ácido láctico produzido (o que permite inibir o crescimento de outros organismos) têm facilitado o seu estabelecimento em ambientes diferentes (MASSAGUER, 2005).

As bactérias incluídas nesse grupo, com raras exceções, são descritas como cocos ou bastonetes Gram-positivos, não esporogênicas, anaeróbias facultativas, catalase e oxidase negativas. O metabolismo de carboidratos pode ser homofermentativo, resultando primordialmente em ácido láctico, ou heterofermentativo, resultando em ácido láctico e outros produtos como etanol, acetato, dióxido de carbono (CO₂) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). As exigências nutricionais são complexas, a maioria é dependente da presença de vitaminas, carboidratos e outros fatores para o crescimento. Podem ser divididas em mesofílicas (crescem a uma temperatura ótima de 30°C) e em termofílicas (crescem a uma temperatura ótima de 42°C) (FOX *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001).

Originalmente, esse grupo incluía quatro gêneros de grande importância em alimentos: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. Gradativamente, esses gêneros foram subdivididos em novos gêneros; *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, e *Weissella*. De todos esses gêneros, cinco são comumente encontrados em queijos: *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus* (BERESFORD *et al.*, 2001; EUZÉBY, 2006).

2.2.1. *Leuconostoc*

A morfologia do gênero *Leuconostoc* é de cocos, imóveis, frequentemente lenticulares, ocorrendo em pares ou pequenas cadeias. Requerem aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos, ácidos nucleicos, vitaminas e carboidratos fermentáveis para seu crescimento. São heterofermentativos e crescem melhor em meios neutros ou levemente ácidos, sendo menos acidúricos que os *Lactobacillus*. A temperatura ótima de crescimento

é de 20 a 30°C e a maioria das linhagens é aerotolerante, porém preferem condições microaerófilas para crescer (SILVA *et al.*, 2001).

É importante na tecnologia de alimentos, devido à produção de diacetil e outras substâncias aromáticas, além de algumas espécies também resistir à elevadas concentrações salinas. As espécies, *L. destrictum* e *L. citrovorum* utilizam o ácido cítrico presente no leite e produzem substâncias de sabor agradáveis como, o diacetil, o acetil-metil-carbinol e 2-3 butileno glicol. Apesar de sua pequena habilidade acidificante e proteolítica, o *Leuconostoc* spp. é usado nos produtos lácteos, junto aos lactococos, como microrganismo aromatizante (HASSAN & FRANK, 2001; MASSAGUER, 2005).

2.2.2. *Pediococcus*

Os *Pediococcus* são bactérias homofermentativos e catalase negativos, porém algumas linhagens apresentam atividade de pseudocatalase, em meios contendo baixa concentração de carboidratos. São cocos gram positivos imóveis, que se dividem em ângulos retos e em dois planos, formando tétrades. As células nunca são alongadas, nem formam cadeias e também podem ocorrer em pares, especialmente entre o início e o meio da fase logarítmica de crescimento. A temperatura ótima de crescimento varia entre 25 e 40°C, onde algumas espécies podem crescer a 45°C, mas não crescem a 10°C, com raras exceções. Crescem bem em salmouras a 5,5% de NaCl (HOLT *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 2001; MASSAGUER, 2005)

Esse gênero é importante na tecnologia de alimentos, tanto no sentido positivo como negativo. Linhagens da espécie *P. pentosaceus* são usadas para produção de salsichas e de silagem, mas também podem ser encontradas como deteriorantes em conservas de pepinos e massas de cereais. Além disso, os pediococos são comumente encontrados como parte da microbiota de queijos maturados, sendo considerados como “Non Starter Lactic Acid Bacteria” (NSLAB), ou seja, bactérias lácticas que não são adicionadas como fermento láctico (SALMINEN *et al.*, 2004).

2.2.3. *Streptococcus*

Os estreptococos são anaeróbios facultativos, algumas espécies exigem CO₂ para seu crescimento e algumas são anaeróbias estritas. São esféricos ou ovóides, imóveis, geralmente arranjados aos pares ou cadeias. O metabolismo de carboidratos é homofermentativo, com requerimentos nutricionais complexos e variáveis. A temperatura

ótima de crescimento é 37°C e a máxima e a mínima variam entre as espécies (EUZÉBY, 2006).

O *Streptococcus thermophilus* é a única espécie desse gênero utilizada nas fermentações lácticas (HASSAN & FRANK, 2001). É homofermentativo, termófilo com temperatura ótima de crescimento entre 40 e 45°C, sobrevive à temperatura de pasteurização, apresentam algumas linhagens produtoras de goma, é pouco proteolítico, produtor rápido de ácido e não possui atividade lipolítica. Não cresce em 40% de bile, em 4% de NaCl ou em pH 9,6. São microrganismos altamente adaptados ao leite e amplamente utilizados como fermentos lácticos na produção de iogurtes, leites fermentados e queijos (ZACARCHENCO, 2003).

As espécies *S. uberis* e *S. dysgalactie* são responsáveis pela mastite em gado leiteiro, contaminando o leite cru. *S. bovis* e *S. equinus* são habitantes normais do trato intestinal de bovinos e eqüinos, respectivamente, sendo considerados “estreptococos fecais” e apresentando várias características em comum com os *Enterococcus* (LAFARGE *et al.*, 2004).

2.2.4. Enterococcus

Essas bactérias, antes um subgrupo do gênero *Streptococcus* passaram a pertencer ao gênero *Enterococcus* a partir de 1984. Apresentam-se como cocos Gram positivos, homofermentativos, catalase negativos e anaeróbios facultativos. São mesófilos e a temperatura ótima de crescimento é de 37°C, mas a maioria consegue crescer a 10 e a 45°C. Crescem bem na presença de 6,5% de NaCl e em pH 9,6 (GIRAFFA, 2002).

Bactérias do gênero *Enterococcus* são encontradas predominantemente no trato gastrintestinal de humanos e animais, no entanto, a utilização dos enterococos como indicadores de contaminação fecal dos alimentos apresenta algumas restrições, pois também são encontrados em ambientes diferentes do trato intestinal. Apesar das limitações do uso desses microrganismos como indicadores de contaminação fecal, sua presença em números elevados em alimentos indica práticas sanitárias inadequadas, ou exposição do alimento a condições que permitiram a multiplicação de microrganismos indesejáveis. Em alimentos fermentados por bactérias do gênero *Enterococcus*, o número elevado desses microrganismos não tem o mesmo significado (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

Atualmente 20 espécies pertencem a este gênero, das quais o *E. faecium* e o *E. faecalis* são as mais encontradas. Os enterococos podem estar presentes no solo, na superfície das águas, em plantas e vegetais. Podem crescer em alimentos crus e

multiplicar-se durante as fermentações, devido a sua habilidade em sobreviver em condições extremas de pH, temperatura e salinidade. Essas bactérias podem resistir a condições normais de processamento de alimentos (SANTOS, 2003).

De fato, os enterococos ocorrem em um grande número de vegetais e alimentos, especialmente de origem animal como queijos e linguiças. Em carnes processadas, esses microrganismos não são desejáveis, pois causam deterioração precoce, enquanto que, para a indústria de alimentos derivados do leite, eles têm utilização prática, possuindo um papel importante no desenvolvimento de características organolépticas durante a maturação de diversos queijos. São encontrados em muitos queijos artesanais produzidos no sul da Europa, tanto a partir de leite cru quanto de leite pasteurizado (VESSONI, 2004).

Em queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, os enterococos advêm da matéria-prima ou do ambiente, variando conforme as condições de higiene do processo e da época do ano. Já a presença desses microrganismos em queijos produzidos a partir de leite pasteurizado deve-se provavelmente a sua resistência a altas temperaturas (CARVALHO, 2007).

2.2.5. *Lactococcus*

Os representantes desse gênero são cocos Gram-positivos homofermentativos, que apresentam temperatura ótima de crescimento de 30°C e dependendo da espécie a 10°C e a 45°C. Formam células esféricas ou ovais, arranjadas em pares ou pequenas cadeias (SILVA *et al.*, 2001).

São originados predominantemente de leite e produtos lácteos, onde ocorrem naturalmente. Das 5 espécies conhecidas, *Lactococcus lactis* é a mais importante na fermentação dos produtos lácteos e amplamente utilizada como constituinte do fermento láctico no processamento de queijos. As subespécies *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. lactis* subsp. *lactis* são responsáveis pela acidificação do leite nas etapas iniciais do processamento, sendo que a primeira confere melhor sabor ao queijo. A variante *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* também é capaz de converter o citrato constituinte do leite em diacetil, um composto responsável pelo sabor e aroma típicos de manteiga nos queijos (FOX *et al.*, 2000; HASSAN & FRANK, 2001).

2.2.6. *Lactobacillus*

É um dos gêneros originais de bactérias lácticas e várias espécies de importância em alimentos foram reclassificadas nos novos gêneros de *Carnobacterium* e *Weissella*. São

bactérias extremamente úteis, muitas delas reconhecidas como probióticas. Podem ser utilizadas como coadjuvantes de fabricação de inúmeros produtos fermentados. Em geral, são caracterizadas como bastonetes Gram-positivos, que podem ser homo ou heterofermentativos, em pares ou em cadeias, que crescem em pH 4,5 e não em pH 9,0. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas e sua temperatura ótima de crescimento é de 30-40°C, onde o crescimento a 15-45°C varia entre as espécies. Algumas espécies como *L. bulgaricus* são bastonetes longos; outros, como *L. casei* e *L. plantarum* são bastonetes curtos (SILVA *et al.*, 2001; ZACARCHENCO, 2003).

Os lactobacilos podem ser divididos em 3 grupos baseados no produto final de sua fermentação. O primeiro grupo é formado por lactobacilos termofílicos homofermentativos que utilizam apenas hexoses como fonte de carbono para produzir ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*). No segundo grupo estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos facultativos, que utilizam outras fontes de carbono além de hexoses, sendo capazes de produzir ácidos orgânicos, CO₂, álcool e H₂O₂ (inclui os *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacilos plantarum*). Já no terceiro grupo, estão os lactobacilos mesofílicos heterofermentativos que utilizam obrigatoriamente, hexoses e pentoses como fonte de carbono (inclui os *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*) (FOX *et al.*, 2000; HASSAN & FRANK, 2001).

2.3. Fermentos Lácticos

O processamento de queijos e de outros produtos lácticos fermentados nasceu da necessidade de se preservar o leite cru, utilizando, para tal fim, a acidificação biológica natural e empírica. Com o desenvolvimento da indústria queijeira e com a prática da pasteurização introduzida com a finalidade de melhorar a qualidade higiênico-sanitária do leite, tornou-se necessário à adição de bactérias lácticas cuidadosamente selecionadas com o objetivo de repor essa microbiota natural, destruída durante o tratamento térmico (MORENO, 2003).

Essa microbiota adicionada é conhecida como cultura iniciadora (“starter”) ou “fermento láctico”, que tem como principal função a acidificação durante as etapas iniciais de processamento dos queijos, bem como contribuir para o processo de maturação (AYAD *et al.*, 2001; BERESFORD *et al.*, 2001). É responsável, pela uniformidade das características organolépticas e propriedades estruturais e, portanto, pela qualidade constante dos queijos (AYAD *et al.*, 2001). Além das culturas adicionadas outras bactérias

láticas podem fazer parte da microbiota dos queijos, estas são originadas principalmente do ambiente de fabricação, as “Non-Starter Lactic Acid Bacteria” (NSLAB), que contribuem no desenvolvimento das propriedades sensoriais dos queijos (MORENO, 2003)

Os fermentos mesofílicos incluem bactérias dos gêneros *Lactococcus* e *Leuconostoc* e os fermentos termofílicos consistem de uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus* spp. O fermento mesofílico ainda pode ser agrupado segundo a sua composição: “B” ou “L”, “BD” ou “LD”, “D” e “O”. O primeiro tipo contém microrganismos produtores de ácido (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*) e uma espécie de *Leuconostoc* produtora de aroma e pouca quantidade de gás. Já o segundo tipo contém dois microrganismos produtores de aroma (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*) além dos produtores de ácido que estão no primeiro tipo (FERREIRA, 2001; HASSAN & FRANK, 2001).

As culturas do tipo “D” contém apenas o *L. diacetylactis* como produtor de aroma e os mesmos produtores de ácido que estão nos outros tipos (HASSAN & FRANK, 2001). E o do tipo “O” só contém microrganismos produtores de ácido, sendo muito usado nos queijos em que se deseja uma textura compacta e sem olhaduras, a exemplo do queijo Minas Frescal (FERREIRA, 2001).

2.4. Propriedades Tecnológicas das BAL em Queijos

As BAL são conhecidas por sua capacidade acidificante e podem ser empregadas no direcionamento da fermentação, “in situ”, de lactose a L-lactato, sendo considerada uma fase primordial para a obtenção de queijo de boa qualidade. Dois aspectos importantes devem ser considerados na conversão de ácido láctico: a velocidade e o seu nível máximo de produção, uma vez que existem diferenças importantes entre os gêneros, espécies e mesmo entre as linhagens de BAL (MORENO, 2003).

Ballesteros *et al.* (2006) verificaram que os *Lactococcus* foram os microrganismos com maior capacidade de acidificação dentre os isolados do queijo Manchego. Medina *et al.* (2001) isolaram uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* capaz de baixar o pH do leite para 3,95 após 16h de incubação.

Em contrapartida, Durlu-Ozkaya *et al.* (2001) observaram que 4% das 17 culturas de *Lactobacillus* isoladas não alteraram o pH do leite após 6 horas. Após 24 horas, 82,3% destas culturas baixaram o pH para a faixa de 5,0-5,5. Os lactobacilos toleram bem ambientes ácidos, no entanto estes microrganismos iniciam seu crescimento após as culturas iniciadoras baixarem o pH do meio por volta 5,5 (HASSAN & FRANK, 2001).

A capacidade aromatizante das BAL é um processo resultante do metabolismo do citrato, e dentre os principais compostos formados, quantitativamente, a acetoína é o mais importante, porém o diacetil proporciona aroma de manteiga a certas variedades de queijos (FOX *et al.*, 2000).

Embora o leite apresente concentrações relativamente baixas de citrato, ao redor de 8-9mM, o seu metabolismo é importante em queijos fabricados com fermentos mesofílicos. O citrato é rapidamente metabolizado por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, com a formação de diacetil e acetoína (COGAN, 1995).

Badis *et al.* (2004) ao compararem a atividade aromática produzida por *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e outros microrganismos detectaram uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como a maior produtora de diacetil, dentre as culturas avaliadas.

Sabe-se que a proteólise também é responsável pelo desenvolvimento das características organolépticas da maioria dos tipos de queijos, principalmente aqueles que sofrem maturação. Um dos papéis mais importantes da proteólise está na produção de compostos voláteis, que contribuem para o sabor e aroma dos queijos (McSWEENEY, 2004).

Estudos de seleção de BAL e outros microrganismos quanto a sua capacidade em degradar proteínas e aminoácidos a compostos aromáticos revelaram que esta característica é extremamente dependente da linhagem (RIJNEN *et al.*, 1999; YVON & RJINEN, 2001).

Carvalho (2007) ao avaliar cepas de *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* detectou que os microrganismos do gênero *Lactobacillus* proporcionaram maior variabilidade e extensão na hidrólise da caseína e os *Streptococcus* foram os isolados menos proteolíticos.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 MATERIAL

3.1.1. Amostras

Foram analisadas amostras de queijo de coalho, provenientes de três laticínios do sertão de Alagoas, designadas por A, B e C. Somente uma dessas empresas (A) fez uso do processo de pasteurização do leite para produzir o queijo de coalho, enquanto as outras duas (B e C) produziram a partir de leite “*in natura*”. Peças de queijos recém-processadas e provenientes de um mesmo lote foram coletadas “*in situ*” e transportadas em caixas de isopor com gelo para o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas. As amostras foram mantidas em temperatura de refrigeração ($4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) até a realização das análises microbiológicas e a temperatura de -17°C até o início das análises físico-químicas (APHA, 2004; BRASIL, 2005).

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Definição do fluxograma de processamento do queijo de coalho

A elaboração do fluxograma de processamento do queijo de coalho artesanal foi realizada a partir de visitas “*in locu*” nos três laticínios, onde foram avaliadas e observadas as diversas etapas do processo que diferencia os queijos A, B e C.

3.2.2. Análise sensorial de amostras de queijo de coalho

As amostras de queijo de coalho recém coletadas foram encaminhadas em isopor com gelo para o Núcleo de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística – LAFISE, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP, para realização de exame das características sensoriais.

As propriedades sensoriais, tais como aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor dos queijos provenientes dos três laticínios foram identificados pela análise descritiva por uma equipe de 5 julgadores do LAFISE/ITAL, selecionados quanto à acuidade sensorial, de acordo com a norma ISO-8586-1 (1993).

3.2.3. Análise físico-química dos queijos

Os queijos foram submetidos às seguintes análises físico-químicas: acidez, gordura, cinzas, umidade, proteínas e cloretos segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo

Lutz (BRASIL, 2005) e pH segundo método de Pereira *et al.* (2001). As análises foram realizadas em duplicata (Anexo 1).

