MAXIMILIANO SOARES PINTO

EFEITO DA MICROBIOTA ENDÓGENA E DA NISINA SOBRE *Listeria* sp. E *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae.*

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e Classificação da Biblioteca Central da UFV

T
P659e
2008

Pinto, Maximiliano Soares, 1973-
Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo minas artesanal do Serro \ Maximiliano Soares Pinto – Viçosa, MG, 2008.
xi, 71f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 60-71

1. Queijo-de-minas - Microbiologia. 2. Derivados do leite - Processamento. 3. Queijo-de-minas - Controle de - qualidade. 4. Queijarias – Serro (MG)
I. Universidade Federal de Viçosa. II.Título.

CDD 22.ed. 637.35

MAXIMILIANO SOARES PINTO

EFEITO DA MICROBIOTA ENDÓGENA E DA NISINA SOBRE *Listeria* sp. E *Staphylococcus aureus* EM QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae.*

Aprovada: 2 de setembro de 2008.

Prof[a] Maria Cristina Dantas Vanetti
(Co-orientadora)

Prof. Paulo Henrique Fonseca da Silva
(Co-orientador)

Prof. Fernando Antônio R. Magalhães

Prof. José Renaldi Feitosa Brito

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho
(Orientador)

“Você está prestes a ler e julgar mais uma tese de doutorado. Relaxe. Concentre-se. Afaste todos os outros pensamentos. Deixe que o mundo a sua volta se dissolva no indefinido. É melhor fechar a porta [...]. Escolha a posição mais cômoda: sentado, estendido, encolhido, deitado. Deitado de costas, de lado, de bruços. Numa poltrona, num sofá, numa cadeira de balanço [...]. Numa rede se tiver uma. Pode também ficar de cabeça para baixo, em posição de ioga. Com a tese virada, é claro.

Regule a luz para que ela não lhe canse a vista. Faça isso agora, porque, logo que mergulhar na leitura, não haverá meio de mover-se. Tome cuidado para que a página não fique na sombra, mas esteja atento para não receber uma luz demasiado forte que possa vir a interromper a leitura. Se você fuma, deixe os cigarros ao alcance da mão. O que falta ainda? Precisa fazer xixi? Bom, isso é com você.

Não que você espere algo de especial desta tese em particular, pois já aprendeu que o melhor que se pode esperar é evitar o pior. É essa a conclusão que chegou, tanto na vida privada como nas questões gerais e nos problemas do mundo [...]. Aí está: justamente por ter renunciado a tantas coisas, você acredita que seja certo conceder a si mesmo o prazer da expectativa num âmbito bastante circunscrito como este das teses, em que as coisas podem ir bem ou mal e que o risco da desilusão para quem apenas lê não é grave.”

Adaptado de Ítalo Calvino

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, eterna batalhadora, que me criou e me educou, pelo seu positivismo contagiante, pela presença constante em meus pensamentos, mesmo estando longe em toda a minha vida acadêmica.

Ao meu pai, pelo valioso apoio financeiro e pelo negativismo constante que me inspira.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso.

Ao professor Antônio Fernandes de Carvalho, pela amizade, oportunidade e confiança.

Ao presidente da Associação de Produtores de Queijo do Serro, Jorge Brandão Simões e aos produtores, Sanção e “Belengo”, pela disponibilidade e pelo imenso apoio durante a realização do experimento.

À Ana Clarissa, pela imensa contribuição durante todo o experimento e na elaboração da tese.

Aos professores Denise Sobral e Júnio Cesar Jacinto de Paula, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos professores Fernando Antônio Resplande Magalhães e Paulo Henrique Fonseca da Silva, pelo incentivo e pela ajuda durante todo o experimento.

Às bolsistas Ariana Aparecida Campos de Souza e Maria das Graças Cota Torres, pela ajuda na realização dos experimentos.

A professora Vanessa Aglaê Martins Teodoro, pela ajuda na elaboração dos artigos.

Aos professores Daniel Arantes Pereira e Gisela de Magalhães Machado, pela disponibilidade e ajuda na realização do experimento.

À professora Maria Cristina Dantas Vanetti, pela valiosa contribuição, pela disponibilidade e participação nas bancas de qualificação de defesa de tese.

Aos professores Nélio José de Andrade e José Renaldi Feitosa Brito, pela participação nas bancas de qualificação e defesa de tese respectivamente.

À Lílian Hass, pelo empenho e pela boa vontade.

A todos os autores citados neste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho da EPAMIG que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese.

À Emater, especialmente ao José Manoel Martins e Elmer Ferreira Luiz de Almeida, pelo apoio durante toda a pesquisa.

A todos os meus amigos distantes que contribuíram para o meu crescimento.

À EPAMIG, pela oportunidade concedida.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto.

Ao Paulo Afonso da Silva, pela amizade, pela paciência e pela grande ajuda na padronização e no encaminhamento final desta tese.

A todas as instituições parceiras do projeto.

A todos, minha eterna gratidão.

BIOGRAFIA

MAXIMILIANO SOARES PINTO, filho de Vilmar Pinto e Maria das Dores Soares Pinto, nasceu em 11 de novembro de 1973, em Santos-SP.

Em outubro de 2000, graduou-se em Ciência e Tecnologia de Laticínios, pela Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG.

De março 2001 a agosto de 2001, trabalhou no Laboratório de Culturas Láticas do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV, na área de Simbióticos.

De setembro de 2001 a julho de 2002, fez aperfeiçoamento profissional, pela FAPEMIG, em Atividade Antimicrobiana de Extratos Aquosos de Plantas Medicinais X *Clostridium difficile*, no Laboratório de Culturas Láticas do Bioagro, UFV, Viçosa-MG.

Em agosto de 2002, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, em nível de Mestrado, defendendo dissertação em 18 de fevereiro de 2004.

Em março de 2004, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFV, em nível de Doutorado, defendendo tese em 2 de setembro de 2008.

Em julho de 2005, ingressou na EPAMIG como professor e pesquisador em Leites Fermentados e Microbiologia de Alimentos.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Queijo Minas artesanal	3
2.2. Queijo Minas artesanal do Serro	7
2.2.1. Processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro	7
2.3. Fermento natural do queijo Minas artesanal	12
2.4. Queijos Minas artesanais e segurança alimentar	15
2.4.1. Listeria em queijos artesanais	19
2.5. Nisina	22
2.6. Características físico-químicas em queijos Minas artesanais	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Seleção das unidades produtoras	27
3.2. Análises do fermento natural e dos queijos	28
3.2.1. Análises físico-químicas	28
3.2.2. Análises microbiológicas	29

Página

3.3. Culturas de *S. aureus*, *L. innocua* e *L. monocytogenes* 29
3.4. Adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em leite desnatado reconstituído (LDR) esterilizado..... 29

3.4.1. Delineamento estatístico 30

3.5. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em queijo Minas artesanal 30

3.5.1. Delineamento estatístico 31

3.6. Efeito antagônico do fermento natural *in vitro* x *L. innocua* e *L. monocytogenes* 31

3.6.1. Delineamento estatístico 32

3.7. Efeito antagônico *in loco* da microbiota endógena do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua* 32

3.7.1. Delineamento estatístico 32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 33

4.1. Características físico-químicas do fermento natural e do queijo Minas artesanal do Serro produzido nas propriedades selecionadas 33
4.2. Características microbiológicas do fermento natural e do queijo Minas artesanal do Serro 35
4.3. Efeito antagônico *in vitro* do fermento natural do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua* e *L. monocytogenes* 37
4.4. Efeito antagônico *in loco* da microbiota endógena do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua* 41
4.5. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em LDR 12 % 44
4.6. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* no queijo Minas artesanal do Serro 46
4.7. Efeito da adição de nisina sobre as características mecânicas (TPA) do queijo Minas artesanal do Serro..... 54

6. CONCLUSÃO 58

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 60

RESUMO

PINTO, Maximiliano Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2008. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. Orientador: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-orientadores: Maria Cristina Dantas Vanetti e Paulo Henrique Fonseca da Silva

O queijo Minas artesanal tradicional é produzido, geralmente, a partir dos rebanhos leiteiros das montanhas, por pequenas queijarias em propriedades rurais de agricultura familiar situadas, principalmente em quatro regiões do Estado de Minas Gerais: Serra da Canastra, Serro, Cerrado e Araxá. Pelo fato de ser elaborado com leite cru, pode apresentar-se impróprios para consumo, uma vez que sua contaminação torna-se passível por microrganismos patogênicos. Estudos feitos em condições laboratoriais mostram o efeito inibitório de bactérias láticas sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcu*s *aureus*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antagônico das microbiotas endógenas do queijo Minas artesanal do Serro e do fermento natural, utilizado no processo de fabricação, sobre *Listeria innocua* durante 60 dias de maturação. Além disto, foi avaliado o efeito da adição de 100 e 500 $IU.mL^{-1}$ de nisina, adicionadas ao leite, sobre o comportamento de *S. aureus*, as características: mecânicas firmeza, fraturabilidade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e coesividade e físico-químicas: umidade, gordura, cloretos, pH, a_w, extensão e profundidade de maturação dos queijos Minas artesanais do Serro durante 60 dias de

maturação. O efeito antagônico da microbiota do leite e do fermento natural não foi suficiente para eliminar *L. innocua* do queijo Minas artesanal do Serro, após os 60 dias de maturação, nas três concentrações de bactéria utilizadas no presente trabalho. O comportamento de *L. innocua* ao longo da maturação foi similar, independentemente das concentrações iniciais utilizadas. Estes resultados evidenciam que a ausência de *Listeria* sp. em queijos Minas artesanais do Serro, relatada em diversos trabalhos científicos, pode estar relacionada com a ausência deste microrganismo no leite. A redução das populações de *S. aureus* foi proporcional às doses de nisina adicionadas. A nisina foi efetiva na redução da população entre a inoculação de *S. aureus* no leite até o momento da obtenção da massa. As duas doses de nisina testadas apresentaram efeito bactericida sobre *S. aureus* no período entre a inoculação do leite e a obtenção da massa. Os queijos tratados com 500 $IU.mL^{-1}$ de nisina apresentaram maiores teores de cloretos do que o grupo-controle e os tratados com 100 $IU.mL^{-1}$ de nisina. Os queijos tratados com nisina apresentaram menores índices de maturação quando comparados ao controle ao longo de 60 dias de maturação. Não houve diferença na umidade, na gordura, no pH e na a_w entre os tratamentos e o queijo-controle após 60 dias de maturação. Com relação ao perfil de textura dos queijos, não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos dos tratamentos com nisina e o controle, ao longo do tempo de maturação, quando analisados isoladamente em cada tempo específico para os parâmetros analisados, exceto com relação à elasticidade.

ABSTRACT

PINTO, Maximiliano Soares, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2008. **Effect of endogenous microbiota and nisin against Listeria sp. and Staphylococcus aureus in Traditional Minas cheese of Serro**. Adviser: Antônio Fernandes de Carvalho. Co-advisers: Maria Cristina Dantas Vanetti and Paulo Henrique Fonseca da Silva

Traditional Minas cheese is commonly produced by milk obtained from herds located in mountains. In addition, Traditional cheese is manufactured in small properties situated mainly in four regions of state of Minas Gerais: Serra da Canastra, Serro, Cerrado and Araxá. Because cheese is produced with raw milk, it can be impropriated for consumption, since it can contain pathogenic microorganisms. Studies carried out in laboratories show the inhibitory effect of lactic acid bacteria against *Listeria* sp. and *Staphylococcus aureus*. This work aimed to evaluate the antagonistic effect of endogenous bacteria and natural starter of Traditional Minas cheese against *Listeria innocua* during 60 days of ripening. Besides, it was also evaluated the effect of addition of 100 and 500 $IU.ml^{-1}$ of nisin, added to milk against the behavior of *S. aureus* and also its influence on fracturability, elasticity, gumminess, chewiness, cohesiveness and physicochemical characteristics (moisture, fat content, salt, pH, a_w, ripening extension and depth) of Traditional Minas cheese during 60 days of ripening. The antagonistic effect of endogenous microbiota and of natural stater it was not enough to eliminate *L. innocua* present in the cheese in three different

concentrations, along the ripening time. The behavior of *L. innocua* during the ripening was similar, independent of the initial concentration used in the present work. These results show that the absence of *Listeria* sp. In Traditional Minas cheese observed in many other studies probably is related to the absence of this bacteria in milk. The reduction of *S. aureus* was proportional to the nisin doses used. The nisin was effective in the reduction of population of *S. aureus* between the inoculation up to the obtaining of the mass. Both doses of nisin tested showed bactericidal effect against *S. aureus* during the period of milk inoculation until the process to obtain the mass. The cheese treated with 500 $IU.ml^{-1}$ of nisin showed higher salt levels in comparison with those treated with 100 $IU.ml^{-1}$ of nisin and the control samples. The cheeses treated with nisin showed lower levels of ripening. It was not observed diference ($p \geq 0.05$) in moisture, fat, pH and a_w between nisin treatements and the control samples after 60 days of ripening. Also, in relation to the texture profile, it was not observed difference ($p \geq 0.05$) between nisin cheese and control cheese samples, except for elasticity.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, os queijos artesanais têm sido objetos de pesquisa dada a sua importância econômica e social para as regiões onde são produzidos. A cadeia de queijos artesanais deve ser ressaltada em virtude de sua grande importância social no processo de manutenção do homem no campo, enfatizando que a existência destes produtos é conseqüência de seu ambiente histórico e cultural e estes devem ser preservados. No entanto, não existe tecnologia disponível para fabricação e comercialização de queijos elaborados a partir de leite cru, que garanta a segurança do consumidor. De fato, vários produtores tradicionais europeus substituíram o processo artesanal por um semi-artesanal, objetivando atingir qualidade microbiológica desejável. Além disto, se o queijo artesanal deve continuar a ser produzido em virtude de suas características sensoriais únicas, ele não pode continuar sendo comercializado antes de atingir, no mínimo, uma semana de maturação.

Não existem pesquisas conclusivas de que o queijo Minas artesanal, quando produzido sob condições preconizadas pela Lei Estadual nº 14.185, não apresenta risco para o consumidor. Resultados publicados até o momento mostram que o queijo apresenta altas contagens de *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva. No entanto, a ausência de enterotoxinas em queijos coletados diretamente nas unidades produtoras do Serro ainda não pode ser explicada. Outro fator a ser considerado é que esses queijos foram analisados sistematicamente em diversos trabalhos e não foram detectadas

bactérias do gênero *Listeria* sp. Evidências que corroboram estes dados são mostradas em alguns estudos feitos em condições laboratoriais, que evidenciaram o efeito inibitório de bactérias láticas sobre os gêneros *Staphylococcus* e *Listeria*.

A alta contagem de bactérias do grupo coliformes está associada às condições precárias de higiene e do processamento. Os altos números de *Staphylococcus* podem estar associados, além das razões anteriores, à manipulação inadequada e ao alto índice de mastite. A idéia de que controlando estes fatores seja possível a elaboração do queijo Minas artesanal com uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli*, que atendam à legislação vigente, não se mostra sustentável, uma vez que queijos de produtores cadastrados pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) apresentam altas contagens de *Staphylococcus*. Estudos evidenciam que países da Europa, onde o leite possui qualidade microbiológica superior daquela encontrada no Brasil, não conseguiram produzir queijos com contagens aceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positiva. O que tem sido feito nestes países é um controle de enterotoxinas estafilocócicas. Este procedimento não se sustenta, uma vez que, não há estudos que comprovem que a ausência de enterotoxinas no produto final não vai se estender por toda a vida de prateleira do queijo.

Com relação à *L. monocytogenes*, não se pode assegurar a sua ausência, uma vez que este microrganismo encontra-se disseminado no ambiente e a sua eliminação só pode ser certificada com a pasteurização. Além disto, não se sabe se a ausência de *L. monocytogenes* nos queijos se deve ao fato de este microrganismo não estar presente no leite destinado à fabricação ou se realmente foi inibido pela microbiota endógena do leite.