3.2.4. Avaliação da qualidade microbiológica dos queijos

Os queijos foram submetidos às seguintes análises microbiológicas: contagem de microrganismos indicadores de qualidade higiênico-sanitárias (determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes, contagem total de bolores e leveduras e pesquisa de *Escherichia coli*) segundo metodologia preconizada por APHA (2004) e pesquisa de microrganismos patogênicos: contagem de *Staphylococcus aureus* (APHA 2004), pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo metodologia preconizada pela Instrução Normativa SDA 62 (BRASIL, 2003) e *Salmonella* sp, segundo método BAM/FDA (ANDREWS & HAMMACK, 2006) (Anexo 2).

3.2.5. Isolamento e caracterização de BAL

3.2.5.1. Meios e condições de isolamento

Para o isolamento de BAL foram utilizados os meios de cultivo considerados os mais seletivos conforme apresentados na Tabela 1 (APHA, 2004).

Com exceção do ágar KF, a composição dos meios foi modificada pela adição 1,0 mL/L de solução alcoólica de púrpura de bromocresol 1,6%, de 0,2mL/L de azida de sódio 4% (APHA, 2004) e de 10mL/L de Tween 80 (APHA, 2004). A púrpura de bromocresol foi adicionada para facilitar a detecção de colônias produtoras de ácido láctico (cor amarela) (APHA, 2004). A azida de sódio foi utilizada para inibição de enterobactérias e bactérias aerófilas (APHA, 2004) e o Tween 80 para dissociar os agregados de células (APHA, 2004).

O método de inoculação em profundidade foi utilizado para inoculação das diluições (10^{-1} a 10^{-5}) das amostras nos meios. A incubação foi realizada por 24 horas nas condições estabelecidas na Tabela 1.

Tabela 1- Meios de cultura e condições de cultivo utilizados para os diferentes grupos de BAL

Gêneros	Meio de cultura	Temperatura de incubação	Temperatura ótima de crescimento
<i>Streptococcus</i>	Ágar M 17	37°C	37°C
<i>Lactococcus</i>	Ágar M 17	30°C	30°C
<i>Lactobacillus</i>	Ágar Rogosa acidificado a pH 5,4 com ác. acético glacial	37°C	30-40°C
<i>Leuconostoc</i>	Ágar APT	30°C	20-30°C
<i>Pediococcus</i>	Ágar MRS acrescido a 4% de NaCl	37°C	25-40°C
<i>Enterococcus</i>	Ágar KF	37°C	37°C

3.2.5.2. Isolamento, purificação e caracterização das BAL

Após incubação, foi adicionado 3,0 mL de caldo LAPTg nas placas de inoculação que apresentaram colônias mais isoladas de cada meio de cultura. Triturou-se o ágar juntamente com o caldo adicionado, para homogeneização e transferiu o caldo resultante para tubo estéril. Em seguida, transferiu-se em forma de estria uma alçada do homogeneizado de células para placas contendo ágar LAPTg. Incubou-se as placas invertidas por 16-18 horas nas condições estabelecidas na Tabela 1. Cerca de cinco colônias foram isoladas a partir de cada placa, seguida de sua transferência para caldo LAPTg e incubadas por 16-18 horas em temperatura descrita na Tabela 1.

Os microrganismos ativos foram purificados por meio de sub-cultivo em Ágar LAPTg e em condições ótimas de crescimento (16-18 horas em temperatura descrita na Tabela 1). Após este período, foram selecionadas 1 a 2 colônias isoladas a partir de cada placa, seguida de sua transferência para caldo LAPTg e incubadas por 16-18 horas em temperatura descrita na Tabela 1.

Para definição desses microrganismos como BAL, foram analisadas inicialmente quanto à reação de atividade de catalase (HARRIGAN & McCANCE, 1998). Aqueles que apresentaram reação negativa neste teste foram reativados em caldo LAPTg por 16 horas em temperatura descrita no quadro acima para realização da coloração de Gram e morfologia celular. Microrganismos em forma de cocos e de bastonetes Gram-positivos e

catalase negativa foram selecionados e preparados para manutenção a -20°C em caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS), acrescido com 15% (v/v) de glicerol (APHA, 2004).

3.2.5.3. Características de crescimento das BAL em leite tornassolado

Todas as BAL isoladas foram inoculadas (2% do inóculo) em 10 mL de leite tornassolado (*Litmus milk*) e incubadas à temperatura ótima de crescimento durante 14 dias, no máximo. Foram avaliadas as reações desenvolvidas nesse meio, envolvendo lactose (1), caseína (2) ou outros constituintes (3) (HARRIGAN & McCANCE, 1998). Os tubos foram avaliados diariamente e as reações ocorridas foram anotadas:

- 1 (a) Produção de ácido pela alteração da cor do meio de tornassol para rosa;
- 1 (b) Coagulação do leite pela produção de ácido (coagulação ácida);
- 1(c) Redução do tornassol e perda de coloração, que pode ocorrer antes ou após outras alterações;
- 1 (d) Produção de gás indicada pela formação de bolhas, que são visíveis somente após a coagulação do leite;
- 2 (a) A cor do meio permanece azul, devido à coagulação do leite pela atividade de enzimas proteolíticas (coágulo doce);
- 2 (b) Peptonização do meio com resultado da hidrólise da caseína pela atividade de enzimas proteolíticas causam clareamento e perda de opacidade do meio. A proteólise pode também resultar em uma reação alcalina pela produção de amônia;
- 3 A utilização do citrato no meio resulta na produção de uma reação alcalina, mostrada pela alteração da cor tornassol do meio para um azul intenso.

3.2.6. Determinação das propriedades funcionais tecnológicas das BAL

3.2.6.1. Aceitação organoléptica em leite

Esta análise foi realizada para eliminar, por meio de uma avaliação da acuidade sensorial, as linhagens responsáveis pelo desenvolvimento de fortes defeitos organolépticos no leite. Foram avaliados os defeitos de textura (aspecto granuloso, filante,

etc.) e odor ou sabor desagradável (amargo, sabor de frutas, metálico, etc.) em coágulos obtidos das BAL isoladas inoculadas (2% do inóculo) em leite pasteurizado (Anexo 3).

3.2.6.2. Capacidade de produção de ácido láctico

A capacidade e a tolerância de BAL à acidificação é um critério de seleção importante. A sensibilidade varia dependendo da linhagem. Uma quantidade de 1% das culturas ativadas foi inoculada em 100mL de leite desengordurado a 10%, onde alíquotas de 25 mL foram retiradas depois da inoculação e a intervalos regulares (6 horas e 24 horas) de incubação (temperatura adequada conforme Tabela 1), para registro das alterações do pH do leite (Anexo 3).

3.2.6.3 Capacidade aromatizante

Foi avaliada pela determinação de diacetil (2-3 butanodiona) e acetoína (3-hidroxi-2-butanona) por colorimetria em cultivos obtidos em condições ótimas de crescimento da linhagem (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1991) (Anexo 3).

3.2.6.4 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica das BAL isoladas foi determinada pela medida α -aminonitrogênio (aminoácidos livres totais) na fração do nitrogênio solúvel em água dos coágulos após reação com TNBS (ácido trinitrobenzeno sulfônico, Sigma-Aldrich), segundo metodologia descrita por Adler-Nissen (1979) e Clegg *et al.* (1982). A fração de nitrogênio solúvel em água foi preparada de acordo com o método descrito por Kuchroo & Fox (1982) (Anexo 3).

3.2.7. Identificação taxonômica das BAL selecionadas

As BAL foram submetidas aos testes para verificar a capacidade de crescimento a 10 e 45°C, em 6,5 e 18% de NaCl e em pH 4,4 e 9,6, em caldo MRS adicionado de 0,2 g.L⁻¹ de púrpura de bromocresol (HARRIGAN & McCANCE, 1998). O catabolismo fermentativo ou oxidativo da glicose foi determinado em caldo MRS com 5% de glicose, com a omissão de citrato de tri-amônio (HARRIGAN & McCANCE, 1998). A redução do nitrato a nitrito foi determinada em caldo nitrato peptona, segundo Harrigan & McCance (1998). A produção de CO₂ a partir do gluconato foi determinada em caldo MRS contendo

gluconato (40gL^{-1}) em vez da glicose, segundo Harrigan & McCance (1998) em todos os testes citados, a incubação foi realizada durante 7 dias nas temperaturas ótimas de cada espécie (Tabela 1) (Anexo 4).

Os sistemas API 50 CH (bioMérieux, Nurtingen, Germany) e BBL Crystal Gram Positive (Becton Dickinson, França) foram utilizados para caracterização bioquímica e enzimática das culturas isoladas, empregando-se, respectivamente, os softwares bioMérieux SA e *Crystal Electronic Codebook*.

As suspensões de células foram obtidas semeando-se as culturas por esgotamento em ágar MRS contido em placas de Petri, posteriormente incubadas em temperaturas específicas a cada grupo bacteriano durante 16-18 horas. Após este período, uma porção de massa de células foi suspensa em 1mL de solução fisiológica, e transferida para um tubo contendo 10mL da mesma solução, em quantidade suficiente para se alcançar uma densidade igual à escala de McFarland número 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Fluxograma de processamento do queijo de coalho

De acordo com visitas realizadas nos laticínios (A, B e C), pode-se constatar que são mini-usinas artesanais e que apesar de estarem em nível tecnológico inferior, têm disputado “competitivamente” no mercado local com alguns produtos de grandes laticínios. A tecnologia de fabricação do queijo de coalho artesanal nestes laticínios provém de tradições arraigadas, as quais fabricam seu produto isoladamente, utilizando processos artesanais com tecnologia simples, que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho, sem adição de bactérias lácticas selecionadas. Apenas o laticínio “A” pasteuriza a matéria-prima (leite cru) para produção do queijo de coalho, conforme recomenda a legislação vigente.

Os fluxogramas de produção estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. O queijo de coalho A é um produto obtido a partir do leite integral, coagulado artificialmente e adicionado de cloreto de cálcio. É pasteurizado por 30 minutos a uma temperatura entre 62- 65°C, salgado após o produto pronto (2% do peso do queijo), acondicionado em sacola plástica e fechada com seladora a vácuo manual. Já os queijos de coalho B e C são produtos obtidos a partir de leite cru, coagulado artificialmente, salgado manualmente a massa do queijo (500g de cloreto de sódio em 100 L de leite no queijo B e em 200 L de leite no queijo C), acondicionado em sacolas plásticas personalizadas e fechadas com seladora a vácuo manual. No processamento do queijo B, observou-se que o leite cru após recepção, não foi filtrado, resultando assim, em um produto com possibilidade de conter perigos físicos, e conseqüentemente, processado em condições higiênicas insatisfatórias. Já em relação ao queijo C, após a etapa da 1º dessoragem, ocorreu o aquecimento da massa através da adição de água quente a temperatura em torno de 66°C.

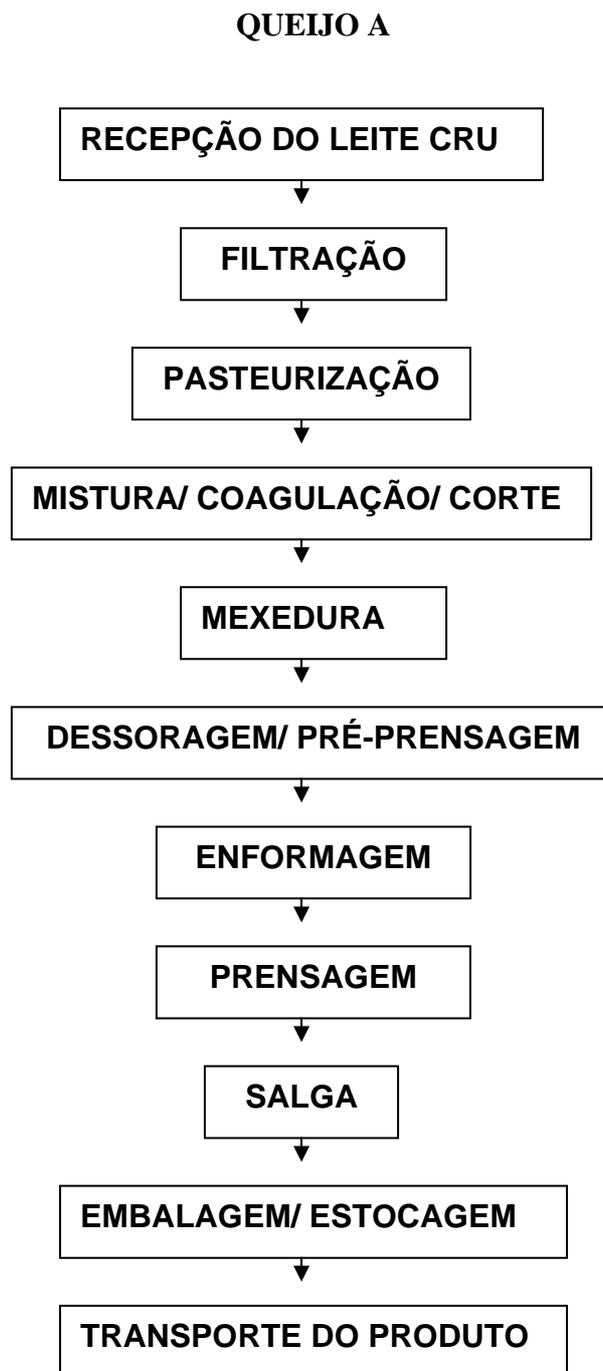


Figura 1- Fluxograma de processamento do queijo de coalho A.

QUEIJO B

Figura 2- Fluxograma de processamento do queijo de coalho B.

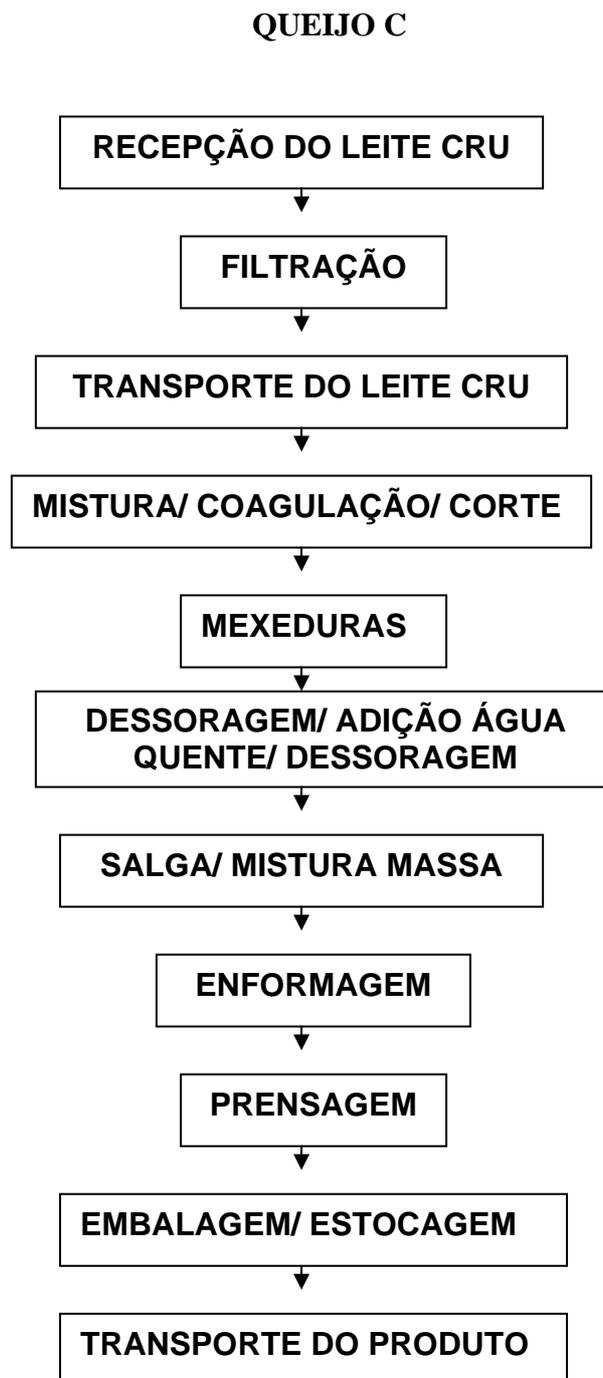


Figura 3- Fluxograma de processamento do queijo de coalho C.

4.2. Avaliação sensorial dos queijos

Os resultados obtidos referentes à análise sensorial realizada nas três amostras de queijo de coalho produzidos no sertão de Alagoas estão apresentados na Tabela 2. Pode-se verificar, que o queijo A apresentou características sensoriais diferenciadas, principalmente em relação ao odor e sabor. Isto pode ter ocorrido devido ao processo de pasteurização que o mesmo foi submetido (Figura 1), levando a destruição de grande parte da microbiota láctica natural do leite cru, o que pode influenciar negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo.

Tabela 2- Características sensoriais das amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Características	Queijo A	Queijo B	Queijo C
Aparência	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas - Espaços vazios	- Massa compacta - Coloração creme-amarelada - Poucas olhaduras bem-formadas
Odor	- Ácido e estranho	- Característico de queijo de coalho ácido	- Característico de queijo de coalho, suave amanteigado
Textura/sensação na boca	- Macio, levemente borrachento, forma fragmentos muito pequenos durante a mastigação	- Macio e grumoso	- Firme e borrachento, desfaz-se em pequenos fragmentos durante a mastigação
Sabor	-Levemente salgado e muito amargo, forte sabor estranho	- Característico de queijo de coalho, ácido, salgado e levemente amargo; livre de sabores estranhos	- Característico de queijo de coalho, levemente salgado e levemente amanteigado; livre de sabores estranhos

Já o queijo B foi considerado o mais salgado, devido provavelmente a salga intensa na massa (Figura 2), prática esta, que tem como objetivo evitar o estufamento precoce do queijo de coalho, devido à produção de gás por coliformes (NASSU *et al.*, 2001b). Além disso, esta prática em queijo que utiliza fermento láctico pode retardar o

crescimento deste fermento, inibindo assim a produção intensa de ácido (FOX *et al.*, 2000).

Quanto ao queijo C, a textura foi considerada a característica mais diferenciada em relação aos demais queijos, apresentando-se como firme e borrachento, característica esta decorrente da adição de água quente que visa proporcionar o aquecimento da massa (Figura 3). Benevides *et al.* (2000) ao avaliarem sensorialmente o queijo de coalho produzido com leite cru e com leite pasteurizado no estado do Ceará, observaram que o sabor e a textura foram melhor avaliados para o queijo produzido a partir de leite cru e a maciez para o queijo produzido com leite pasteurizado.

Nassu *et al.* (2004), também constataram características sensoriais distintas entre 20 amostras de queijo de coalho comercializado em Fortaleza. Dentre as amostras estudadas, três produzidas com leite cru e quatro produzidas com leite pasteurizado apresentaram atributos considerados característicos para o queijo da região.

Portanto, pode-se observar que são vários os fatores inerentes a cada processamento responsáveis pela diferenciação entre os queijos de coalho produzidos em diversas regiões e a falta de padronização no processamento deste produto é um fato evidente.

4.3. Avaliação das características físico-química dos queijos

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos queijos de coalho. Pode-se observar que o teor de umidade variou de 45,50% a 51,50%, podendo ser caracterizado como queijo de média ($36\% < \text{umidade} < 46\%$) a alta umidade ($46\% < \text{umidade} < 55\%$), conforme definido na Portaria nº146 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária (BRASIL, 1996). Vale ressaltar, que a alta umidade encontrada no queijo de coalho “A” (51,50%), contribuirá para uma maior proliferação microbiana e conseqüentemente vida útil curta deste produto, já que o mesmo foi produzido a partir de leite cru e sem adição de fermento láctico (Tabela 3).

Este resultado concorda com os obtidos por Carvalho (2007) e Machado (2008), que classificaram o queijo de coalho produzido no Ceará, como de média umidade. Resultados divergentes foram relatados por Andrade Filho & Santos (1998), que encontraram teor de umidade variando de 56,5 a 88,5% em 15 amostras de queijo de coalho fabricados em Sergipe, caracterizando-os como queijos de muito alta umidade

(umidade > 55%). Vieira *et al.* (2003) encontraram variações entre 23,2 a 58,0% para o teor de umidade em queijos de coalho comercializados no estado de Pernambuco. Já Silva *et al.* (2006), encontraram valores médios de 40,28% no total de 11 amostras de queijo de coalho comercializados na cidade de Natal, RN.

Tabela 3- Caracterização físico-química de amostras de queijo de coalho do sertão alagoano.

Amostras Queijos	Umidade* (%)	Gordura* (%)	Cloretos (%)	pH	Acidez (%)	Proteína (%)	Cinzas (%)
A	51,50	17,75	4,68	7,33	0,43	29,79	3,40
B	45,50	26,25	5,48	6,23	0,44	26,95	3,70
C	45,80	24,50	3,16	5,99	0,34	29,63	3,30

Padrão* segundo BRASIL (2001a): Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Umidade= 36-54,9%, Gordura = 35-60,0%

Segundo a legislação em vigor (BRASIL, 2001a), o queijo de coalho pode ser definido como semi-gordo (25,0 a 44,9%), gordo (45,0 a 59,9%) ou extra gordo (mínimo de 60,0%), devendo apresentar um teor de gordura entre 35,0% e 60,0%.

Os valores de gordura das amostras de queijo de coalho artesanal reportado neste trabalho variaram de 17,75 a 26,25%, sendo similar aos obtidos por Santos *et al.* (2006) que ao analisarem queijos de coalho produzidos no estado de Sergipe, encontraram valor médio de 24,4% de gordura, porém, inferior aos encontrados por Machado (2008), que constatou teor de 39,75% de gordura em amostras de queijos de coalho produzido no Ceará.

A legislação brasileira não estabelece padrões para os demais parâmetros físico-químicos avaliados nesta pesquisa, visto que, ainda não existe uma padronização no processo de produção e a maioria dos queijos de coalho são produzidos artesanalmente. Contudo, a análise de cloretos confirmou a característica sensorial do queijo “B” como o mais salgado (5,48%), pois como a adição de sal é realizada manualmente, não há uma uniformidade quanto à distribuição deste nas peças de queijos, levando a variações no teor de cloretos (Tabela 3). Resultados divergentes foram relatados por Nassu *et al.* (2006) que encontraram uma quantidade média de cloretos de 2,51% em amostras deste mesmo tipo de queijo, produzido no Rio Grande do Norte. Segundo Guinee & Fox (2004), o teor de cloreto de sódio em queijos varia de aproximadamente 0,7% para o Emmental a 6,0% para o Domiati.

Os valores de pH entre as amostras estudadas variaram de 5,99 a 7,33 (Tabela 3), constatando-se que os queijos são frescos, recém processados e não passaram por processo de cura. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho (2007) e Machado (2008). Já Sena *et al.* (2000), encontraram um pH médio de 5,35 para as amostras de queijo de coalho produzidos em Recife, PE. O queijo “A” apresentou pH mais elevado (7,33), possivelmente em decorrência da presença de bolores e leveduras, os quais possuem a capacidade de metabolizar ácido láctico (BERESFORD & WILLIAMS, 2004). A ocorrência de proteólise por enzimas produzidas por bactérias lácticas naturalmente presentes em queijos produzidos com leite cru, também é outro fator, que pode levar à produção de compostos alcalinos durante a quebra de proteínas, conforme relatos de outros pesquisadores (FOX *et al.*, 2000).

A acidez titulável, expressa em percentual de ácido láctico, variou de 0,34 a 0,44 concordando com os valores encontrados por Andrade (2006), que analisando amostras de queijo de coalho produzido no Ceará constatou valores médios de 0,42% para acidez e pH de 6,33. Já Carvalho (2007) detectou valor médio de acidez de 0,24%.

Com relação aos teores de proteína e cinzas encontrados nesta pesquisa (Tabela 3), os resultados divergem dos obtidos por Nassu *et al.* (2001), que constataram valores médios de 24,26% para proteína e 4,41% para cinzas em amostras de queijo de coalho produzidos no Ceará.

4.4. Avaliação da qualidade microbiológica dos queijos

Os alimentos podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos que podem interferir na vida útil ou causar doenças. Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, ficou evidente a má qualidade higiênico-sanitária das amostras de queijo de coalho produzidas no sertão de Alagoas. Todas apresentaram elevadas contagens de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 4). De acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001b), o limite máximo permitido de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase (+)* é de 5×10^2 UFC/g e como pode-se observar na Tabela 4, as três amostras apresentaram contagens acima deste valor. Apesar do queijo “A” ter sido produzido a partir de leite pasteurizado, o mesmo ainda apresentou contagens elevadas dos indicadores de qualidade e segurança (Tabela 4). A ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas, pode ser devido a presença da microbiota autóctone, mais especificamente as bactérias lácticas,

que têm a capacidade de restringir o crescimento de microrganismos patogênicos por competição e ou produção de moléculas antagônicas, conforme relatados por vários pesquisadores (CARVALHO, 2007; JONES *et al.*, 2008). No entanto, a quantidade e/ou o tipo de metabólito antimicrobiano produzido por bactérias lácticas nessas amostras pode não ter sido suficiente para o controle de *Staphylococcus aureus* que geralmente encontra-se em grande número.

Tabela 4 - Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Análises	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Padrão*
Coliformes a 35°C (NMP/g)	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	-
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	5,0 x 10 ²
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	5,0 x 10 ²
Bolores e leveduras (UFC/g)	3,8 x 10 ⁴	4,6 x 10 ⁴	7,2 x 10 ⁴	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	2,0 x 10 ⁴	4,0 x 10 ⁷	5,0 x 10 ⁴	5,0 x 10 ²
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

Padrão*: RDC n°12 (BRASIL,2001b): Dispõe sobre padrões microbiológicos sanitários para alimentos.

Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram constatados por Benevides & Telles (2002) em 40 (80,6%) amostras de queijos de coalho produzidos na cidade de Fortaleza-CE, com valores de coliformes termotolerantes acima do padrão microbiológico permitido pela legislação brasileira (BRASIL,2001b). Bruno *et al.* (2005) também analisaram amostras de queijo de coalho produzidos a partir de leite cru e a partir de leite pasteurizado (4 unidades de cada) e detectaram que todas as amostras apresentaram *Escherichia coli*, sendo que, nas amostras produzidas com leite cru foi também detectada a presença de *Salmonella* sp. No entanto, em três das amostras produzidas com leite cru e em uma produzida com leite pasteurizado, apresentaram também contagens elevadas de estafilococos coagulase positiva, isto é, acima de 10⁷ UFC/g.

Resultados divergentes foram obtidos por Branco *et al.* (2003), quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, em amostras de queijo de coalho detectadas em 19% das amostras analisadas.

4.5. Isolamento e caracterização das BAL

Com relação à caracterização das BAL, foram isoladas um total de 109 colônias nos meios de crescimento específicos, conforme apresentado na Tabela 5. As colônias isoladas apresentaram-se como pequenas e brancas, características típicas das BAL, pois não produzem pigmentos e são pequenas devido a fermentação de carboidratos não liberar muita energia, e com isso elas degradam muito carboidrato e produzem muitos produtos de fermentação para obter energia para seu crescimento. Na maioria dos meios as BAL esgotam os açúcares ou produzem muito ácido, o que inibe seu próprio crescimento antes que as colônias fiquem grandes (MASSAGUER, 2005).

Tabela 5- Distribuição do número de colônias de BAL isoladas em cada meio de crescimento específico

Meios de crescimento específicos	Nº de colônias isoladas
Ágar M17 (<i>Lactococcus</i>)	20
Ágar APT (<i>Leuconostoc</i>)	17
Ágar Rogosa (<i>Lactobacillus</i>)	21
Ágar KF (<i>Enterococcus</i>)	16
Ágar MRS (<i>Pediococcus</i>)	18
Ágar M17 (<i>Streptococcus</i>)	17
TOTAL	109

Para definição desses microrganismos como BAL, as mesmas devem apresentar-se como catalase negativa e Gram positivos. A avaliação da produção de catalase dos microrganismos isolados está demonstrada na Figura 4. Das 109 colônias isoladas, 87 (79,8%) mostraram-se como catalase negativa, 21 (19,3%) como catalase positiva e 1 (0,9%) não conseguiu desenvolver-se a sucessivas repicagens, sendo considerada não-cultivável.

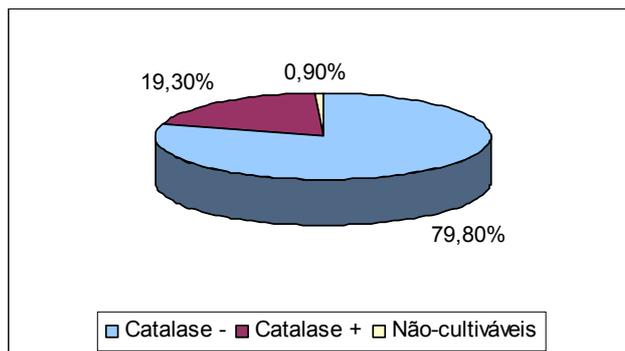


Figura 4- Reação de atividade de catalase pelos microrganismos isolados de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.

Todas as 87(100%) colônias que apresentaram reação negativa no teste de catalase, foram também Gram positivas. Quanto à morfologia, a forma de cocos foi a maioria dentre os microrganismos isolados em cada meio de crescimento específico, com exceção das colônias isoladas do Ágar Rogosa, o qual, é específico para crescimento de *Lactobacillus*, conforme está demonstrado na Figura 5.

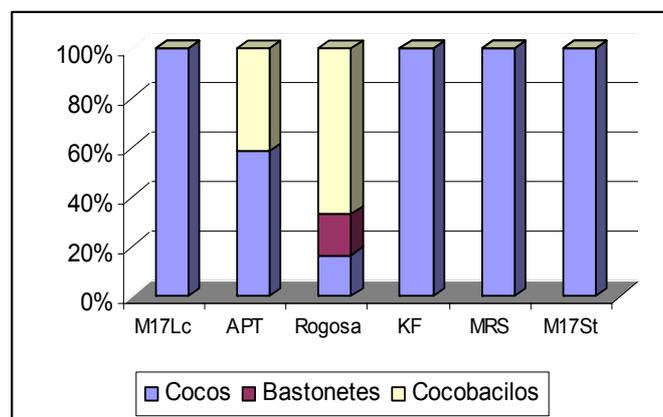


Figura 5- Distribuição do crescimento de microrganismos em diversos meios de cultura na forma de cocos, bastonetes e cocobacilos isolados de amostras de queijo de coalho do sertão alagoano.

De acordo com a literatura a morfologia dos *Lactobacillus* é de bastonetes, usualmente regulares e de tamanho variado, no entanto, alguns gêneros formam pequenos cocobacilos (SILVA *et al.*, 2001).

Este resultado foi similar ao encontrado por Carvalho (2007) que verificou uma percentagem similar de microrganismos catalase negativos (84,7%) e a maior presença

de microrganismos na forma de cocos, ao estudar as mudanças ocorridas na microbiota do queijo de coalho produzido no Ceará.

Das 87 linhagens Gram-positivas, catalase negativa, na forma de cocos, bastonetes ou cocobabilos, 43 (49,4%) foram produtoras de ácido, coagulando e reduzindo o meio leite tornassolado no período de 24 horas, dando origem a um coágulo firme e sem gás. Com relação aos demais isolados, 29 (33,3%) foram considerados fracos produtores de ácidos por não coagularem completamente o meio e 8 (9,2%) não produziram ácido no mesmo período. Sete isolados (8,1%) produziram ácido e gás durante o período de incubação (Tabela 6). As outras reações envolvendo a caseína ou outros constituintes não foram avaliadas, no entanto todas as linhagens com exceção de uma, coagularam o leite ao fim dos 14 dias de incubação. Foram selecionadas somente as 43 linhagens produtoras de ácido para realização dos testes tecnológicos, contudo, todas as culturas foram submetidas ao teste organoléptico.

Tabela 6- Avaliação da produção de ácido pelos microrganismos isolados de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Microrganismos	Nº de isolados	%
Produtores de ácido	43	49,4
Fracos produtores de ácido	29	33,3
Não produtores de ácido	8	9,2
Produtores de ácido + gás	7	8,1
TOTAL	87	100,0

As BAL fermentadores de lactose produziram ácido transformando a cor do indicador do meio para cor-de-rosa. Quando ocorreu a formação de muito ácido, houve coagulação do leite com produção de soro. O meio *Litmus* foi reduzido na parte do fundo do tubo pela maioria das culturas lácticas tornando o meio branco (Figura 6).



Figura 6- Características de crescimento das BAL em leite tornassolado

4.6. Avaliação das propriedades funcionais tecnológicas das BAL

Tendo em vista que as condições foram padronizadas, pode-se a partir dos resultados obtidos, observar nítidas diferenças entre uma cultura e outra, tanto no que diz respeito às características do coágulo como no sabor e aroma. A maioria das culturas isoladas apresentou sabor e aroma típicos e bastante agradáveis. É importante salientar que, em alguns casos, mesmo em culturas isoladas de uma mesma amostra foram detectadas diferenças marcantes de uma cultura para outra.

Das 87 culturas catalase negativa e Gram positivos avaliadas, 17 (19,5%) apresentaram fortes defeitos. Dentre esses defeitos, 11 (64,7%) cepas apresentaram textura granulosa, 1 (5,9%) odor desagradável e 5 (29,4%) sabor amargo (Figura 7). Contudo, estas que apresentaram fortes defeitos, não produziram ácido ou produziram fracamente de acordo com o teste no leite tornassolado, sendo, portanto, excluídas de qualquer maneira.

Garcia (1984) ao avaliar 80 culturas de BAL pelo teste organoléptico foi selecionada cinquenta e sete que apresentaram as melhores características, onde as não selecionadas apresentaram sabor e odor de malte.