Diante desta conjuntura, este estudo teve como objetivo investigar o efeito antagônico de substâncias antimicrobianas naturais intrínsecas ou adicionadas ao processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro sobre *Listeria* sp. e *S. aureus*. Sendo assim, foi investigado o efeito antagônico das microbiotas endógenas do queijo do Serro e do fermento natural, utilizado no processo de fabricação, sobre *L. innocua*. Além disto, foi investigado o efeito da adição de nisina ao processo de fabricação sobre o comportamento de *S. aureus* e também sobre o perfil de textura e as características físico-químicas do queijo durante o tempo de maturação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Queijo Minas artesanal

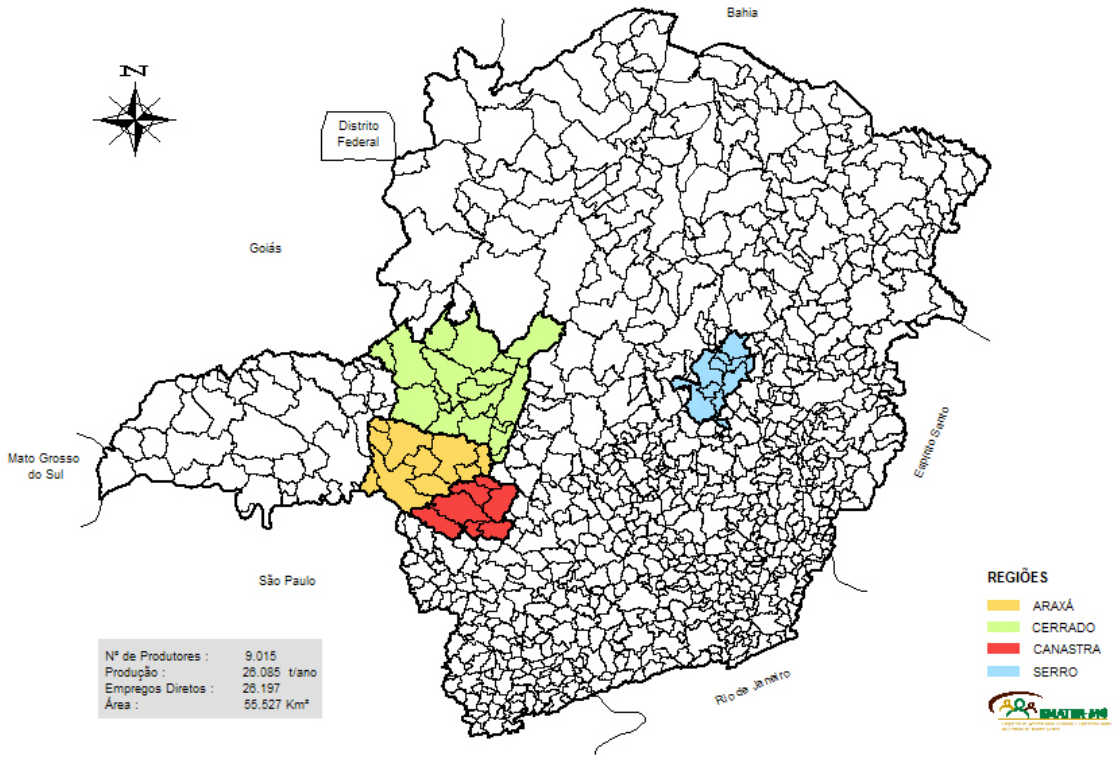
Os queijos artesanais são exemplos clássicos da manutenção da diversidade dos povos e de proteção dos seus costumes, suas tradições e seus valores, ocupando lugar de destaque na economia de diversos países europeus, como: França, Itália, Portugal e Espanha (FOX 1993; MOR-MUR *et al.*, 1994; PARENTE *et al*., 1997; MENENDEZ *et al*., 2001).

No Brasil, somente no fim da década de 1990 despertou-se o interesse de legalização destes queijos, impulsionado pelos índices representativos de vendas alcançadas com a comercialização informal destes produtos na economia mineira, com destaque para as regiões de Araxá, Serra da Canastra, Cerrado e Serro. Além disto, a informalidade vem ultrapassando as fronteiras do Estado e o que se torna mais agravante é a colocação no mercado de queijos com segurança alimentar comprometida, uma vez que muitos queijos produzidos artesanalmente fora destas quatro regiões são comercializados como se pertencessem a elas.

O queijo Minas artesanal foi legalizado pela Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002). Esta lei define o queijo Minas Artesanal como sendo aquele elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e, no ato da prensagem,

somente o processo manual. O produto final deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido. O Estado de Minas Gerais possui pelo menos quatro regiões tradicionais produtoras destes queijos reconhecidas pela Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais (EMATER) e cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), sendo elas: Serro, Serra da Canastra, Cerrado e Araxá.

Queijos artesanais fabricados diretamente na fazenda a partir de leite cru acrescentam 70 mil toneladas/ano à oferta nacional e mantêm na atividade mais de 25 mil produtores; destes, 10.773 são produtores rurais das quatro regiões caracterizadas que produzem anualmente 26.085 mil toneladas de queijo (Figura 1). Minas Gerais possui outras regiões produtoras de queijos artesanais que, no entanto, ainda não foram caracterizadas.



Fonte: figura cedida pela Emater-MG.

Figura 1 – Mapa das quatro regiões tradicionais produtoras de queijo Minas artesanal.

Comparando-se o último censo feito pela Emater em 2008 (dados não-publicados) com o publicado em 2003, percebe-se um pequeno decréscimo do número de produtores e da produção total de queijos (Tabela 1). Este fato foi, provavelmente, ocasionado pelas baixas condições econômicas dos produtores, pelo aumento da fiscalização, pelo baixo preço do queijo, pela falta de infra-estrutura e, por fim, pela ausência de apoio governamental ao longo dos anos. No entanto, a Lei nº 14.185 certamente contribuiu significativamente para conter o decréscimo da produção do queijo Minas artesanal. Os programas de apoio aos produtores rurais em andamento, fortalecendo as associações, cooperativas, as parcerias com Universidades, instituições federais e estaduais de ensino e pesquisa e organizações não-governamentais, são fundamentais para manutenção da produção desses queijos e pelo desenvolvimento social das regiões produtoras.

Tabela 1 – Censos realizados pela EMATER nos anos de 2003 e 2008

	Censo 2003[1/]				**Censo 2008[2/]**			
	Serro	**Canastra**	**Cerrado**	**Araxá**	**Serro**	**Canastra**	**Cerrado**	**Araxá**
Nº de produtores	1.050	2.096	6.491	1.136	881	1.529	5.662	943
Produção (t/ano)	3.100	4.470	15.000	11.000	3.106	5.787	14.437	2.755
Empregos diretos	2.625	5.227	16.227	2.840	2.290	4.281	16.986	2.640
Área (km^2)	6.960	6.453	27.486	13.629	6.960	7.452	27.486	13.629

[1/] Emater (2003); [2/] dados não-publicados.

Com o programa de apoio em curso, o volume de dissertações, teses e artigos sobre queijos artesanais teve aumento considerável nas principais universidades do Estado (MACHADO, 1996; BORELLI, 2002; MACHADO, 2002; FARIA, 2003; PINTO, 2004; MARTINS, 2006; DORES, 2007; NÓBREGA, 2007). O investimento possibilitou ampla interação da pesquisa, do ensino e da extensão com o produtor rural, e isto vem refletindo conseqüências positivas para o produtor, como o aumento do preço do queijo por quilograma, elevando-se de aproximadamente R$ 2,40 em 2001 (IEPHA 2001) para os atuais R$ 9,00 (dados não-publicados).