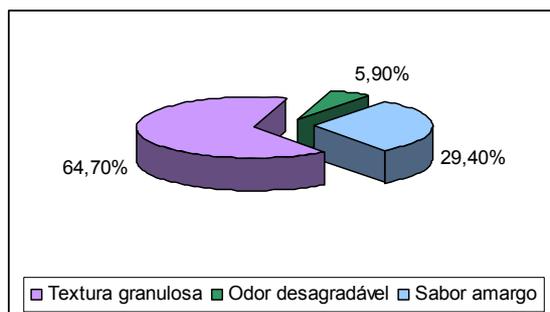


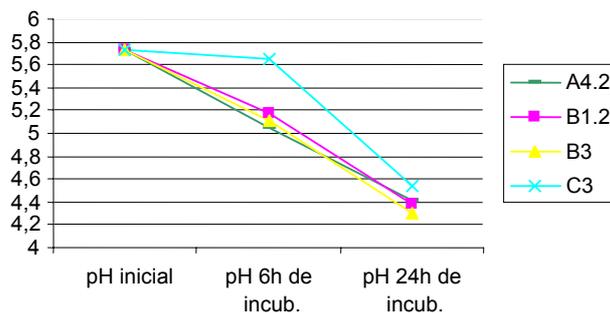
Figura 7- Defeitos organolépticos das BAL isoladas

4.6.1 Avaliação da capacidade de acidificação

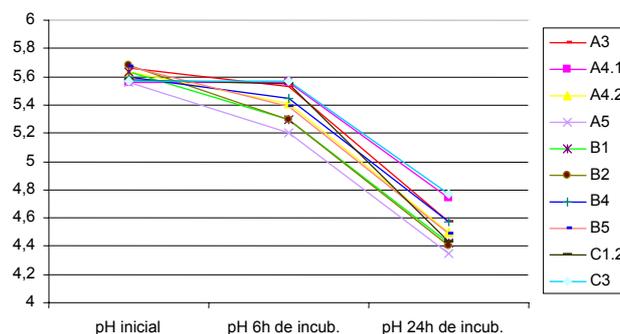
A capacidade de acidificação das 43 culturas selecionadas nesta pesquisa, dos gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* e *Lactobacillus* foi avaliada através do pH mensurado após 6 e 24 horas de incubação (Figura 7). Uma cultura para ser considerada produtora rápida de ácido, deve reduzir o pH do leite de 6,6 para 5,3 em 6 horas de incubação à temperatura adequada (COGAN *et al*, 1997). Após 24 horas de incubação, o valor de pH do ponto isoelétrico da caseína (4,6) foi utilizado como base para a determinação da capacidade de produção de ácido (CARVALHO, 2007).

Portanto, pode-se constatar que uma cultura de *Lactococcus* (C₃), seis de *Pediococcus* (A₃, A_{4.1}, A_{4.2}, B₄, C_{1.2}, C_{1.3}), todas de *Lactobacillus* (A₁, A₃, A₄, C₁, C₃, C_{4.2}, C_{5.1}), uma de *Enterococcus* (A₁), duas de *Leuconostoc* (B₃ e C₄), três de *Streptococcus* (B_{1.2}, B₄, C₂) não atingiram o pH de 5,3 (ou menor), em 6h de incubação, sendo portanto, consideradas culturas não iniciadoras. Após 24 horas de incubação, as culturas de *Enterococcus* (A₁), *Leuconostoc* (B₃), *Streptococcus* (B₄ e C₂), *Pediococcus* (A_{4.1}, C₃) e de *Lactobacillus* (A₁ e A₃) continuaram a não atingir o pH de 4,6. Assim, pode-se inferir que as culturas selecionadas de *Lactobacillus* foram aquelas que apresentaram menor capacidade de acidificação, já que 100% delas não atingiram o pH desejável após 6 horas de incubação (Figura 8).

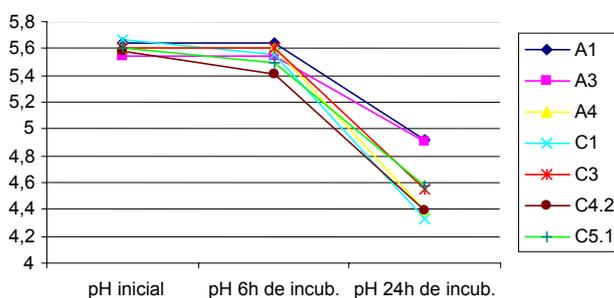
Capacidade acidificante de culturas de *Lactococcus*



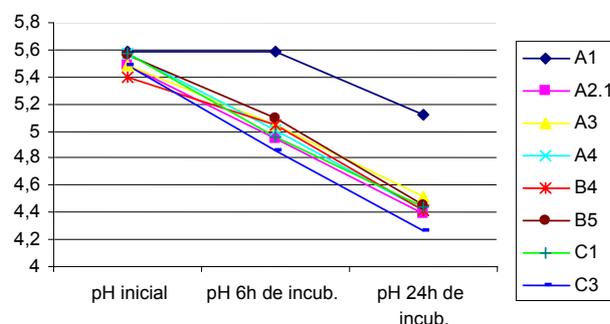
Capacidade acidificante de culturas de *Pediococcus*



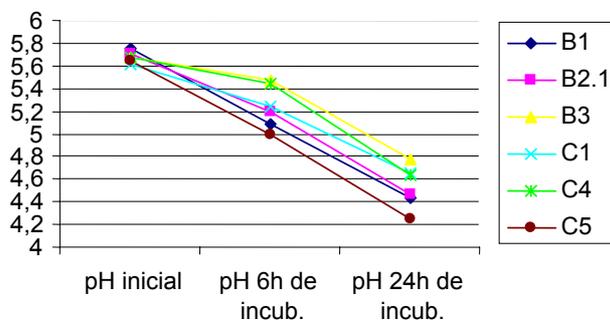
Capacidade acidificante de culturas de *Lactobacillus*



Capacidade acidificante de culturas de *Enterococcus*



Capacidade acidificante de culturas de *Leuconostoc*



Capacidade acidificante de culturas de *Streptococcus*

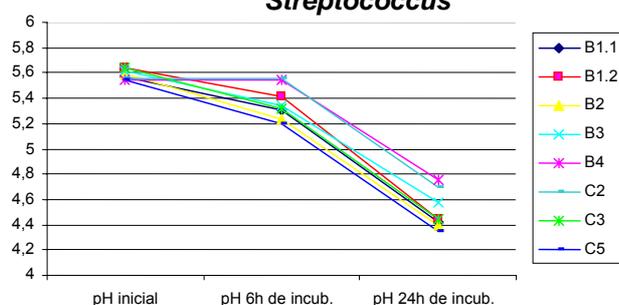


Figura 8- Capacidade de acidificação das culturas lácticas selecionadas.

Em contrapartida, do total de 43 culturas avaliadas, 24 (55,8%) foram consideradas produtoras rápida de ácido e após 24 horas, 35 (81,4%) dessas culturas alcançaram o pH de 4,6 ou menor. Tais resultados divergem dos relatados por Carvalho (2007), o qual verificou que somente 8,8% das culturas isoladas de queijo de coalho

produzido no Ceará foram consideradas produtoras rápidas de ácido e que após 24 horas, 21,1% das mesmas atingiram o pH de 4,6.

A capacidade de produzir ácido pelas diferentes culturas de BAL pode apresentar variações de acordo com diversos fatores, como gênero e espécie, ecossistema de origem do isolado, tratamento térmico do leite, temperatura e tempo de incubação, presença de antibióticos ou bacteriófagos, sendo, portanto, uma característica instável. Em contrapartida, a habilidade de produzir ácido rapidamente auxilia na atividade do coagulante, na expulsão do soro da coalhada e na segurança de queijos, por prevenir o crescimento de patógenos, além de contribuir para a modificação da textura e definição do sabor do queijo (DURLU-OZKAYA *et al.*, 2001; FOX *et al.*, 2000).

4.6.2 Capacidade aromatizante

A avaliação da capacidade aromatizante foi realizada com as 43 culturas selecionadas, através da produção de diacetil (2-3 butanodiona) e acetoína (3-hidroxil-2-butanona). Das culturas avaliadas, 42 (97,7%) apresentaram produção de diacetil e acetoína em quantidade menor que 2,5mg/kg, sendo consideradas fracas produtoras de aroma e 1 (2,3%) não produziu diacetil e acetoína (Tabela 7).

Tabela 7- Capacidade aromatizante de culturas lácticas isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Produção de aroma	Culturas avaliadas	%
Ausente	1	2,3
Fraca	42	97,7
TOTAL	43	100

Estes resultados diferem dos encontrados por Alonso-Calleja *et al.* (2002), que detectaram uma percentagem de 31% das 45 culturas avaliadas isoladas do queijo espanhol Valdeteja, como fortes produtores de diacetil e acetoína.

O diacetil é um componente aromático desejável em alimentos lácticos, pois confere sabor e aroma. É produzido por algumas linhagens de BAL a partir do citrato, juntamente com a fermentação da lactose (BROLASO, 2003)

4.6.3 Atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi avaliada através da determinação dos teores de aminoácidos livres totais (α -NH₂), com o mesmo número de culturas lácticas para o qual foi avaliada a capacidade aromatizante. Quanto maior a concentração de α -NH₂, maior será a capacidade proteolítica do microrganismo, já que a degradação de proteínas ocorre pela ação do sistema proteinase-peptidase das culturas lácticas.

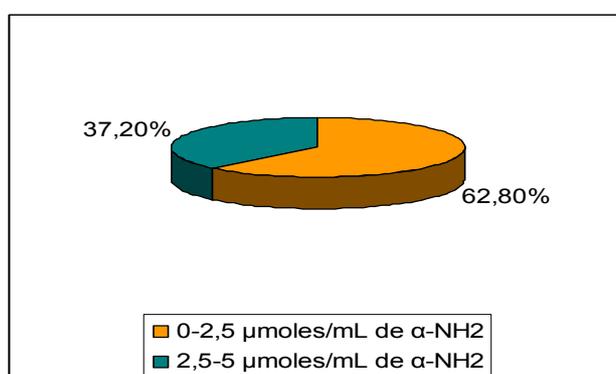


Figura 9- Atividade proteolítica das culturas lácticas isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Das 43 culturas avaliadas, 27 (62,8%) produziram α -NH₂ em concentração de até 2,5 μ moles/mL e 16 (37,2%) culturas alcançaram concentrações entre 2,5-5,0 μ moles/mL, exibindo assim uma fraca proteólise, já que todas apresentaram baixa produção de aminoácidos livres totais.

Resultados similares foram relatados por Badis *et al.* (2004), nos quais apresentaram atividade proteolítica máxima de 5,0 μ moles/mL de α -NH₂ ao avaliarem as propriedades tecnológicas de BAL, sendo este valor também considerado bastante baixo pelos autores.

Por outro lado, a concentração de aminoácidos livres totais produzidos por BAL relatados por Quiberoni *et al.* (1998), atingiu o valor de 20 μ moles/mL.

Uma das consequências mais importantes da proteólise nos queijos é a produção de compostos voláteis que contribuem para o sabor e o aroma, principalmente nos queijos curados. No caso do queijo de coalho, que é consumido ainda fresco, o uso de microrganismos muito proteolíticos não é recomendado, já que a proteólise pode levar ao aparecimento de sabor amargo e ao amolecimento alterando a textura (FURTADO, 1999).

4.7 Identificação taxonômica das BAL selecionadas

A classificação dos gêneros das 43 BAL isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas pode ser observada na Tabela 8. O gênero predominante foi o *Streptococcus*, representando 41,9% dos isolados identificados.

O gênero *Enterococcus* foi detectado em 16,3% do total de isolados avaliados, seguido pelos gêneros *Pediococcus* e *Leuconostoc* (9,3%), *Lactobacillus* (4,6%) e *Lactococcus* (2,3%). Sete (16,3%) isolados, não puderam ser classificados em nenhum dos gêneros através dos testes realizados. A presença dominante de isolados dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus* revela a prevalência de bactérias que se desenvolvem bem em temperaturas elevadas (45°C). Resultados divergentes foram encontrados por Ouadghiri *et al.*, (2005), onde caracterizaram 164 BAL isoladas de um queijo branco e macio marroquino, identificando 34% de *Lactobacillus*, 27% para *Leuconostoc* e *Lactococcus*, 10% de *Enterococcus* e 2% de *Streptococcus*.

Tabela 8- Classificação dos gêneros de BAL isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

Gêneros	Nº de isolados	%
<i>Streptococcus</i>	18	41,9
<i>Enterococcus</i>	7	16,3
<i>Pediococcus</i>	4	9,3
<i>Leuconostoc</i>	4	9,3
<i>Lactobacillus</i>	2	4,6
<i>Lactococcus</i>	1	2,3
Não-identificado	7	16,3
TOTAL	43	100

Vinte isolados foram submetidos à identificação das espécies para os gêneros isolados no queijo de coalho produzido no sertão alagoano (Tabela 9).

Tabela 9- Espécies de BAL isoladas de amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano

BAL	Nº de isolados	%
<i>Streptococcus vestibularis</i>	4	20
<i>Streptococcus mutans</i>	3	15
<i>Streptococcus uberis</i>	2	10
<i>Streptococcus bovis</i>	2	10
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	1	5
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1	5
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	1	5
<i>Lactococcus lactis</i>	1	5
Não-identificado	5	25
TOTAL	20	100

Dentre o gênero *Streptococcus*, as espécies identificadas foram os *Streptococcus vestibularis* (20%), *Streptococcus mutans* (15%), *Streptococcus uberis* (10%) e *Streptococcus bovis* (10%). Os *S. vestibularis* e *S. mutans* são espécies que colonizam a cavidade bucal dos humanos, podendo indicar condições higiênico-sanitárias inadequadas durante a produção do queijo de coalho. Os *S. uberis* e *S. bovis* são contaminantes encontrados no leite cru, evidenciando falta de controle da matéria-prima.

As espécies *Lactobacillus plantarum 1* (5%) e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (5%) foram aquelas identificadas nas amostras de queijo de coalho do sertão de Alagoas. Estas espécies fazem parte da microbiota secundária e chegam até os queijos através do leite cru e de contaminações provenientes do ambiente e da produção. Esses lactobacilos são conhecidos como NSLAB- “Non Starter Acid Lactic Bactéria”, geralmente encontrados em fermentos lácticos artesanais (FOX *et al.*, 2000). *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*, que são espécies significante na fermentação de produtos lácteos, também foram identificados em 5% dos isolados. Cinco dos isolados (25%) não foram identificados, pois apresentaram perfil duvidoso ou baixa probabilidade de identificação nos sistemas utilizados. As espécies para os gêneros *Enterococcus* e *Leuconostoc* não foram identificadas.

As espécies identificadas neste trabalho não estão em concordância com os obtidos por Carvalho (2007), que detectou a predominância de *Enterococcus faecium*

(20,7%) e *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (23,2%) em amostras de queijo de coalho artesanal produzido no estado do Ceará.

Um fermento láctico eficiente para a produção de queijos necessita, primeiramente, conter uma cultura iniciadora, e de acordo com os resultados obtidos, as culturas de *Lactococcus lactis* são as mais indicadas para assumirem este papel. Já os *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* 1 e *Pediococcus pentosaceus* são as culturas indicadas para complementar o fermento.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram inferir as seguintes conclusões:

- De forma geral, as etapas de processamento do queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas pelos laticínios A, B, C foram similares, entretanto, as etapas referentes a salga, a pasteurização e o aquecimento da massa, foram aquelas que apresentaram particularidades entre as empresas, resultando, em produtos com características sensoriais diferenciadas.
- Na avaliação de parâmetros físico-químicos ficou evidente a falta de padronização no processamento do queijo de coalho e a não conformidade em relação ao teor de gordura recomendado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho. Este produto foi caracterizado como queijo de média a alta umidade e baixo teor de gordura.
- Na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo de coalho do sertão de Alagoas, constatou-se que as mesmas são indicativas de condições inadequadas de processamento. A ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp. pode ser atribuído a presença de metabólitos antimicrobianos produzidos pelas BAL nessas amostras.
- Das 109 culturas isoladas dos meios específicos, 87(79,8%) foram caracterizadas como BAL, pois apresentaram-se como Gram positivas e catalase negativa. Destas, 43(49,4%) foram selecionadas como produtoras de ácido e apresentaram características organolépticas aceitáveis para produção de um fermento láctico.
- Das culturas avaliadas quanto à capacidade de acidificação, 24(55,8%) foram consideradas produtoras rápidas de ácido, sendo que, 35(81,4%) alcançaram o pH de 4,6 em 24 horas. Essas culturas iniciadoras são de essencial importância para produção de um fermento láctico eficiente.
- A capacidade aromatizante e a atividade proteolítica caracterizaram as culturas lácticas testadas como fracas produtoras de aroma e como pouco proteolíticas, evidenciando que apesar de não serem fortes produtoras de aroma, podem ser utilizadas na elaboração de um fermento láctico, já que a atividade proteolítica não irá proporcionar sabor amargo nem alteração da textura do queijo de coalho.
- Entre as espécies que apresentaram potencial tecnológico para serem utilizadas na formulação de um fermento láctico para produção de queijo de coalho do

sertão alagoano, foram identificadas; *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum* 1 e *Pediococcus pentosaceus*. Em contrapartida a predominância do gênero *Streptococcus* demonstrou que estes podem contribuir para as características do mesmo, no entanto, para que estas culturas sejam adicionadas como cultura “starter” é necessário outros estudos a respeito de seus fatores de virulência.

- Estudos adicionais serão realizados para testar essas culturas no processamento em escala experimental, do queijo de coalho a partir de leite pasteurizado.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ADLER-NISSEN, J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitro benzene sulfonic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.27, n.6, p.1256-1262, 1979.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.54, n.4, jul./ago. 2002.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 578-80, 2000.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo minas frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 102/103, p. 71-73, 2002.

ALONSO-CALLEJA, C; CARBALLO, J.; CAPITA, R.; BERNARDO, A.; GARCIA-LOPEZ, M. Comparison of the acidifying activity *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from goat's milk and Valdeteja cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.34, n.2, p.134-138, 2002.

ANDRADE, A. A. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no Ceará**. 2006. Dissertação (Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

ANDRADE FILHO, J. B.; SANTOS, M. N. G. Avaliação microbiológica e físico-química de queijos artesanais tipo coalho comercializados no estado de Sergipe. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998, Rio de Janeiro. **Livro de Resumos**. Rio de Janeiro: Comissão Organizadora do XVI CBCTA, 1998. p. 125-128.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S., 2006. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, **Bacteriological Analytical Manual Online**. Chapter 5, updated June 2006.

APHA, 2004. **Standard methods for the microbiological examination of dairy products**. 17th ed. American Public Health Association Washington, D.C.

AQUINO, F.T.M. **Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento**, 1983. 81p. Dissertação (Mestrado). Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

AYAD, E. H. E.; VERHEUL, A.; WOUTERS, J. T. M.; SMIT, G. Population dynamics of lactococci from industrial, artisanal and non-dairy origins in defined strain starters for gouda-type cheese. **International Dairy Journal**, v.11, p. 51-56, 2001.

BADIS, A.; GUETARNI, D.; MOUSSA-BOUDJEMÂA, B.; HENNI, D. E.; TORNADIJO, M. E.; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, London, v. 21, n.5, p. 343-349, out. 2004.

BALLESTEROS, C.; POVEDA, J.M.; GONZÁLES-VIÑAS, M.A.; CABEZAS, L. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. **Food Control**, v.17, n.4, p. 249-255, 2006.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F.J.S.; GUIMARÃES, A.C.L.; RODRIGUES, M.C.P. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos- B. CEPPA**, Curitiba, v. 18, n.2, p.193-206, jul./dez.2000.

BENEVIDES, S. D.; TELLES, F. J. S. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagens de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 95, p. 44-47, 2002.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, jul. 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The microbiology of cheese ripening. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; COGAN, T. M.; GUEENE, T. P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3^a ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press, v. 1, p. 287-317, 2004.

BORGES, M. F.; FEITOSA, T.; NASSU, R. T.; MUNIZ, C. R.; AZEVEDO, E. H. F de; FIGUEIREDO, E. A. T. Microrganismos patogênicos e em queijo de coalho produzido no Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 31-40, jan./jun., 2003.

BORGES, M. F. **Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência**. 2006. 199f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

BRANCO, M.A.A.C. **Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente**. 2002. 63p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

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. 209-430, jul./dez. 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. **Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Diário Oficial da União, Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa nº 62, de 26 de junho de 2001. **Aprova**

e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2001a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001. **Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos.** Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2001b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de produtos de origem animal. Instrução Normativa nº 30, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos.** Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2005.

BREASHEARS, M.M.; DURRE, W.A. Antagonistic action of *Lactobacillus lactis* toward *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 during growth and refrigerated storage. **Journal Food Protection**, v.62, p.1336-1340, 1999.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados.** 2003. 98 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

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

CABEZAS, L.; SÁNCHEZ, I.; POVEDA, J.M.; SESENA, S.; PALOPP, M.L.L. Comparison of microflora, chemical and sensory characteristics of artisanal manchego cheeses from two dairies. **Food Control**, v.18, p.11-17. 2007.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.50, p. 131-149, 1999.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v.13, p.191-200, 2003.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

CAVALCANTE, J. F. M.; FONSECA, C.R.; ANDRADE, N.J.; FERREIRA, C.L.L.F. Isolamento de Bactérias Lácticas de leite cru da região do Vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, MG, v.58, n. 333, p.106-109, 2003.

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. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, jan./mar. 2007.

CERRI, C. **Artesãos do futuro**. Globo Rural, Ed. Globo, n. 200, p. 36-49, junho 2002.

CLEGG, K. M.; LEE, Y. K.; MCGILLIGAN, J. F. Technical note: Trinitrobenzene sulphonic acid and ninhydrin reagents for the assessment of protein degradation in cheese samples. **Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 517-520, 1982.

COGAN, T.M. Flavour production by dairy starters cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v.79, p. 49S-64S, 1995.

COGAN, T. M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P.S.; FERNANDES, I.; GOMES, J.; GOMES, R.;

KALANTZOUPOULOS, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M.C.; RODRIGUES, 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.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. **Revista Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.22, p.263-271, 2002.

DABES, A.C.; SANTOS, W. L. M.; PEREIRA, E. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.53, n. 1, fev. 2001.

DUARTE, D.A.M.; SCHUCH, D.M.T.; SANTOS, S.B. RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, AM.M.; SILVA, J.V.D.; MOTA, R.A. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p.297-302, 2005.

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. 361-870, Nov. 2001.

EUZÉBY, J. P. **List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature**: a Folder Available on the internet, 2006. Disponível em: <http://www.bacterio.net>.

FEITOSA, T. **Estudos tecnológicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do queijo de coalho no estado do Ceará**, 1984. 96p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

FEITOSA, T.; BORGES, M. F de; NASSU, R. T; AZEVEDO, E. H. F.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico sanitários

em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. suplemento, p. 162-165, dez. 2003.

FERREIRA, C. L. L. F. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos**. 2 ed. Viçosa: Editora UFV, 2001. 112 p.

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, 1999.

FOX, P. F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2 ed., London, Chapman & Hall, 1993, v. 1 (General Aspects), ISBN, 600p.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; MCSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, cap. 5, p. 54-97, 2000.

FRANCO, B. D. G. M. de; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.

FURTADO, M.M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999. 176 p.

GARCIA, S. **Isolamento e seleção de culturas lácticas para a fabricação de queijos**. **Dissertação** (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas; 1984.

GIRAFFA, G. **Enterococci from foods**. FEMS Microbiology Reviews, Amsterdam, v.26, n.2, p. 163-171, jun. 2002.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, suppl.2, p.245-250, set. 2005.

GUINEE, T.P.; FOX, P.F. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. **Cheese chemistry, physics and microbiology**, 3rded. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E.; Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International of Dairy Journal**, Barking, v.7, p. 751-761, 1997.

HARRIGAN, W.F.; McCANCE, M.E. **Laboratory methods in food and dairy microbiology**. London: Academic Press, 1998. 452p.

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

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9thed, Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Lactic Acid Bacteria. Standard of identity**. Belgium: FIL/IDF, 1991. 3p. (FIL-IDF, 149).

ISO-8586-1, International Standard 8565-1 (1993). Sensory analysis - **General guidance for selection, training and monitoring of assessors** - Part 1: Selected assessors. Geneva: International Organization for Standardization.

JONES, R.J.; HUSSEIN, H.M.; ZAGOREC, M.; BRIGHWELL, G.; TAGG, J.R. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organism associated with fresh meat. **Food Microbiology**. v.25, p.392-399, 2008.

LAFARGE, V.; OGIER, J. C.; GIRARD, V. Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. **Applied and Environmental Microbiology**. n.70, v.9, p. 5644-5650, 2004.

KUCHROO, C.N.; FOX, P.F. Fractionation of the water soluble-nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. **Milchwissenschaft**, v.37, n.11, p.651- 653, 1982.

MACHADO, T.F. Incidência de patógenos e caracterização físico-química do queijo de coalho artesanal e industrial. In: **Symposium on Food Safety – IAFP América Latina 2008**. Anais: 30-31. São Paulo: ABRAPA; 2008.

MANDACARU. **Queijo de coalho Mandacaru**. Disponível em <<http://www.queijodecoalho.com.br>>, acesso em: 28/03/2009.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo. Livraria Varela, 2005. 258p.

McSWEENEY, P.L.H. **Biochemistry of cheese ripening**: Intruducional and Overview. In: FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. Cheese chemistry, physics and microbiology. 3^aed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2004.

MEDINA, R.; KATZ, M.; GONZALES, S.; OLIVER, G. Characterization of lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. **Journal Food Protection** v.64, n.4, p.559-563, 2001.

MENDES, E. S. ; MENDES, P.P.; COELHO, M.I.S.; SOUZA, J.C.R.; CRUZ, M.C.S.; MOREIRA, R.T. Avaliação sensorial de queijos de coalho elaborados com diferentes técnicas. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.16, n.100, p.59-65, set. 2002.

MORENO, I. **Efeito da autólise de culturas lácticas na proteólise do queijo Prato**. 2003. 180 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

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

NASSU, R.T.; ARAÚJO, R dos S.; BORGES, M.D.E.F.; LIMA, J.R.; MACÊDO, B.A.; LIMA, M.H.P.; BASTOS, M.D.O.S.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, 2001b.

NASSU, R.T.; SILVA, M.A.A.O.; VIOTTO, W.H. Variações sensoriais em queijo de coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. In: **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos 2004**; 19: Anais [CD-ROM]. Recife: SBCTA; 2004.

NASSU, R. T. ; ANDRADE, A.A.; SILVA, G.J.F.; FERNANDES, R.L.A. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 61, n.351, p. 303-305, jul./ ago.2006.

OUADRGHIRI, M.; AMAR, M.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Bioversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). **FEMS Microbiology Letters** v.251, n.2, p. 267-271, 2005.

PELÁEZ, C.; REQUENA, T. Exploiting the potencial of bacteria in the cheese ecosystem. Review. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 831-844. jun./set., 2005.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P.H.F.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; OLIVEIRA, L.L. **Físico-química do leite e derivados. Métodos analíticos**. 2º edição revisada e ampliada. Juiz de fora, MG: EPAMIG, 2001. 234p.

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

PRADO, C. S.; SANTOS, W.L.M.; CARVALHO, C.R.; MOREIRA, E.C.; COSTA, O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.52, n. 4, ago. 2000.

QUIBERONI, A.; TAILLIEZ, P.; QUÉNÉE, P.; SUÁREZ, V.; REINHEIMER, J.A. Genetic (RAPD-PCR) and technological diversities among wild *Lactobacillus helveticus* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n.3, p. 591-596, sep.1998.

RAPINI, L.S.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; SOUZA, M.R.; PENNA, C.F.A.M. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.1, p.130-133, fev. 2004.

RJINEN, L.; BONNEAU, S.Y.; YVON, M. Genetic characterization of major lactococcal aromatic aminotransferase and its involvement in conversion of amino acids to aroma compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.4873-4880, 1999.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A. V.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects**. 3^a ed, Editorial Board, New York, 2004.

SANTOS, L. O. dos. **Estudo da produção e purificação parcial de enterocina utilizando *Enterococcus* spp.** 2003. 84 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia dos Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS, J.S.; JALALI, V.R.R.; CASTRO, A.A.; SILVA, G.F.; SANTANA, M.M.; SANTOS, R.D.; SILVA, I.M. Avaliação da qualidade físico-química dos queijos artesanais produzidos no estado de Sergipe. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 150, p. 314, 2006.

SEBRAE/CE. **Projeto melhoria da qualidade do queijo de coalho produzido no Ceará**. Fortaleza: SEBRAE/CE, 1998. 208p.

SEBRAE/AL. **APL- laticínios sertão** (T3-ano 2007). Maceió: Instituto Compasso; 2008.

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. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.74, p.41-44, jul. 2000.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo; Varela; 2001. 317 p.

SILVA, A.E.A.; SANTOS, N.N.; SEABRA, L.M.J.; DAMASCENO, K.S.F.S.C. Quantificação de lipídios, cinzas e umidade de queijos tipos manteiga e coalho comercializados na cidade de natal, RN. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.145, p. 101-104, 2006.

SOUSA, S. **Ocorrência de *Listeria* spp. em queijo de massa crua tipo coalho, comercializado no município de João Pessoa-PB**. 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado)-Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. **International Journal Dairy Technology**, v.54, p.146-150, 2001.

VAUGHAN, E.E.; CAPLICE, E.; LOONEY, R. Isolation from food sources, of lactic acid bacteria that produced antimicrobials. **Journal of Applied Microbiology**, v.76, p.118-123, 1994.

VESSONI, C. L. Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isoladas de carcaças de frango**. 2004. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas.

VIEIRA, M.L.M.; VAZ, A.P.L.; FARO, Z.P. Avaliação de laudos analíticos de queijo tipo coalho, á luz das Legislações Federal e Estadual de Pernambuco. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.17, n.109, p.19-24, 2003.

YVON, M.; RIJNEN, L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. **International Dairy Journal**, v.11, p.185-201, 2001.

ZACARCHENCO, P. B. **Leites fermentados por *Streptococcus thermophilus* adicionados de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium longum*: isolamento**

diferencial dos microrganismos, multiplicação em diferentes condições e efeitos nas características sensoriais dos leites fermentados naturais ou modificados. 2003. 182 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

APÊNDICE A
Artigo submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz

Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho

Influence of the production procedures in the physico-chemical, sensory and microbiological characteristics of coalho cheese

Maria Cristina Delgado da SILVA^{1*}, Alécia Cristinne Santos RAMOS¹, Izildinha MORENO², Juliana de Oliveira MORAES¹

*Endereço para correspondência: Condomínio Aldebaran Omega, quadra F, lote 12, Tabuleiro dos Martins, CEP: 57080-900, Maceió-AL,

E-mail: mcdelgadosilva@gmail.com

¹ Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas. Av. Durval Melo Mota, S/N- Campus Universitário, BR 104, Km 97. Tabuleiro do Martins, CEP 57072-970.
Fone/Fax: 82-32141160

² Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Centro de P&D de Laticínios-TECNOLAT, Laboratório de Microbiologia. Av. Brasil, 2880, Caixa Postal 139, Jardim Brasil, Campinas-SP. CEP: 13070-178. Fone: 19-37431861.

RESUMO

Buscando caracterizar físico-química, sensorial e microbiologicamente queijo de coalho preparado com leite cru e leite pasteurizado, desenvolveu-se este projeto. Visitas periódicas foram realizadas a três laticínios do sertão de Alagoas para elaboração do fluxograma de processamento do queijo coalho e coleta de amostras para realização de análises microbiológicas (coliformes a 30°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.), físico-químicas (pH, acidez, gordura, cinzas, umidade, proteína total e cloretos) e sensoriais (aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor). As análises sensoriais indicaram discrepâncias entre as amostras dos três laticínios, provavelmente devido aos distintos procedimentos de processamento observados principalmente em relação às etapas de salga, pasteurização e aquecimento da massa. As análises físico-químicas indicaram serem os queijos de média a alta umidade e com baixo teor de gordura. As condições higiênico-sanitárias do produto final quanto à contagem de *E. coli* e *S. aureus* foram consideradas insatisfatórias, apesar da ausência de *Salmonella* sp e *L. monocytogenes*. Os dados sugerem a necessidade de padronização no processo de fabricação do queijo coalho, implantação de programas de boas práticas de fabricação, além de, um monitoramento constante pelos órgãos fiscalizadores para garantir produtos de melhor qualidade para o consumidor.

Palavras-chave. queijo coalho, características físico-químicas, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

This project was developed aiming to establish physico-chemical, sensory and microbiological characteristics of “coalho” cheese (rennet coagulated cheese) prepared from raw milk and pasteurized milk. Three processing plants were periodically visited in order to establish the coalho cheese preparation flow chart, and to collect samples for microbiological (coliforms at 35°C, thermotolerant coliforms, yeasts and molds, generic *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp.), physico-chemical (pH, titratable acidity, fat, ashes, moisture, total protein and chlorides) and sensorial (appearance, odor, texture / mouth feel and taste). Sensorial analysis indicated that the cheeses from the three plants had different characteristics, probably derived from the different processing conditions observed during salting, pasteurization and heating of the curd. Physico-chemical analysis showed that the cheeses have medium to high moisture content and low fat. The sanitary and hygienic conditions of the final product were considered inadequate considering *E. coli* and *S. aureus* countings, although no *Salmonella* or *L. monocytogenes* were detected. These data imply in the necessidade manufacturing padronization of coalho cheese, implementation of good manufacturing practices and a continuous monitoring by the sanitary surveillance to guarantee improved of products quality for consumers.

Key words. coalho cheese, characteristics physico-chemical, microbiology quality.

INTRODUÇÃO

O queijo de coalho é um queijo tipicamente brasileiro e bastante difundido na região nordeste do Brasil. Trata-se de um produto de grande valor comercial, devido principalmente a simplicidade da tecnologia de fabricação e elevado rendimento do processo. Sua produção, principalmente por pequenos e médios laticínios e propriedades do segmento da agricultura familiar, tem contribuído para o crescimento sócio-econômico desta região^{1,2}. Sua importância pode ainda ser destacada pela crescente aceitabilidade deste queijo na região sudeste, principalmente Rio de Janeiro e São Paulo, onde o produto tem excelente mercado³.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho⁴ queijo de coalho é definido como o queijo que se obtém por coagulação do leite pasteurizado, ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase alcalina residual negativa, 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 também classificado como um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%. Deve apresentar ainda as seguintes características sensoriais: consistência semidura e elástica, textura compacta e macia, cor branco-amarelado uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido, lembrando massa coagulada, crosta fina e sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida e algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras⁴.

Ainda de acordo com esse Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho⁴, as características distintivas do processo de elaboração do queijo de

coalho são: a) coagulação em torno de 40 minutos, b) corte e mexedura da massa, c) remoção parcial do soro, d) aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semi-cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45° e 55°C), e) adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, f) prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10-12°C normalmente até 10 dias. Pode também ser elaborado a partir de massa crua (sem cozimento).