No começo da atual década, estudos preliminares foram feitos com o objetivo de diagnosticar a situação socioeconômica e também buscar informações técnicas sobre a produção destes queijos, assim como suas características físico-químicas e microbiológicas. Borelli (2002) e Pinto (2004) fizeram estudos sobre o queijo Minas artesanal da Canastra e do Serro respectivamente, nos quais foi observada a tecnologia de processamento de mais de 30 produtores de cada região, assim como as condições higiênico-sanitárias e as suas características microbiológicas e físico-químicas. Estudos similares foram feitos posteriormente por Araújo (2004), Borelli (2006), Martins (2006), Dores (2007), Nóbrega (2007) e Silva (2007). Os resultados mostraram condições inadequadas de processamento e insalubridade nas unidades produtoras, falta de padronização do processo de produção, alta contaminação por *S. aureus* e coliformes e, por fim, queijos com variadas propriedades físico-químicas. Estes estudos foram importantes para o direcionamento de pesquisas e ações relacionadas aos queijos Minas artesanais.

Os queijos Minas artesanais estão em processo de caracterização pelas associações dos produtores e, ou, pelas cooperativas de cada região, em parceria com a Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig), com a Secretaria de Agricultura Agropecuária e Abastecimento (SEAPA) e com a Associação para a Gestão de Projetos de Fortalecimentos das Economias Rurais e Desenvolvimento Territorial (AGRIFERT). As características físicas, as físico-químicas e o processo de fabricação estão em fase final de avaliação pelos produtores das regiões do Cerrado, Canastra e Serro. O documento da Região de Araxá está previsto para ser finalizado em 2008.

A literatura apresenta alguns artigos envolvendo queijos artesanais de todo o mundo e pode-se observar que os resultados demonstram a dificuldade de se obter queijos elaborados a partir de leite cru, com qualidade microbiológica aceitável (Tabela 2). Além disto, estes mesmos artigos servem de base científica valiosa para que o queijo Minas artesanal possa, em menos de 10 anos, obter a mesma qualidade que países como a França, que demoraram mais de 50 anos para atingi-la.

Em função do risco para os consumidores, a fabricação de queijos elaborados a partir de leite cru vem sendo abandonada na Espanha e na Grécia desde o final da década de 1980, sendo, agora, produzidos de forma

Tabela 2 – Incidência de *Staphylococcus* coagulase positiva e *E. coli* em queijos artesanais da Europa

Queijo	País	*Staphylococcus* coag. +	*Escherichia coli*
		Log UFC/mL	
La Serena	Espanha	ND[1]	6,52
Tenerife	Espanha	2,82	5,59
Peñamellera	Espanha	5,50 – 6,00	ND
Batzos	Grécia	5,88	ND
Serra da Estrela	Portugal	5,0 – 8,0	ND
Taleggio	Itália	5,48 – 5,94	1,95 – 3,73

Fonte: adaptado de Pinto *et al*. (2005); [1/] não-disponível.

semi-artesanal, com o uso da pasteurização e a substituição de equipamentos tradicionais por outros modernos, capazes de atenderem aos padrões higiênicos e tecnológicos previstos na legislação vigente (OLARTE *et al*., 1999; MANOLOPOLOU *et al.*, 2003).

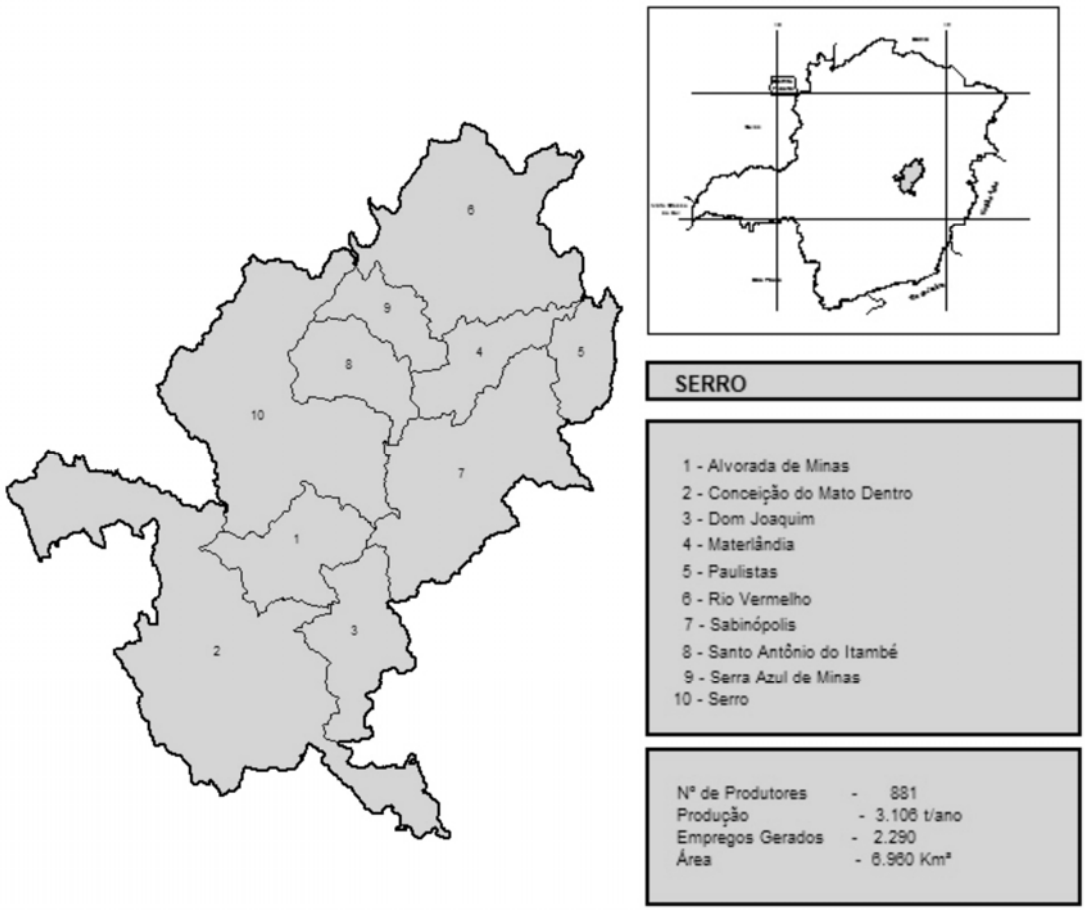
2.2. Queijo Minas artesanal do Serro

A posição geográfica dos municípios que compõem a região do Serro (Figura 2), somada às condições físico-naturais pela presença da Serra do Espinhaço com seu relevo acidentado, clima tropical amenizado pelas altitudes e densa rede de drenagem, consegue imprimir ao queijo qualidade-sabor que permitem individualizá-lo como queijo Minas artesanal do Serro (EMATER 2002).

2.2.1. Processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro

As raças de gado bovino criadas na região são, na sua maioria, mestiças, frutos dos cruzamentos mestiço/Zebu, Holandês/Zebu, Girolanda; Holandês 3/4 e 5/8, em diferentes graus de sangue. A produção de leite em cada unidade varia de 12 a 300 litros por dia (APAQS, 2006).

O queijo Minas artesanal do Serro possui características físico-químicas e físicas caracterizadas pela Associação dos Produtores Artesanais do Queijo do Serro (Tabela 3).



Fonte: figura cedida pela Emater-MG.

Figura 2 – Mapa da região do Serro produtora de queijo Minas artesanal.

Tabela 3 – Características físicas do queijo Minas artesanal do Serro

Características	Classificado	Desclassificado
Formato	Cilíndrico, reto ou ligeiramente abaulado nas laterais com 12 a 14 cm de diâmetro e 5 a 6 cm de altura	Presença de ângulos vivos
Cor da casca	Branca para os queijos frescos e amarelada para os queijos maturados	Presença de outras cores
Aspecto da casca	Lisa	Casca vermiculosa e com mofos; Casca com proteólise
Aspecto da massa	Massa fina, homogênea e com poucas olhaduras mecânicas	Massa não maciça, granulosa, com excesso de olhaduras mecânicas e de fermentação
Cor da massa	Branca à ligeiramente amarelada na maturação	Heterogeneidade na cor da massa (manchas, diferença de cor entre o centro e as bordas)
Textura	Poucas olhaduras mecânicas ou de fermentação, pequenas, bem distribuídas na massa	Excesso de olhaduras mecânicas ou de fermentação
Peso (g)	Máximo:1.250; média: 945,13; Mínimo: 725	Fora dos limites máximos e mínimos

Fonte: APAQS (2006).

Em propriedades avaliadas por Pinto (2004), o leite foi obtido por meio de ordenha manual, realizada uma vez por dia, por todos os produtores avaliados. Segundo a APAQS (2006), o leite cru deve ser obtido da ordenha completa, manual ou mecanizada, feita uma ou duas vezes por dia (manhã e tarde) das vacas em lactação. Para retirada do leite utiliza-se o sistema de bezerro ao pé ou da vaca sem o bezerro.

Após a ordenha, o leite é filtrado em tecido de algodão ou nylon. Somente 37 % das propriedades avaliadas fazem uso deste utensílio, de acordo com a legislação, a qual preconiza filtros de aço inoxidável ou plástico, com espaçamento de 10 a 15" meshes para a primeira coagem ainda na sala de ordenha e de 60 a 90" meshes para a segunda coagem no tanque de fabricação (PINTO, 2004).

A prática de adição de parte do fermento natural no fundo do tanque de fabricação propicia a fermentação do leite pela microbiota existente no fermento durante toda a ordenha. Algumas propriedades isoladas utilizam queijo ralado no fundo do tanque, em substituição ao fermento natural tradicional, com o objetivo de também direcionar a fermentação. Pinto (2004) verificou que são usadas quantidades que variam de 100 a 500 mL de fermento natural para cada 100 litros de leite. Essa variação foi maior no estudo feito pela APAQS e variou de 33 a 2.300 mL. Machado *et al*. (2004) não mencionam a quantidade média de fermento natural utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal do Serro. De acordo com esses estudos, observa-se redução da quantidade de fermento natural utilizada na fabricação de queijo, quando comparada com aquela relatada por Furtado (1980), que era de um a dois litros para cada 100 litros de leite.

Aproximadamente 30 mL de coalho industrial líquido são adicionados para cada 100 litros de leite em 70 % das propriedades, enquanto 30 % empregam coalho em pó, em quantidades que variam em função do tipo de coalho utilizado (PINTO 2004).

Pinto (2004) verificou que o corte da massa é feito, em média, 50 minutos após a adição do coalho, com pequena variação nas mudanças de estação. Este valor coincide com estudo feito pela APAQS (2006), que é de 25 a 60 minutos, com média de 50 minutos. Machado *et al*. (2004) verificaram intervalo menor, de 40 a 50 minutos.

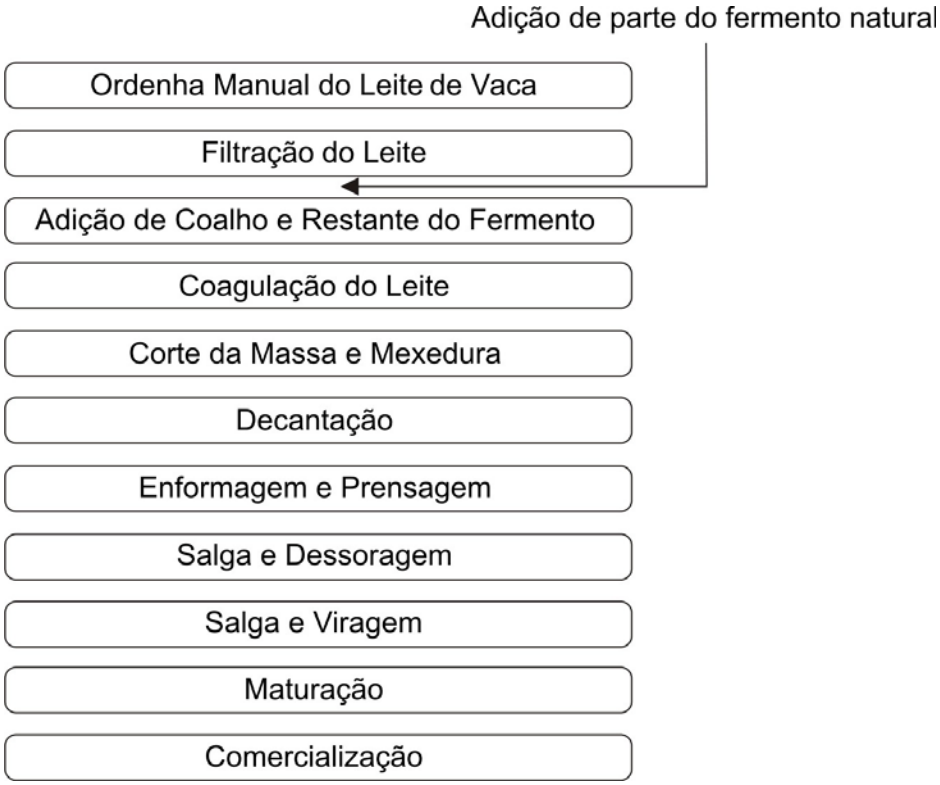
O corte da massa é feito utilizando-se espátula de madeira sem qualquer padronização com relação à direção, ao movimento e ao tamanho do grão em 100 % das unidades produtoras estudadas por Pinto (2004). Segundo APAQS (2006), o corte da massa pode ser feito utilizando-se pá de madeira ou plástico e o movimento não-uniforme durante o corte também foi observado até que os grãos atinjam o tamanho desejado de 1 a 3 cm^3. Outra evolução do processo que pode ser destacada é o tempo de mexedura e decantação dos grãos. Pinto (2004) observou que estas etapas do processo eram inexistentes em todas as unidades produtoras estudadas. Segundo estudos feitos pela APAQS (2006), o tempo de mexedura é de 5 minutos em média e o tempo de decantação dos grãos pode variar de 5 a 15 minutos.

A etapa de dessoragem pode ser feita de duas maneiras. A massa é retirada utilizando-se recipientes de plástico, sendo diretamente transferida para uma peneira grande ou tela de nylon. Este processo tem o intuito de reduzir o número de vezes que as fôrmas são preenchidas, uma vez que a tela ou a peneira permite maior separação do soro. O processo pode ser feito também retirando-se a massa com a própria fôrma. Neste caso, a separação do soro é menor, fazendo com que a fôrma seja preenchida manualmente um maior número de vezes até o nível desejado. Em seguida, inicia-se a prensagem manual para retirada do soro, dando, assim, espaço para o preenchimento de mais massa nas fôrmas e, assim, sucessivamente, até que se alcance o volume de massa que se deseja (PINTO, 2004; APAQS, 2006).

Após a prensagem manual de todas as fôrmas, realiza-se a lavagem superficial das massas com água corrente, com posterior viragem da mesma e prensagem semelhante à descrita acima, com subseqüente lavagem com água corrente (APAQS 2006).

Terminado o processo de prensagem da massa, o volume total do sal (grosso ou fino) utilizado para cada queijo é adicionado à superfície da massa enformada, com quantidades variando de 10 a 200 g/kg de queijo (média de 80), permanecendo as formas sobre a banca de fabricação. Após, aproximadamente 6 horas, realiza-se a primeira viragem da massa, transferindo-se o sal para a outra superfície que ficará por cima. No segundo dia da fabricação, na parte da manhã, as fôrmas são transferidas para uma segunda bancada, onde é realizada a segunda viragem, mantendo-se o sal na

superfície do queijo (PINTO, 2004; APAQS, 2006). O processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro está apresentado na Figura 3.



Obs.:

1. Parte do fermento natural é adicionada no fundo do vasilhame em 38 % das propriedades avaliadas.
2. O queijo é comercializado fresco, com até oito dias de fabricação. Algumas propriedades mantêm o queijo maturado por mais de 15 dias para consumo próprio.

Figura 3 – Fluxograma do processo de fabricação do queijo artesanal do Serro, adaptado de Pinto (2004).