Atualmente, o estado de Alagoas dispõe de duas bacias leiteiras significativas. A primeira e maior delas, também conhecida como “Bacia Leiteira Tradicional”, situa-se na região do Agreste (compreende 5 municípios) e no Sertão Alagoano (compreende outros 13 municípios), tendo os municípios de Batalha e Major Izidoro como os maiores expoentes. A principal atividade do Arranjo Produtivo Local referente ao seguimento laticínios (APL-laticínio) é a produção de queijo de coalho, atingindo no ano de 2007 um total de 1985 toneladas⁵. O queijo de coalho produzido no sertão alagoano apresenta forte tradição e reconhecida procedência e, por isso, os produtores locais e as entidades governamentais e empresariais têm buscado o resgate da qualidade e identidade dos queijos do sertão alagoano⁵.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o fluxograma de processamento e avaliar comparativamente a composição físico-química e características sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho fabricado em três regiões do sertão de Alagoas. Além disso, determinar a influência da tecnologia de fabricação na identidade e qualidade do queijo de coalho. Os resultados contribuirão para incrementar a disponibilidade de dados científicos que possam contribuir com a definição de estratégias que levem a melhoria da qualidade do queijo de coalho.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de queijos

Foi analisado queijo de coalho processado em abril e maio de 2008 em três laticínios do sertão de Alagoas, denominados de A, B e C. Três peças de queijos recém-processados e provenientes de um mesmo lote foram acondicionadas sob refrigeração em caixas de isopor com gelo e transportados para o Laboratório de Controle e Qualidade de Alimentos da Universidade Federal de Alagoas para a realização das análises microbiológicas e físico-químicas^{6,7}. A análise sensorial foi realizada no Centro de Química e Nutrição Aplicada – CQNA, LAFISE, do Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Campinas-SP.

Fluxograma dos processamentos dos queijos

Foram realizadas visitas aos laticínios para acompanhamento dos processamentos dos queijos e levantamento das informações necessárias para a elaboração dos fluxogramas de procedimentos de fabricação de queijo de coalho adotados em cada um deles.

Determinação da composição físico-química dos queijos

O pH das amostras foi determinado segundo método de Pereira et al.⁸. As análises químicas foram determinadas de acordo com os métodos oficiais descritos em Instituto Adolfo Lutz⁷. A acidez titulável foi determinada por titulação com solução Dornic, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico, multiplicando o resultado obtido na titulação por 10. A gordura foi determinada pelo método de Gerber-van-Gulik e o teor de gordura no extrato seco total foi calculado pela fórmula: (a) GES = (proteína % / EST %) x 100. A umidade foi determinada pelo método de secagem das amostras até peso constante, em estufa à temperatura entre 105°C. A porcentagem de

cinzas na amostra seca (AS) foi determinada em mufla a 550°C. A AS foi convertida em amostra integral (AI) pela fórmula: (a) % Cinzas = (Cinzas AS % x RS%) / 100. O teor de cloreto de sódio foi determinado por volumetria. A porcentagem de proteína total na AS foi calculada multiplicando-se o teor de nitrogênio total (NT) pelo fator 6,38. O NT na AS foi determinado pelo método oficial de Kjeldahl. A AS foi convertida em AI pela fórmula (a): P % (AI) = (Proteína % AS x Resíduo Seco % RS) / 100.

Determinação da análise sensorial

A análise sensorial dessas amostras foi realizada por uma equipe de especialistas do ITAL e avaliada quanto à aparência, odor, textura/sensação na boca e sabor.

Determinação da qualidade microbiológicas dos queijos

As amostras coletadas foram submetidas às análises microbiológicas de contagem de coliformes a 30°C e coliformes termotolerantes pela técnica do Número Mais Provável (NMP), contagem de bolores e leveduras (UFC/g), contagem de *Staphylococcus aureus* (UFC/g) e pesquisa de *Escherichia coli* segundo metodologia preconizada por APHA (2004). A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo metodologia preconizada pela Instrução Normativa SDA 62⁹ e *Salmonella* sp segundo método BAM/FDA¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Procedimentos de fabricação dos queijos

Os fluxogramas de processamento dos queijos de coalho produzidos nos três laticínios avaliados estão apresentados nas Figuras 1, 2 e 3. O processamento do queijo A foi completamente distinto dos queijos B e C, estes dois foram bastante similares, diferindo apenas em relação à quantidade de sal adicionado que foi maior no queijo B, e o semi-cozimento da massa realizado no queijo C.

Figura 1- Fluxograma de processamento do queijo de coalho A

Figura 2- Fluxograma de processamento do queijo de coalho B

Figura 3- Fluxograma de processamento do queijo de coalho C

As principais diferenças verificadas entre os processamentos estão relacionadas com a utilização de leite cru (Laticínios B e C) ou pasteurizado a 62-65°C por 30 minutos e adicionado de cloreto de cálcio (Laticínio A), com a forma da salga, que foi realizada no queijo pronto (2% do peso do queijo) (Laticínio A) e na massa do queijo (500g de cloreto de sódio em 100 L de leite no queijo B e em 200 L de leite no queijo C). Somente no queijo do Laticínio C foi feita a etapa de semi-cozimento da massa por meio da adição de água a 66°C.

Foi constatado também que a matéria-prima utilizada no Laticínio B não foi submetida a filtração, resultando assim, em um produto com possibilidade de conter perigos físicos, e conseqüentemente, processado em condições higiênicas insatisfatórias. Com esses resultados pode-se constatar a falta de padronização no processo de fabricação do queijo de coalho, mesmo quando produzidos em uma mesma região, e como estas variações refletiram nas características sensoriais dos queijos, que foram naturalmente percebidas pelos consumidores.

De acordo com visitas realizadas nos distintos laticínios (A, B e C), pode-se constatar que estes são mini-usinas artesanais e que apesar de estarem em nível tecnológico inferior, têm disputado “competitivamente” no mercado local com alguns produtos de grandes laticínios. A tecnologia de fabricação do queijo de coalho artesanal nestes laticínios provém de tradições arraigadas, as quais fabricam seu produto isoladamente, utilizando processos artesanais com tecnologia simples, que se obtém por

coagulação do leite por meio do coalho, sem adição de bactérias lácticas selecionadas. Apenas o laticínio “A” pasteuriza a matéria-prima (leite cru) para produção do queijo de coalho, conforme recomenda a legislação vigente.

Análise sensorial dos queijos

Os resultados obtidos referentes à análise sensorial realizada nas três amostras de queijo de coalho produzidos no sertão de Alagoas estão apresentados na Tabela 2. Pode-se verificar que o queijo A apresentou características sensoriais diferenciadas, principalmente em relação ao odor e sabor. Isto pode ter ocorrido devido ao processo de pasteurização que o mesmo foi submetido (Figura 1), levando a destruição de grande parte da microbiota láctica natural do leite cru, o que pode influenciar negativamente no desenvolvimento das características sensoriais do queijo.

Já o queijo B foi considerado o mais salgado, devido provavelmente a salga intensa na massa, prática esta, que tem como objetivo evitar o estufamento precoce do queijo de coalho, devido à produção de gás por coliformes¹¹. Além disso, esta prática em queijo que utiliza fermento láctico pode retardar o crescimento deste fermento, inibindo assim a produção intensa de ácido¹².

Quanto ao queijo C, a textura foi considerada a característica mais diferenciada em relação aos demais queijos, apresentando-se como firme e borrachento, característica esta decorrente da adição de água quente que visa proporcionar o aquecimento da massa (Figura 3).

Tabela 2. Características sensoriais das amostras de queijo de coalho produzido no sertão alagoano.

Características	Queijo A	Queijo B	Queijo C
Aparência	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas	- Massa compacta - Coloração creme-claro - Olhaduras mal formadas - Espaços vazios	- Massa compacta - Coloração creme-amarelada - Poucas olhaduras bem-formadas
Odor	- Ácido e estranho	- Característico de queijo de coalho ácido	- Característico de queijo de coalho, suave amanteigado
Textura/sensação na boca	- Macio, levemente borrachento, forma fragmentos muito pequenos durante a mastigação	- Macio e grumoso	- Firme e borrachento, desfaz-se em pequenos fragmentos durante a mastigação
Sabor	-Levemente salgado e muito amargo, forte sabor estranho	- Característico de queijo de coalho, ácido, salgado e levemente amargo; livre de sabores estranhos	- Característico de queijo de coalho, levemente salgado e levemente amanteigado; livre de sabores estranhos

Benevides et al.¹³ ao avaliarem sensorialmente o queijo de coalho produzido com leite cru e com leite pasteurizado no estado do Ceará, observaram que o sabor e a textura foram melhor avaliados para o queijo produzido a partir de leite cru e a maciez para o queijo produzido com leite pasteurizado. Nassu et al.¹⁴, também constataram características sensoriais distintas entre 20 amostras de queijo de coalho comercializado em Fortaleza. Dentre as amostras estudadas, três produzidas com leite cru e quatro produzidas com leite pasteurizado apresentaram atributos considerados característicos para o queijo da região. Portanto, pode-se observar que são vários os fatores inerentes a cada processamento responsáveis pela diferenciação entre os queijos de coalho

produzidos em diversas regiões e a falta de padronização no processamento deste produto é um fato evidente.

Composição físico-química dos queijos

Na Tabela 3 são apresentados os resultados das análises físico-químicas realizadas nos queijos de coalho. Pode-se observar que o teor de umidade variou de 45,50% a 51,50%, podendo ser caracterizado como queijo de média (36% < umidade < 46%) a alta umidade (46% < umidade < 55%), conforme definido na Portaria nº146 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária¹⁵. Vale ressaltar, que a alta umidade encontrada no queijo de coalho “A” (51,50%), contribuirá para uma maior proliferação microbiana e conseqüentemente vida útil curta deste produto, já que o mesmo foi produzido a partir de leite cru e sem adição de fermento láctico (Tabela 3).

Este resultado concorda com os obtidos por Carvalho¹⁶ e Machado¹⁷, que classificaram o queijo de coalho produzido no Ceará, como de média umidade. Resultados divergentes foram relatados por Andrade Filho & Santos¹⁸, que encontraram teor de umidade variando de 56,5 a 88,5% em 15 amostras de queijo de coalho fabricados em Sergipe, caracterizando-os como queijos de muito alta umidade (umidade > 55%). Vieira et al.¹⁹ encontraram variações entre 23,2 a 58,0% para o teor de umidade em queijos de coalho comercializados no estado de Pernambuco. Já Silva et al.²⁰, encontraram valores médios de 40,28% no total de 11 amostras de queijo de coalho comercializados na cidade de Natal, RN.

Segundo a legislação em vigor⁴, o queijo de coalho pode ser definido como semi-gordo (25,0 a 44,9%), gordo (45,0 a 59,9%) ou extra gordo (mínimo de 60,0%), devendo apresentar um teor de gordura entre 35,0% e 60,0%.

Tabela 3. Valores médios da composição dos queijos de coalho processados em três laticínios do sertão alagoano (A, B e C).

Determinações	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Padrão*
Umidade* (g/100g)	51,50	45,50	45,80	36 - 54,9
Extrato seco total –EST (g/100g)				
Gordura* (g/100g)	17,75	26,25	24,50	35 - 60,0
Gordura no EST(g/100g EST)				
Cloretos (g/100g)	4,68	5,48	3,16	-
pH	7,33	6,23	5,99	-
Acidez (%)	0,43	0,44	0,34	-
Proteína (g/100g)	29,79	26,95	29,63	-
Cinzas (g/100g)	3,40	3,70	3,30	-

(*) = Padrão segundo BRASIL (2001): Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho.

(-) = não determinado

Os valores de gordura das amostras de queijo de coalho artesanal reportado neste trabalho variaram de 17,75 a 26,25%, sendo similar aos obtidos por Santos et al.²¹ que ao analisarem queijos de coalho produzidos no estado de Sergipe, encontraram valor médio de 24,4% de gordura, porém, inferior aos encontrados por Machado¹⁷, que constatou teor de 39,75% de gordura em amostras de queijos de coalho produzido no Ceará.

A legislação brasileira não estabelece padrões para os demais parâmetros físico-químicos avaliados nesta pesquisa, visto que, ainda não existe uma padronização no processo de produção e a maioria dos queijos de coalho são produzidos artesanalmente. Contudo, a análise de cloretos confirmou a característica sensorial do queijo “B” como o mais salgado (5,48%), pois como a adição de sal é realizada manualmente, não há uma uniformidade quanto à distribuição deste nas peças de queijos, levando a variações no teor de cloretos (Tabela 3). Resultados divergentes foram relatados por Nassu et al.²² que encontraram uma quantidade média de cloretos de 2,51% em amostras deste mesmo tipo de queijo, produzido no Rio Grande do Norte. Segundo Guinee & Fox²³, o teor de

cloreto de sódio em queijos varia de aproximadamente 0,7% para o Emmental a 6,0% para o Domiati.

Os valores de pH entre as amostras estudadas variaram de 5,99 a 7,33 (Tabela 3), constatando-se que os queijos são frescos, recém processados e não passaram por processo de cura. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho¹⁶ e Machado¹⁷. Já Sena et al.²⁴, encontraram um pH médio de 5,35 para as amostras de queijo de coalho produzidos em Recife, PE. O queijo “A” apresentou pH mais elevado (7,33), possivelmente em decorrência da presença de bolores e leveduras, os quais possuem a capacidade de metabolizar ácido láctico²⁵. À ocorrência de proteólise por enzimas produzidas por bactérias lácticas naturalmente presentes em queijos produzidos com leite cru, também é outro fator, que pode levar à produção de compostos alcalinos durante a quebra de proteínas, conforme relatos de outros pesquisadores¹².

A acidez titulável, expressa em percentual de ácido láctico, variou de 0,34 a 0,44 concordando com os valores encontrados por Andrade²⁶, que analisando amostras de queijo de coalho produzido no Ceará constatou valores médios de 0,42% para acidez e pH de 6,33. Já Carvalho¹⁶ detectou valor médio de acidez de 0,24%.

Com relação aos teores de proteína e cinzas encontrados nesta pesquisa (Tabela 3), os resultados divergem dos obtidos por Nassu et al.¹¹, que constataram valores médios de 24,26% para proteína e 4,41% para cinzas em amostras de queijo de coalho produzidos no Ceará.

Qualidade microbiológica dos queijos

Os alimentos podem conter uma ampla variedade e quantidade de microrganismos que podem interferir na vida útil ou causar doenças. Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa, ficou evidente a má qualidade higiênico-sanitária das

amostras de queijo de coalho produzidas no sertão de Alagoas. Todas apresentaram elevadas contagens de coliformes a 35°C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 4).

De acordo com a legislação vigente²⁷, o limite máximo permitido de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase* (+) é de 5×10^2 UFC/g e como pode-se observar na Tabela 4, as três amostras apresentaram contagens acima deste valor. Apesar do queijo “A” ter sido produzido a partir de leite pasteurizado, o mesmo ainda apresentou contagens elevadas dos indicadores de qualidade e segurança (Tabela 4).

A ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras analisadas, pode ser devido a presença da microbiota autóctone, mais especificamente as bactérias lácticas, que têm a capacidade de restringir o crescimento de microrganismos patogênicos por competição e ou produção de moléculas antagônicas, conforme relatados por vários pesquisadores^{16,28}. No entanto, a quantidade e/ou o tipo de metabólito antimicrobiano produzido por bactérias lácticas nessas amostras pode não ter sido suficiente para o controle de *Staphylococcus aureus* que geralmente encontra-se em grande número.

Tabela 4 - Avaliação microbiológica de amostras de queijo de coalho processados em três laticínios do sertão alagoano (A, B e C).

Análises	Queijo A	Queijo B	Queijo C	Padrão *
Coliformes a 35°C (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	-
Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
<i>Escherichia coli</i> (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$
Bolores e leveduras (UFC/g)	$3,8 \times 10^4$	$4,6 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4$	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	$2,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^4$	$5,0 \times 10^2$
<i>Salmonella</i> sp.	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência

(*) Padrão RDC n°12²⁷: Dispõe sobre padrões microbiológicos sanitários para alimentos. (-) = não determinado

Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram constatados por Benevides & Telles²⁹ em 40(80,6%) amostras de queijos de coalho produzidos na cidade de Fortaleza-CE, com valores de coliformes termotolerantes acima do padrão microbiológico permitido pela legislação brasileira²⁷. Bruno et al.³⁰ também analisaram amostras de queijo de coalho produzidos a partir de leite cru e a partir de leite pasteurizado (4 unidades de cada) e detectaram que todas as amostras apresentaram *Escherichia coli*, sendo que, nas amostras produzidas com leite cru foi também detectada a presença de *Salmonella* sp. No entanto, em três das amostras produzidas com leite cru e em uma produzida com leite pasteurizado, apresentaram também contagens elevadas de estafilococos coagulase positiva, isto é, acima de 10^7 UFC/g. Resultados divergentes foram obtidos por Branco et al.³¹, quanto à presença de *Listeria monocytogenes*, em amostras de queijo de coalho detectadas em 19% das amostras analisadas.