No terceiro dia da fabricação, os queijos, com ou sem as fôrmas, são encaminhados para as prateleiras de maturação, que podem ser de madeira ou pedra ardósia. Neste momento é realizada a terceira viragem, sendo o sal retirado. Na seqüência, as viragens são realizadas de 24 em 24 horas, durante os dias que antecederem a entrega dos queijos para venda, que pode variar de 3 a 7 dias (PINTO, 2004; APAQS, 2006).

Segundo APAQS (2006), nos municípios de Dom Joaquim e Conceição do Mato Dentro, os queijos são encaminhados já embalados para geladeiras, onde ficam sob temperatura de refrigeração até o dia da comercialização. Os queijos dos demais municípios permanecem sob temperatura ambiente.

O processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro apresenta, de forma geral, seqüência das etapas de fabricação similares nos diferentes municípios. No entanto, podem ser observadas grandes variações em alguns pontos específicos do processo que, conseqüentemente, ocasionam a falta de padronização da composição centesimal como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 – Características físico-químicas do queijo Minas artesanal do Serro

Constituinte	Nº [1/]	Mínimo	Máximo	Médio
Acidez (%) m/m	75	0,30	3,52	1,27
Cloreto de sódio (%)m/m	75	1,00	2,55	1,81
Extrato seco (%)m/m	74	43,32	59,65	50,07
Gordura no extrato seco	74	37,39	59,57	47,33
Lipídios (%) m/m	75	16,50	31,00	23,73
Proteína total (g/100 g)	74	13,21	23,18	18,51
Resíduo mineral fixo (g/100 g)	6	3,41	4,90	4,81
Umidade (%)m/m	75	40,35	56,68	49,89

[1/] número de amostras realizadas.
Fonte: APAQS (2006).

2.3. Fermento natural do queijo Minas artesanal

O fermento natural do queijo Minas artesanal é utilizado desde os primórdios de sua fabricação. Após a enformagem e a salga por aspersão na sua superfície, o queijo é deixado sobre bancada levemente inclinada. O soro que escorre de um dia para o outro passa por um orifício situado na bancada, sendo captado em um recipiente. Durante este tempo, o soro é fermentado e é então utilizado na fabricação de queijo do dia seguinte (FURTADO, 1980; PINTO, 2004).

Nóbrega (2007) avaliou o pH, a acidez e o teor de NaCl do fermento natural utilizado na fabricação do queijo da Serra da Canastra durante o período das águas e da seca. O teor de NaCl foi maior no período das águas, quando a contaminação do queijo é mais freqüente e, assim, os produtores de forma empírica adicionam maiores quantidades de sal ao queijo. No entanto, este aumento no teor do sal não afetou nenhum dos grupos microbianos no período das águas e da seca, inclusive *S. aureus*.

Fermentos naturais com maior teor de sal apresentam condições mais favoráveis ao crescimento de *S. aureus*, que é mais resistente ao sal e à baixa atividade de água do que bactérias láticas. Como tentativa de diminuir o número de *S. aureus* no fermento natural, países como Itália incubam o fermento até o momento de sua utilização (PARENTE *et al*., 1997). A incubação pode resultar em menor contaminação do fermento natural por *S. aureus*, em função da elevada acidez (1,4 %) e do baixo pH (3,3) que inibem o crescimento desta bactéria. No entanto, poderá ocorrer morte de bactérias láticas menos resistentes ao ácido, mas de grande importância para o aroma e o sabor específico do queijo.

Pimentel Filho *et al*. (2005b) mostraram que o teor de NaCl e os valores de pH do fermento natural de 15 unidades produtoras de queijo Minas artesanal do Cerrado são muito variáveis, sendo o pH de 5,03 a 6,86 e os teores de NaCl de 3,55 a 22,48 %. No entanto, neste mesmo estudo os autores não relacionaram a presença e o número de patógenos em função do pH e dos teores de NaCl encontrados no fermento natural.

Borelli (2002), Pimentel Filho (2005a) e Martins (2006) encontraram quantidades consideráveis de *E. coli* e coliformes termotolerantes no fermento natural utilizado na fabricação de queijo Minas artesanal. Alguns estudos sobre o fermento natural e o leite utilizados na fabricação de queijo Minas artesanal podem ser encontrados na literatura. Borelli (2006), Martins (2006) e Nóbrega (2007) realizaram estudos relacionados à microbiota existente no soro fermento natural, apresentados na Tabela 5.

Os resultados da Tabela 5 indicam grande contaminação por estafilococos no leite e no fermento natural. A redução da contaminação de patógenos no leite tem se mostrado difícil e já que o mesmo não é pasteurizado, inevitavelmente o queijo poderá apresentar altas contagens desses microrganismos logo no primeiro dia de maturação. Este fermento contém quantidades de sal que podem variar de 3,55 a 22,48 % (PIMENTEL FILHO, 2005). Neste mesmo trabalho foi mostrado que, apesar de possuir altas concentrações de sal, o fermento ainda atingia até 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e coliformes 30 ºC.

Segundo Furtado (1980), o fermento natural constitui um autêntico fermento por conter número elevado de bactérias láticas desejáveis em cada mililitro. No entanto, pode conter também contaminação alta de *S. aureus*,

Tabela 5 – Qualidade microbiológica do fermento natural e do leite utilizados na fabricação de queijos Minas artesanal

Referência	Região		Contagem-Padrão	Coliformes 30 ºC	*E. coli*	*S. aureus*
				Log UFC/mL		
Martins (2006)[1/]	Serro	Fermento Leite	---- 5,79	3,08 4,04	2,18 1,50	2,46 4,43
Martins (2006)[2/]	Serro	Fermento Leite	----- 5,93	3,36 4,91	2,23 1,78	2,41 3,45
Borelli *et al.* (2006)	Canastra	Fermento Leite	----- 7,00	> 3,04[3/] 2,07[3]	> 3,04[3] <1,00[3]	5,03 <1,00
Nóbrega (2007)[4/]	Canastra	Fermento Leite	6,58 -----	3,67 -----	1,67 -----	2,46 -----
Nóbrega (2007)[5/]	Canastra	Fermento Leite	8,53 -----	3,58 -----	2,00 -----	2,09 -----
Legislação		Fermento Leite	< 5,00	----	< 2,00	< 2,00

[1/] período da seca; [2/] período das águas; [3/] valores estimados; [4/] período das águas; e [5/] período da seca.

podendo chegar sua população acima de 10^6 UFC.mL^{-1}, dependendo da quantidade de fermento adicionada ao leite. Supondo que durante o processo sejam adicionados 4 litros de fermento natural para cada 100 litros de leite, e o fermento natural contenha 10^3 UFC/mL de *S. aureus*, o leite destinado à fabricação do queijo iniciaria com uma contagem inicial de, no mínimo, 4 x 10^1 UFC. mL^{-1}, além da concentração inicial de *S. aureus* presente no leite. Além disto, há de se considerar que as células de *S. aureus* oriundas do fermento podem apresentar maior resistência às condições como pH baixo e alta concentração de sal, uma vez que sobreviveu por quase 12 horas durante a fermentação. Sob perspectiva pessimista, o fermento natural, contendo 5 x 10^5 UFC.mL^{-1} (BORELLI, 2002), o leite apresentaria população inicial de *S. aureus* de, no mínimo, 2 x 10^4 UFC/mL. A contaminação do fermento natural por *S. aureus* não foi afetada pelas estações das águas e da seca, assim como pela utilização ou não de fermento natural (MARTINS, 2006).

Segundo Borelli (2006), 70 % dos fermentos naturais utilizados na fabricação dos queijos da Serra da Canastra estavam contaminados com *S. aureus*, com contagens variando de 4,8 a 6,3 log UFC/g.

2.4. Queijos Minas artesanais e segurança alimentar

Por serem obrigatoriamente elaborados a partir de leite cru, os queijos artesanais são susceptíveis ao crescimento de patógenos de alto perigo, como *Salmonella*, *L. monocytogenes,* algumas estirpes de *E. coli*, dentre outras. Estudos envolvendo diferentes tipos de queijos, provenientes de vários países europeus tradicionalmente produtores de queijos artesanais, relatam o risco potencial para a saúde ao se consumir estes queijos (DE BUYSER *et al.*, 2001).

Analisando os dados da Tabela 6, verifica-se que apenas duas variedades de queijos apresentaram baixas populações de *Staphylococcus* coagulase positiva ou *E. coli*. Apenas o queijo francês Cendrat Del Montsec apresentou contagens baixas dos dois microrganismos.

Tabela 6 – Características microbiológicas de queijos artesanais produzidos na Europa

Queijo	País	*Staphylococcus* Coagulase (+)	Coliformes 30 º C *(E. coli)*	Mesófilos totais	Referência
		---------- Log UFC/mL ----------			
Cendrat Del Montsec	França/ Espanha	1,54	0,99	ND	Mor-Mur *et al*. (1994)
Tenerife	Espanha	2,82	6,27 (5,59)	ND	Zárate *et al.* (1997)
Peñamellera	Espanha	5,5 – 6,0	6,0 – 6,2	ND	Estepar *et al.* (1999)
Serra da Estrela	Portugal	5,0 – 8,0	7,0 – 8,0	9,0	Macedo *et al.* (1996)
Tetilla	Espanha	< 1,79	6,09	ND	Menendez *et al.* (2001)
Batzos (verão)	Grécia	5,88	6,75	7,69	Psoni *et al.* (2003)
Batzos (inverno)	Grécia	4,86	6,51	8,31	Psoni *et al.* (2003)
Batzos (primavera)	Grécia	6,23	6,45	8,00	Psoni *et al.* (2003)

* valores médios; e ND = não-disponível.

Comparando as contagens microbianas de queijos elaborados a partir de leite cru na Europa com os queijos Minas artesanais, verifica-se que, apesar de o leite no Brasil possuir qualidade inferior, os queijos Minas artesanais apresentam contagens semelhantes aos queijos artesanais europeus. (Tabela 7).

Até o presente momento, Ornelas (2005) foi o único a detectar *L. monocytogenes* em uma única amostra de queijo artesanal analisada da região da Serra da Canastra. Este resultado evidencia a possibilidade de sobrevivência de *Listeria* sp. em queijos Minas artesanais. No entanto, não se sabe a contagem inicial mínima deste microrganismo para que ele sobreviva ao

Tabela 7 – Características microbiológicas do queijo Minas artesanal em diversos trabalhos científicos

Referência	**Queijo**	**Nº** [1/]	**Maturação (dias)**	***Staphylococcus coagulase positiva***		***E. coli***	**Coliformes 30 ºC**	***Listeria* sp.**	***Salmonella* sp.**
				Log UFC.g^{-1}	**Enterotoxinas**	**Log UFC.g^{-1}**		**25 g de amostra**	
Cerqueira *et al*. (1997)	ND[2/]	30	ND	4,00 – 8,00	ND	ND	ND	Presente[3/]	--
Borelli (2002)	Canastra	10	ND	6,08	ND	> 4,04[4/]	> 4,04	Ausente	Ausente
Faria (2003)	Serro	40	ND	6,07	ND	> 3,69	ND	Ausente	Ausente
Araújo (2004)	Araxá	37	7	0 – 7,97	0	0 – 6,23	0 – 6,50	Ausente	Presente[5/]
Pinto (2004)	Serro	30	7	4,47 – 7,97	0	1,73 – 2,85	4,49 – 5,31	Ausente	Ausente
Ornelas (2005)	Canastra	40	ND	> 4,00[6/]	ND	3,00 – 5,00[7/]	1,3 – 5,87	Presente[8/]	Ausente
Borelli (2006)	Canastra	ND	ND	5,91	ND	> 3,69	> 3,69	Ausente	--
Martins (2006)[9/]	Serro	ND	8	3,40	0	2,50	3,22	Ausente	Presente[10/]
Martins (2006)[11/]	Serro	ND	8	2,04	0	1,97	3,47	Ausente	Ausente
Dores (2007)[12/]	Canastra	ND	8	4,29	0	3,35	3,75	Ausente	Ausente
Dores (2007)[13]	Canastra	ND	8	3,50	0	3,30	3,78	Ausente	Ausente

[1/] número de amostras analisadas; [2/] queijo Minas artesanal produzido em região não especificada pelo autor; [3/] em 10 % das amostras; [4/] coliformes termotolerantes; [5/] em 18,9 % das amostras; [6/] presente em 50 % das amostras; [7/] em 55 % das amostras; [8/] em 12,5 % das amostras; [9/] período das águas; [10/] presente em 12 % das amostras; [11/] período da seca; [12/] período das águas; e [13/] período da seca.

processo de fabricação e o tempo de maturação, o qual não foi especificado pelo autor (Tabela 7).

Métodos tecnológicos inadequados e condições higiênicas insatisfatórias podem favorecer o crescimento de *Listeria* sp. devido à resistência relativamente alta a condições adversas como: alta acidez (> 0,5 % de ácido lático) e a temperaturas de refrigeração (SOLANO-LÓPEZ e HERNANDEZ-SANCHEZ, 2000).

Salmonella sp. foi detectada em amostras de queijos de Araxá (ARAÚJO, 2004) e queijos do Serro (MARTINS 2006). Vários estudos relatam o isolamento de *Salmonella* sp. em queijos (SILVA *et al.*, 2001; RAPINI *et al.*, 2002), sendo também relatados vários surtos ocasionados por este patógeno, em razão do consumo de queijos elaborados com leite cru ou pasteurizado (DE BUYSER, 2001).

Pode-se observar na Tabela 7, redução do número de *S. aureus* em queijos Minas artesanal nos últimos dois anos. Esta redução pode ter sido provocada pelo intenso treinamento e pela implantação de Boas Práticas de Fabricação e, também, pela redução da quantidade de fermento natural adicionada ao leite (PINTO, 2004; ORNELAS, 2005). A mesma redução pode ser observada nos queijos do Serro ao longo de praticamente o mesmo período de tempo, segundo os resultados de Pinto (2004) e Martins (2006).

Este decréscimo na contaminação por *S. aureus* reflete as ações praticadas junto aos produtores pela Emater e, ou, pelas instituições de pesquisa. No entanto, a baixa contagem de *S. aureus* não implica ainda em segurança alimentar. Deve-se considerar que grande parte dos estudos é feita a partir de uma quantidade pré-determinada de amostras, com processo de fabricação discrepante ao que rotineiramente é encontrado.

Além disto, ainda que alguns estudos apresentem resultados com baixas contagens destes grupos microbianos, não se pode afirmar que haverá repetibilidade de resultados em todos os lotes de fabricação durante um grande período de tempo já que o leite não é pasteurizado.

A França, com mais tradição do que o Brasil na produção e no consumo de queijos artesanais, direciona sua fiscalização e seu controle com relação à produção de enterotoxinas estafilocócicas nos queijos, permitindo, assim, a presença de *S. aureus* em números de até 10^5 UFC.g^{-1}. Ainda sim, queijos com estas contagens são liberados para comercialização, caso o resultado de

enterotoxinas seja satisfatório. No entanto, não está elucidado se queijos frescos com alta contagem de *S. aureus* e ausência de enterotoxinas vão permanecer assim ao longo do seu tempo de maturação.

A produção de enterotoxinas ocorre em função do crescimento do microrganismo e das condições específicas do meio. Análises feitas pela fundação Ezequiel Dias confirmaram a produção de enterotoxinas por *S. aureus* presentes nos queijos por indução em meios de cultura (dados não-publicados). No entanto, não foi verificada produção de enterotoxinas quando este microrganismo cresce no queijo. A determinação de um tempo específico de maturação que coincida com o crescimento máximo de *S. aureus* para a verificação de produção de enterotoxinas poderia ser uma maneira eficaz para o julgamento de um queijo, caso *S. aureus* apresentasse comportamento homogêneo nos queijos quanto ao tempo máximo para atingir a maior contagem. No entanto, na prática, o comportamento dos grupos microbianos em queijos atinge níveis máximos em diferentes dias de maturação ainda que os queijos sejam produzidos em uma mesma área (ZÁRATE *et al.*, 1997; POZNANSKI *et al*., 2004).