CONCLUSÃO

- De forma geral, as etapas de processamento do queijo de coalho produzido no sertão de Alagoas pelos laticínios A, B, C foram similares, entretanto, as etapas referentes a salga, a pasteurização e o aquecimento da massa, foram aquelas que apresentaram particularidades entre as empresas, resultando, em produtos com características sensoriais diferenciadas.
- Na avaliação de parâmetros físico-químicos ficou evidente a falta de padronização no processamento do queijo de coalho e a não conformidade em relação ao teor de gordura recomendado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho. Este produto foi caracterizado como queijo de média a alta umidade e baixo teor de gordura.

- Na avaliação da qualidade higiênico-sanitária de amostras de queijo de coalho do sertão de Alagoas, constatou-se que as mesmas são indicativas de condições inadequadas de processamento. A ausência de *L. monocytogenes* e *Salmonella* sp pode ser atribuído a presença de metabólitos antimicrobianos produzidos por bactérias lácticas naturalmente presentes nessas amostras.

REFERÊNCIAS

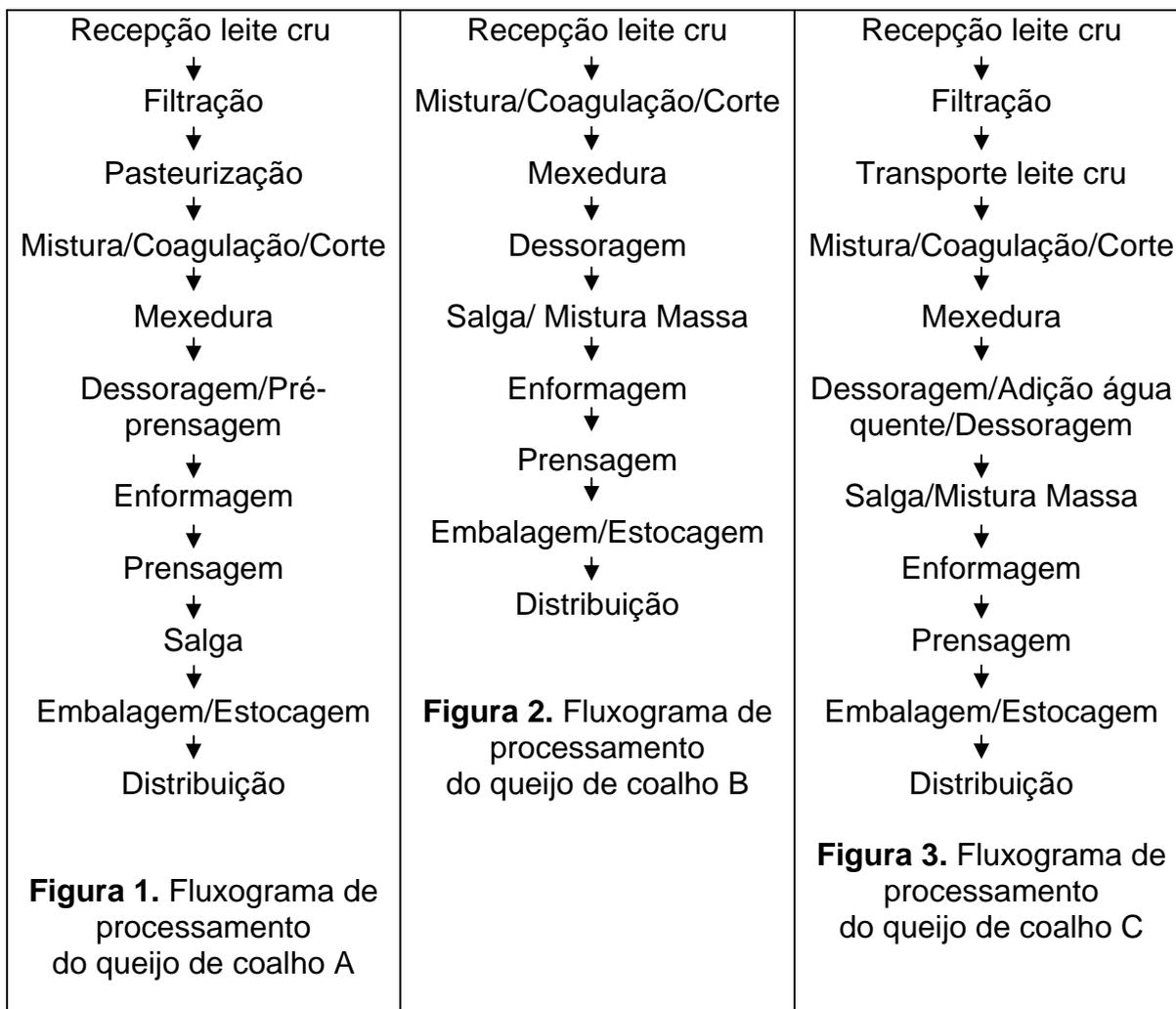
1. Cerri C. Artesãos do futuro. *Globo Rural* 2002; (200): 36-49.
2. Borges MF. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de queijo de coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. [Tese de Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas 2006.
3. Mandacaru. Queijo de coalho Mandacaru. Disponível em <<http://www.queijodecoalho.com.br>, acesso em: 28/03/2009.
4. Brasil. Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001 do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga.. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 jul 2001. Seção I, p.13-5.
5. Sebrae/AL. APL- laticínios sertão (T3-ano 2007). Maceió: Instituto Compasso 2008.
6. Apha, 2004. Standard methods for the microbiological examination of dairy products. 17th ed. American Public Health Association Washington, D.C.

7. Brasil. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 2005.
8. Pereira DBC, Silva PHF, Costa Júnior LCG, Oliveira LL. Físico-química do leite e derivados. Métodos analíticos. 2nd ed. Juiz de fora, MG: EPAMIG 2001. 234p.
9. Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 2003. 18 agost . Seção I, p 14.
10. Andrews WH, Hammack TS. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual Online. Chapter 5, updated june 2006.
11. Nassu RT, Araújo R dos S, Borges MDEF, Lima JR, Macêdo BA, Lima MHP, Bastos MDOSR. Diagnóstico das condições de processamento de produtos regionais derivados do leite no Estado do Ceará. Boletim de pesquisa e desenvolvimento Embrapa Agroindústria Tropical 2001; 1; 28.
12. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. Fundamentals of cheese science. Gaithersburg: Aspen Publishers 2000; cap. 5: 54-97.
13. Benevides SD, Telles FJS, Guimarães ACL, Rodrigues MCP. Estudo bioquímico e sensorial do queijo de coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos- B. CEPPA 2000; 18 (2): 193-206.

14. Nassu RT, Silva MAAP da, Viotto WH. Variações sensoriais em queijo de coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. In: Congresso Brasileiro de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, 2004, Recife. Anais .Recife: SBCTA 2004.
15. Brasil. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.
16. Carvalho JDG. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas [Tese de doutorado]. Fortaleza, Ceará: Universidade Federal do Ceará, 2007. 154 pp.
17. Machado TF. Incidência de patógenos e caracterização físico-química do queijo de coalho artesanal e industrial. In: Symposium on Food Safety – IAFP América Latina 2008. Anais: 30-31. São Paulo: ABRAPA 2008.
18. Andrade Filho JB, Santos MNG. Avaliação microbiológica e físico-química de queijos artesanais tipo coalho comercializados no estado de Sergipe. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 1998, Rio de Janeiro. Livro de Resumos. Rio de Janeiro: Comissão Organizadora do XVI CBCTA 1998. p. 125-8.
19. Vieira, MLM, Vaz APL, Faro ZP. Avaliação de laudos analíticos de queijo tipo coalho, á luz das Legislações Federal e Estadual de Pernambuco. Revista Higiene Alimentar 2003; 17(109): 19-23.
20. Silva AEA, Santos NN, Seabra LMJ, Damasceno KSFSC. Quantificação de lipídios, cinzas e umidade de queijos tipo manteiga e coalho comercializados na cidade de Natal, RN. Revista Higiene Alimentar 2006; 20 (145): 101-4.

21. Santos JS, Jalali VRR, Castro AA, Silva GF, Santana MM, Santos RD, Silva IM. Avaliação da qualidade físico-química dos queijos artesanais produzidos no estado de Sergipe. *Revista Higiene Alimentar* 2006; 21 (150): 314.
22. Nassu RT, Andrade AA, Silva GJF, Fernandes RLA. Caracterização físico-química de queijos regionais produzidos no estado do Rio Grande do Norte. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 2006; 61 (351): 303-5.
23. Guinee TP, Fox PF. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspects. In: Fox PF, McSweeney PLH, Cogan TM, Guinee TP. *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3^aed. Amsterdam: Elsevier Academic Press 2004.
24. Sena MJ, Cerqueira MMOP, Morais CFA, Correa ES, Souza MR. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife, PE. *Revista Higiene Alimentar* 2000; 14 (74): 41-4.
25. Beresford T, Williams A. The microbiology of cheese ripening. In: Fox PF, McSweeney OLH, Cogan TM, Gueene TP. *Cheese chemistry, physics and microbiology*, 3^a ed, Amsterdam: Elsevier Academic Press 2004. v. 1, General Aspects: 287-317.
26. Andrade, A. A. Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no Ceará. 2006. Dissertação (Mestrado). Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
27. Brasil, Resolução-RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe Sobre Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF. 10 jan.2001. Seção 1, nº 7 -E, p.1415-53.

28. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brighwell G, Tagg JR. Isolation of lactic bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organism associated with fresh meat. *Food Microbiology* 2008; 25: 392-9.
29. Benevides SD, Telles FJS. Características microbiológicas, de armazenamento e de embalagens de queijos tipo “coalho” comercializados na cidade de Fortaleza, CE. *Revista Higiene Alimentar* 2002; 16 (95): 44-7.
30. Bruno LM, Feitosa T, Nassu RT, Carvalho JDG, Andrade AA. Avaliação microbiológica de queijos de coalho artesanais e industrializados comercializados em Fortaleza, CE. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 2005; 60 (345): 217-20.
31. Branco MAAC, Figueiredo EAT, Borges MF; Silva MCD, Destro MT. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos- B. CEPPA* 2003; 21 (2): 209-430.



ANEXOS

ANEXO 1- Métodos físico-químicos

Determinação de gordura utilizando butirômetro especial (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se 3g da amostra em copo de butirômetro e em seguida adicionou-se 5 ml de água a 30-40°C e 10 ml de ácido sulfúrico lentamente. Depois adicionou-se 1 ml de álcool isoamílico e água morna até completar o volume do tubo. A seguir arrolhou o butirômetro, pesou em temperatura ambiente e agitou. O tubo foi invertido e colocado em banho-maria a 63°C por 15 minutos. Verificou-se se não restaram partículas sólidas e centrifugou a (1200±100) rpm, durante 15 minutos. Leu-se a porcentagem de gordura diretamente na escala do butirômetro. Repetiu-se as operações de aquecimento e centrifugação, quando necessário.

Determinação do pH (Pereira *et al.*, 2001)

Método de análise

Pesou-se 10g da amostra em um béquer de 100ml. Acrescentou-se 10ml de água destilada e misturou a amostra com o bastão de vidro até formar uma pasta homogênea. Adicionou-se 30 ml de água destilada, misturou e deixou descansar por 5 minutos. Filtrou-se a mistura, através de algodão hidrófilo, para um erlenmeyer de 250 ml. Em seguida, rinsou o algodão em 10 ml de água destilada, esgotou o mesmo com bastão de vidro e mergulhou o bulbo do eletrodo de medição na solução de análise, acionando o botão do pHmetro e realização da leitura após estabilização.

Determinação de acidez em ácido láctico (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se aproximadamente 10g da amostra e transferiu-se para um balão volumétrico de 100ml com álcool a 95%. Completou-se o volume e deixou em repouso por 6 horas. Filtrou e adicionou-se 5 gotas da solução de fenoftaleína para titular com solução Dornic, até aparecimento da coloração rósea. Em seguida realizou-se o cálculo conforme descrito abaixo:

Cálculo

$V \times 10 =$ ácido láctico por cento m/m

$V =$ n° de ml de solução Dornic gasto na titulação

Determinação da umidade- Secagem direta em estufa a 105°C (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se em cápsula de porcelana previamente aquecida em estufa a 105°C por uma hora, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e tarada, cerca de 5g de amostra integral pulverizada. Aqueceu em estufa a temperatura de 105°C por 4 a 5 horas e em seguida resfriou em dessecador e pesou. Repetiu esta operação de aquecimento e resfriamento até peso constante, isto é, quando duas pesadas consecutivas não causaram mudanças de peso. Anotou então todos os pesos.

Cálculo

$\frac{100 \times N}{P}$ = umidade ou substâncias voláteis a 105°C por cento m/m

P

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

P= n° de gramas da amostra

Determinação de cloretos por volumetria (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se 5g da amostra em uma cápsula de porcelana. Carbonizou em chapa elétrica e em seguida incinerou em mufla a 550°C e resfriou. Adicionou-se 30 ml de água quente, agitou com bastão de vidro e transferiu a solução com auxílio de um funil para um balão volumétrico de 100ml . Lavou a cápsula, o bastão de vidro e o funil com mais duas porções de 30ml de água quente. Transferiu a solução e as águas de lavagem para o balão volumétrico. Em seguida, resfriou, completou o volume do balão e agitou. Filtrou quando necessário. A seguir, transferiu-se, com auxílio de uma pipeta, uma alíquota de 10ml para um frasco de Erlenmeyer de 125ml. Adicionouse 2 gotas de solução de cromato de potássio a 10%, como indicador. Titulou com solução de nitrato de prata 0,1M, até o aparecimento de uma coloração vermelho-tijolo.

OBS: Caso o pH da solução estivesse ácido, faria a neutralização com solução de hidróxido de sódio 0,1M, de bicarbonato de sódio ou carbonato de cálcio, até pH entre 6,5 e 9,0. Quando foi usado o bicarbonato de sódio ou carbonato de sódio, aqueceu-se a solução em banho-maria até não haver mais desprendimento de dióxido de carbono, antes de completar o volume do balão. Nos produtos com quantidades maiores de cloretos, após obtenção das cinzas e sua dissolução, conforme a técnica descrita anteriormente, transferiu-se para um balão volumétrico de 200 ou 500ml, lavando a cápsula e o funil com água e completando o volume. Depois transferiu-se, com auxílio de uma pipeta, 10ml da

solução para um frasco erlenmeyer de 125ml e continuou seguindo as indicações da técnica. Em seguida realizou-se os cálculos descritos abaixo:

Cálculo

$$\frac{V \times f \times 0,584}{P} = \text{cloretos, em cloreto de sódio, por cento m/m}$$

V= nº de ml da solução de nitrato de prata 0,1M gasto na titulação

f= fator da solução de nitrato de prata 0,1M

P= nº de g da amostra na alíquota utilizada para a titulação

OBS.: Se % de cinzas for até 5%- utilizar balão de 100ml

Se % de cinzas for até 15%- utilizar balão de 250ml

Se % de cinzas for maior que 60%- utilizar balão de 500ml

Determinação de cinzas (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se cerca de 3g da amostra em cadinho de porcelana previamente incinerado em mufla à 550°C e tarado. Carbonizou em bico de gás ou chapa elétrica até que deixasse de exalar vapores e ficasse na forma de carvão. Incinerou em mufla a 550°C até obter cinzas claras, cerca de quatro horas. Desligou a mufla e esperou que a temperatura atingisse aproximadamente 100°C, retirou o cadinho e colocou-o em dessecador até atingir a temperatura ambiente, cerca de 30 minutos. Pesou em seguida e realizou os cálculos descritos abaixo:

Cálculo

$$\% \text{ Cinzas na AS} = \frac{100 \times N}{P}$$

$$\% \text{ Cinzas na AI} = \frac{\% \text{Cinzas AS} \times \% \text{RS}}{100}$$

AS= Amostra seca

N= peso das cinzas em grama

P= peso da amostra em gramas

RS= resíduo seco

Determinação de proteína (BRASIL, 2005)

Método de análise

Pesou-se em papel isento de nitrogênio cerca de 0,2g da mostra, 1,5g da mistura catalisadora. Transferiu para um tubo de digestão e adicionou 5,0ml de ácido sulfúrico concentrado. Colocou o tubo no digestor e aqueceu até que seu conteúdo não apresentasse mais resíduos carbonizados e não houvesse liberação de fumaça. O tempo de digestão varia com o equipamento usado.

Após a digestão, resfriou entre 15 a 30 minutos ao ambiente e completou o resfriamento em água corrente. Juntou-se vagarosamente 15ml de água, lavando cuidadosamente as paredes do tubo. Antes de iniciar a destilação, transferiu-se 10ml de ácido bórico 2% e 4 gotas de solução indicadora para erlenmeyer de 250ml e adaptou o conjunto ao aparelho de destilação para receber amônia (mergulhou a ponta do condensador na solução). Acoplou o tubo anteriormente preparado ao aparelho de destilação e adicionou 15ml de hidróxido de sódio a 40%, através do funil do aparelho. Observou o fluxo de água de refrigeração e ligou o destilador. Para finalizar deixou em ebulição até dobrar de volume e, com papel indicador, verificou o pH do destilador para indicar presença ou ausência de amônia. O ácido bórico muda a cor para verde à medida que se forma borato de amônia. Retirou o erlenmeyer lavando a ponta do condensador e desligou o destilador.

Colocou ácido clorídrico 0,02N em bureta de 25ml e titulou amônia fixada no ácido bórico até viragem do indicador. Anotou o volume de ácido clorídrico gasto na titulação e realizou o cálculo. Fez-se teste em branco para eliminar a interferência de contaminantes dos reagentes.

Cálculo

$$\text{Nitrogênio\% (Amostra Seca)} = \frac{(V_a - V_b) \times N \times f \times 14 \times 100}{\text{Peso em miligramas}}$$

Peso em miligramas

$$\text{Proteína\% (Amostra Seca)} = \% \text{Nitrogênio} \times \% \text{Fator de Conversão}$$

V_a=volume de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra

V_b=volume de ácido clorídrico gasto na titulação do branco

N=normalidade do HCl

f=Fator de correção do HCl

14=miligramas de nitrogênio ou 1mEq de nitrogênio

100=porcentagem

Fórmula para conversão da amostra seca em amostra integral:

$$P\%(AI) = \frac{\%Proteína(AS) \times \%Resíduo Seco (RS)}{100}$$

100

OBS.

Mistura Catalisadora- K_2SO_4 (Sulfato de Potássio)= 96 g $CuSO_4$ (Sulfato de Cobre)= 4,0g

- Indicador Misto para Titulação Amoniacais:

Preparação:

0,1g de Verde de Bromocresol e 0,02 de Vermelho de Metila, dissolvidos em 100ml de Etanol Absoluto para análise.

Preparação 20ml:

0,02g de Verde de Bromocresol e 0,0004 de Vermelho de Metila, dissolvidos em 20ml de Etanol Absoluto para análise.

ANEXO 2- Métodos Microbiológicos

Contagem Total de Bolores e Leveduras (APHA, 2004)

Método de análise

a) Preparação da amostra e diluições seriadas - Pesou-se 25g da amostra em saco de Stomacher e adicionou-se 225ml de solução de citrato de sódio 2%. Colocou-se para homogeneizar por 2 minutos em Stomacher. Após homogeneizado, transferiu-se 1 ml da amostra para tubos contendo 9ml de água peptonada 0,1% para preparar as diluições de 10^{-2} a 10^{-9} . No queijo produzido com leite pasteurizado utilizou-se as diluições 10^{-1} a 10^{-5} e nos queijos produzidos com leite cru utilizou-se as diluições 10^{-5} a 10^{-9} .

b) Inoculação – Inoculou-se 0,1ml de cada diluição em placas previamente preparadas e secadas de Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) (plaqueamento em superfície). Espalhou o inóculo com uma alça de Drigalski, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido.

Obs: Antes do uso, estocou as placas de DRBC em geladeira, protegidas contra a luz, para evitar a fotodegradação do rosa de bengala, com formação de compostos inibidores para bolores e leveduras.

c) Incubação - Incubou-se a 25°C por cinco dias, sem inverter, em pilhas de não mais de três placas, no escuro. Recomenda-se não contar as colônias antes de cinco dias, porque a movimentação das placas pode resultar em crescimento secundário (devido ao deslocamento de esporos), invalidando a contagem final.

d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados - Para a contagem das colônias e cálculo dos resultados, selecionou-se as placas com contagens entre 15 a 150 colônias e realizou-se a contagem em um contador de colônias. Das placas selecionadas, contou-se separadamente as colônias com aspecto filamentoso, cotonoso ou pulverulento, características de bolores, anotando o resultado. Na mesma placa, contou as demais colônias de leveduras.

Para calcular o n° de UFC/g de bolores, multiplicou-se o n° de colônias típicas de bolores por 10 e pelo inverso da diluição. Para calcular o n° de UFC/g de leveduras, multiplicou-se o n° de colônias confirmadas como leveduras por 10 e pelo inverso da diluição. Para calcular o n° total de bolores e leveduras, somou-se o n° de colônias de bolores e o n° de colônias confirmadas de leveduras e multiplicou por 10 e pelo inverso da diluição.

Exemplo:

- Diluição 10^{-2} (inoculados 0,1ml)
- Total de colônias típicas de bolores na placa=30
- Colônias presuntivas de leveduras na placa= 40, cinco submetidas à confirmação, quatro confirmadas (80%)
- Total de colônias de leveduras na placa= $40 \times 0,8=32$
- UFC/g de bolores= $30 \times 10^2 \times 10= 3,0 \times 10^4$
- UFC/g de leveduras= $32 \times 10^2 \times 10= 3,2 \times 10^4$
- UFC/g de bolores e leveduras= $(30+32) \times 10^2 \times 10= 6,2 \times 10^4$

Contagem de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*
(APHA, 2004)

Método de análise

a) Preparação da amostra e diluições seriadas- Pesou-se 25g da amostra em saco de Stomacher e adicionou-se 225ml de solução de citrato de sódio 2%. Colocou-se para homogeneizar por 2 minutos em Stomacher. Após homogeneização, transferiu-se 1ml da amostra para tubos contendo 9ml de água peptonada 0,1% para preparar as diluições 10^{-2} e 10^{-3} .

b) Inoculação (teste presuntivo)- Inoculou-se uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Tryptose (LST) por diluição, adicionando 1ml da diluição por tubo com 7 ml de LST.

c) Incubação- Incubou-se os tubos de LST a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$ e foi observado se houve crescimento com produção de gás. Em caso positivo, passou-se para os itens subseqüentes. Em caso negativo, reincubou-se os tubos por até 48h e repetiu-se a leitura, passando para os itens subseqüentes em caso de crescimento com produção de gás.

d) Contagem de coliformes totais- A partir dos tubos de LST com turbidez e produção de gás, transferiu-se uma alçada de cada cultura para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB). Incubou-se a $35^{\circ}\text{C}/24-48\text{h}$. O crescimento (turbidez) e produção de gás foi confirmativo da presença de coliformes totais. Anotou-se o número de tubos de VB confirmativos da presença de coliformes totais e determinou-se o Número Mais Provável (NMP)/g usando a tabela de NMP para alimentos.

e) Contagem de *E. coli*- De cada tubo de LST com crescimento e produção de gás, inoculou-se uma alçada em tubos contendo caldo LST-MUG, os quais foram incubados a $45^{\circ}\text{C}/24\text{h}$. Anotou-se o número de tubos de LST-MUG positivos (com turbidez e produção

de gás), confirmativos da presença de coliformes termotolerantes e determinou-se o Número Mais Provável (NMP)/g usando a tabela de NMP para alimentos. Utilizando uma lâmpada de luz ultravioleta (6W), confirmou-se a presença de *E. coli* através da fluorescência produzida por essas cepas.

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* (APHA, 2004)

Método de análise

a) Preparação da amostra e diluições seriadas- Pesou-se 25g da amostra em saco de Stomacher e adicionou-se 225ml de solução de citrato de sódio 2%. Colocou-se para homogeneizar por 2 minutos em Stomacher e após homogeneização, transferiu-se 1 ml da amostra para tubos contendo 9ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-2}). A partir daí preparou-se as demais diluições até 10^{-9} . Para o queijo produzido com leite pasteurizado utilizou-se diluições 10^{-1} a 10^{-5} .

b) Inoculação- Inoculou-se 0,1 ml da amostra, na superfície de cada placa de Agar Baird-Parker (BP), previamente preparadas e secadas. Espalhou-se o inóculo com uma alça de Drigalski e esperou que todo o excesso de líquido fosse absorvido para incubação.

c) Incubação e contagem das colônias presuntivas- As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C}/48\text{h}$. Em seguida selecionou-se as placas com 20 a 200 colônias e realizou-se a contagem das colônias típicas de *S. aureus*, que são circulares, pretas ou cinzas escuras, com 2-3mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.

d) Confirmação das colônias típicas- Selecionou-se no mínimo 5 colônias típicas para realizar o teste de coagulase. Transferiu-se cada colônia para tubos contendo caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubou-se em estufa a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 18-24h.

d.1) Teste de coagulase- Transferiu-se 0,2 mL do BHI para tubos de $10\times 100\text{mm}$ estéril e adicionou-se 0,5mL de coagulase plasma com EDTA (plasma de coelho com EDTA). A mistura foi realizada com movimentos de rotação, sem agitar os tubos. Incubou-se os tubos a $35^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ e observou-se periodicamente, durante 4 horas, quanto à formação de coágulo. Somente com coágulo firme que não se rompe quando o tubo é inclinado ou invertido foi considerado positivo para *S. aureus*. Coágulo parcial deve ser analisado por testes adicionais, como catalase e termonuclease. Como todos os coágulos foram firmes, estes testes não foram realizados.

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2003)

Método de análise

a) Preparação da amostra e enriquecimento primário- Pesou-se 25g da amostra em saco de Stomacher e adicionou 225ml de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB). Homogeneizou-se por 2 minutos em Stomacher e incubou-se a 30°C por 24 horas.

b) Enriquecimento secundário- Após o período de incubação, transferiu-se 0,1 mL da cultura para tubo contendo 10mL de caldo Fraser suplementando-o, com 0,1 mL do vial (suplemento Fraser) diluído conforme recomendação do fabricante. Incubou-se a 30°C por 24 a 48 horas

c) Plaqueamento seletivo diferencial- Utilizando alça de platina de 5 mm de diâmetro, repicou-se culturas do caldo Fraser para placas contendo Agar Oxford suplementado e placas contendo Agar Palcam suplementado conforme recomendação do fabricante. Em seguida incubou-se as placas a 30°C por 24 a 48 horas.

Nas amostras analisadas nesta pesquisa, não houve crescimento de colônias com características de *Listeria* (colônias pequenas com centro negro), portanto, não foram realizadas as provas bioquímicas subseqüentes que seriam mobilidade, catalase, coloração de Gram, hemólise e provas bioquímicas através do Kit API *Listeria*.

Pesquisa de *Salmonella* (BAM/FDA, 2006)

Método de análise

a) Preparação da amostra e pré-enriquecimento- Pesou-se 25g da amostra em saco de stomacher e adicionou-se 225ml de caldo lactosado. Homogeneizou-se por 1 minuto e em seguida incubou-se a 36°C por 24horas.

b) Enriquecimento seletivo- Pipetou-se alíquotas de 1 mL das amostras pré-enriquecidas para tubos contendo 10 mL de caldo tetracionato e para tubos contendo 10 mL de caldo selenito cistina. Em seguida incubou-se a 36°C por 24 horas.

c) Isolamento- A partir dos caldos seletivos de enriquecimento, semeou-se as amostras em placas contendo Agar HE, Agar XLD e Agar BS, incubando-as em estufa a 36°C por 18 a 24 horas.

d) Seleção- Selecionou-se 3 a 10 colônias suspeitas por amostra, conforme características descritas abaixo:

Em Ágar HE, as colônias apresentaram-se transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto.

Em Agar XLD, as colônias apresentaram-se cor de rosa escuro, com centro preto e uma zona avermelhada levemente transparente em redor

Em Ágar BS, apresentaram-se de cor castanha, cinza ou pretas, com ou sem brilho metálico.

e) Provas bioquímicas preliminares

e.1) Reações em ágar TSI – Inoculou-se através de picada profunda e estriamento na superfície inclinada. Incubou-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. A maioria das salmonelas apresenta no TSI as seguintes reações: ácido na base (fundo), o que torna o meio amarelo, com ou sem produção de gás. Alcalino ou inalterado na superfície, com produção de H_2S .

e.2) Teste descarboxilação da lisina- Utilizou-se agar LIA. Inoculou-se através de picada profunda, estriando na superfície inclinada. Incubou-se os tubos a 36°C por 24 a 30 horas. Observou-se a ocorrência da descarboxilação da lisina pela alcalinização do meio, o que é demonstrado pela não alteração de cor do indicador presente.

ANEXO 3- Métodos de Seleção Tecnológica

Aceitação organoléptica em leite

Leite integral líquido foi pasteurizado á 65°C por 30 minutos. Em cada tubo contendo 5ml de leite, inoculou-se 0,2 ml da cultura (2% do inóculo) e incubou-se em temperaturas ótimas até coagulação (tempo indeterminado). Depois refrigerou-se por 24 horas e avaliou-se os coágulos obtidos.

Capacidade de produção de ácido láctico

Foi utilizado leite desengordurado a 10% (Molico: baixo aquecimento e isento de substâncias inibidoras). O leite foi esterilizado a $120\pm 1^\circ\text{C}$ por 5 minutos (LDE 10%). As BAL foram ativadas em LDE 10%, no mínimo, 2 vezes consecutivas para que as culturas alcancem sua atividade metabólica máxima. Antes dos repiques, estas foram misturadas vigorosamente por meio de inversões dos frascos fechados para permitir adequada homogeneização. As alterações de pH do leite depois da inoculação e a intervalos regulares (6hs e 24hs) da incubação foram registradas.

Capacidade aromatizante (IDF, 149:1991)

À 1 mL do inóculo, foi adicionado 2 mL de água, 1 mL de tungstato de sódio 10% e 1 mL de ácido sulfúrico 0,33 mm/L. A mistura foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro grau whatman n°54. Foram misturadas porções de 0,4 mL do filtrato e 4,6 mL de água com 1,0 mL de creatina 0,5% e 1 mL de α -naftol re-destilado (preparado dissolvendo-se 0,5g de α -naftol em 10 mL de NaOH 2,5 mm/L). Após incubação a 23-26°C durante 1 h, a absorbância foi medida a 525 nm. A concentração foi calculada mediante uma curva padrão de diacetil grau reagente (ponto de aquecimento 88-91°C), elaborada para obtenção de concentrações de 2,5, 5, 10, 15, 20 e 25 mg/l. O mesmo leite sem a adição de diacetil foi utilizado para um branco.

Atividade proteolítica (ADLER-NISSEN, 1979; CLEGG *et al.*, 1982)

Este método fundamenta-se na leitura espectrofotométrica do cromóforo formado pela reação do TNBS com aminas primárias. A reação ocorre em meio ligeiramente alcalino e é interrompida pela diminuição do pH. A reação colorimétrica foi realizada

tomando-se 0,25mL de amostra, 2,0mL de solução tampão fosfato 0,2125M pH 8,2 e 2,0mL de solução TNBS a 0,1%. A mistura foi incubada em água a 50°C, ao abrigo da luz, durante 1 hora. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 4,0mL de HCl 0,1N (Synth.) e deixada em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos. A absorbância foi medida a 340nm contra o branco. A concentração de α -NH₂ foi calculada usando-se curva padrão de L-leucina feita a partir de uma solução contendo 30 μ moles/mL deste aminoácido.

A fração de nitrogênio solúvel em água foi preparada por homogeneização de 5 gramas de coágulos com 10 mL de água destilada durante 5 minutos, usando-se um Stomacher. A solução resultante foi mantida a 40°C durante 1 hora e centrifugada a 3.300 \times g durante 30 minutos a 4°C. Esta fração contendo a porção nitrogenada solúvel em água foi utilizada para determinação dos teores de aminoácidos livres totais.

ANEXO 4 – Métodos de Identificação Taxonômica

Capacidade de multiplicação a 10 e 45°C, em 6,5 e 18% NaCl e em pH 4,4 e 9,6

(HARRIGAN & McCANCE, 1998)

Foi utilizado tubos contendo 5 mL de caldo MRS adequado a cada teste e suplementado com $0,2\text{gL}^{-1}$ de púrpura de bromocresol. Aliquotas de 1% da suspensão celular foram inoculadas nos meios correspondentes e os tubos incubados nas condições do teste ou naquela descrita para cada grupo bacteriano durante 7 dias. O crescimento das culturas foi observado pela alteração da coloração do meio de cultivo.

Metabolismo da glicose (HARRIGAN & McCANCE, 1998)

O metabolismo fermentativo ou oxidativo da glicose foi determinado em caldo MRS com 5% de glicose, com a omissão de citrato de tri-amônio. Aliquotas de 1% da suspensão celular foram transferidas para tubos contendo 5mL de meio e tubos de Durham, que a seguir foram incubados na condição descrita para cada grupo bacteriano durante 7 dias. Após este período, a formação de gás no interior dos tubos de Durham indicava o metabolismo heterofermentativo, enquanto a ausência, o homofermentativo.

Capacidade de redução do nitrato (HARRIGAN & McCANCE, 1998)

A capacidade da cultura em reduzir o nitrato no meio a nitrito foi determinada em caldo nitrato peptona. Aliquotas de 1% da suspensão celular foram transferidas para tubos contendo 5mL e tubos de Durham, que a seguir foram incubados na condição descrita para cada grupo bacteriano durante 7 dias. Após este período, foi adicionado 1mL de cada um dos reagentes 1 e 2 de “Griess-Ilosvay’s”. A formação de coloração vermelha em alguns minutos indicou a presença de nitrato, enquanto o controle manteve-se inalterado. O resultado negativo foi confirmado adicionando-se uma porção de zinco em pó ao cultivo para reduzir o nitrato ainda presente.

Produção de CO₂ a partir do gluconato (HARRIGAN & McCANCE, 1998)

A capacidade da cultura em produzir CO₂ a partir do gluconato foi determinada em caldo MRS contendo gluconato (40gL⁻¹) no lugar da glicose. Alíquota de 1% da suspensão celular foi inoculada em 5mL de meio contido em tubos, incubando-os na temperatura descrita para cada grupo bacteriano durante 7 dias. Após este período, foi adicionado 1mL de reagente de “Benedict’s” a cada cultivo, que foi imediatamente submetido a tratamento em água fervente durante 10 minutos. A formação de um precipitado de coloração amarelo-marrom após o tratamento indicou a utilização do gluconato pelo microrganismo.