A ausência de enterotoxinas nos queijos analisados nos estudos apresentados na Tabela 7 foi constatada utilizando-se o método Vidas Staphy Enterotoxins. No entanto, em dois estudos apresentados na Tabela 7 foram feitas análises de enterotoxinas pelo método OSP, que apresentou resultado positivo apesar da menor sensibilidade deste método (ORNELAS, 2005; DORES, 2007).

Pinto *et al*. (2004) não detectaram enterotoxinas em 14 amostras de queijo do Serro com contagens de *S. aureus* que variaram de 4,5 a 7,2 Log UFC.g^{-1}. A ausência de enterotoxinas em queijos com altas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva não sugere indícios confiáveis de segurança alimentar deste produto. Os queijos Minas artesanais apresentam condições favoráveis para produção de enterotoxinas como pH e a_w (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2006; DORES, 2007). Verifica-se que os resultados demonstram condições favoráveis à produção de enterotoxinas, de acordo com os valores ótimos de pH e a_w mencionados por Forsythe (2002).

2.4.1. Listeria em queijos artesanais

A busca por queijos seguros e com características sensoriais diferenciadas é crescente (CIMONS, 2001). Os queijos artesanais tradicionais, pelo fato de serem produzidos com leite cru, são reconhecidos por apresentarem características sensoriais pronunciadas e complexas, em virtude da presença de enzimas endógenas não encontradas em leite pasteurizado (CIMONS, 2001; DE BUYSER *et al*., 2001). Os microrganismos que compõem esta microbiota são responsáveis por estas características e, além disso, são partes intrínsecas do processo (MILLET, 2006).

Na Europa, queijos elaborados com leite cru, não têm sido apontados como alimentos de risco sob o argumento que atualmente os mesmos, são mais seguros do que no passado. No entanto, o risco de contaminação por *L. monocytogenes* envolve não somente leite cru, mas igualmente, o pasteurizado e o leite microfiltrado devido à possibilidade de pós-contaminação (RUDOLF e SCHERER, 2001).

L. monocytogenes foi reconhecida como patógeno veiculado por alimentos de grande importância desde o começo da década de 1980, quando surtos de listeriose apresentaram altos índices de mortalidade, principalmente em grupos específicos da população como recém-nascidos, idosos e imunocompromeidos (Tabela 8).

L. monocytogenes pode ser encontrada no solo, na água e na vegetação. Conseqüentemente, pode estar presente na maioria das matérias-primas utilizadas pela indústria de alimentos, que não são submetidas a processos de eliminação deste microrganismo. O controle eficiente da matéria-prima pode auxiliar na redução da contaminação, porém, não garante a ausência, uma vez que, além de ser encontrada em vários ambientes, o patógeno pode-se multiplicar em um amplo intervalo de pH (4,39 a 9,4), temperatura (-0,4 a 45 ºC) e a_w (até 0,92) (Bell, 2002; ICMSF, 1996).

A incidência de Listeria em leite cru varia de 0,4 a 12,6 % e é máxima nos leites produzidos em montanhas com temperaturas baixas, devido a introdução de silagem na alimentação (EL-GAZZAR e MARTH, 1991).

Segundo Meyer-Broseta (2003), quando o leite cru está contaminado, normalmente as contagens são menores que 1 $UFC.mL^{-1}$. No entanto, a

Tabela 8 – Tipos de doenças causadas por *L. monocytogenes*

Tipos de doença	Tempo de incubação	Sintomas
Zoonoses	1 a 2 dias	Lesões localizadas na pele
Infecção do neonatal: Recém nascidos infectados pela mãe durante o parto ou infecção cruzada de um recém nascido para outros no hospital	1 a 2 dias, normalmente de infecções congênitas antes do nascimento	Pode ser severa, resultando em meningite e morte.
Infecção da mãe durante a gravidez adquirida por alimentos contaminados. A infecção é mais comum no terceiro trimestre de gravidez	Varia de 1 dia a muitos meses	Sintomas similares ao de uma gripe moderada ou assintomática na mãe, mas produz implicações sérias para o feto como: aborto espontâneo, nascimento prematuro e meningite
Listeriose adquirida por pessoas não grávidas por meio de alimentos contaminados.	Varia de 1 dia a muitos meses	Sintomas moderados ou assintomáticos que podem progredir para infecções do sistema nervoso central como meningite. Mais comum e mais severa em imunocomprometidos e idosos
Listeriose adquirida pelo consumo de alimentos muito contaminados ($>10^7 . g^{-1}$) de L. monocytogenes	< 24h	Vômito e diarréia que normalmente desaparecem

Fonte: adaptado de Bell (2002).

contaminação pode ser elevada (10^4- 10^6 UFC.mL^{-1}) em caso de mastite. A estocagem do leite cru sob refrigeração pode também permitir o crescimento de *L. monocytogenes*, segundo este mesmo autor.

L. monocytogenes pode ser encontrada em fezes de animais, sendo capaz de causar sérias infecções em ruminantes, particularmente em cabras e ovelhas (MOSSEL *et al*., 1995).

Uma vez que a contaminação no leite ocorre durante a ordenha, práticas higiênicas de limpeza e sanitização no úbere e nas tetas auxiliam na redução desta contaminação. Quando presente no leite, *L. monocytogenes* pode facilmente colonizar os derivados lácteos e todo o ambiente de processamento, já que possui habilidade para crescer sob temperaturas de refrigeração. A fase lag deste patógeno pode variar de 1 a 33 dias sob estocagem a temperaturas entre 0 e 10 ºC (MOSSEL *et al*., 1995).

Torna-se essencial assegurar a limpeza e desinfecção de todo ambiente de produção, equipamentos, veículos de transporte do leite e especial atenção nos tanques utilizados para o transporte do leite da fazenda até a indústria.

Possíveis falhas inevitavelmente aumentarão as concentrações deste patógeno no leite. Para produção de queijos elaborados com leite cru, estes procedimentos tornam-se um diferencial para produtos seguros e não-seguros (BELL, 2002).

O efetivo controle de *L. monocytogenes* no leite tem aumentado em conseqüência de inspeções regulares, aplicação de APPCCs e efetivas práticas de higiene (MILLET, 2006). Os fatores que podem elevar o risco de listeriose ocasionada por alimentos estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1 – Fatores de risco para contaminação de alimentos por *L. monocytogenes*

Material cru ou produto exposto a contaminação
Produto manufaturado sem etapa de processamento capaz de destruir o patógeno em questão
Produto com fatores intrínsecos e, ou extrínsecos favoráveis ao desenvolvimento do patógenos como: pH neutro, baixo teor de sal, alta umidade.
Produto exposto a pós-contaminação
Produtos comercializados com longa vida de prateleira sob condições impróprias
Produtos comercializados prontos consumo

Fonte: Bell (2002).

A literatura apresenta vários artigos sobre *L. monocytogenes*, relatando a seqüência do seu genoma (GLASER *et al*., 2001), fatores de virulência e sua expressão (VASQUEZ-BOLAND, 2001; ESMOLAEVA *et al*., 2004), resistência ao estresse ácido (HILL *et al*., 2002) e o seu modelo de crescimento, considerando temperatura, pH e ácidos orgânicos (TIENUNGOON *et al*., 2000; McKELLAR *et al*., 2002; LE MARC *et al*., 2002). Estes estudos possibilitam estratégias para inibir *L. monocytogenes* e aumentar o controle dessas espécies. No entanto, estirpes resistentes podem surgir quando uma substância antimicrobiana específica é utilizada (LOESSNER *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem que barreiras específicas, existentes em produtos fermentados como queijos elaborados a partir de leite cru, possam ser alternativa promissora para controle de patógenos no leite (MILLET, 2006).

Guerra e Bernardo (2001) verificaram inibição de *L. monocytogenes* Scott A por ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio, produzidos por espécies de *Enterococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* e *Staphylococcus*

presentes na microbiota do queijo artesanal Alentejo. No entanto, não foi verificada produção de bacteriocina por nenhuma destas espécies.

Farias *et al*. (1994) isolaram 25 estirpes a partir de queijos artesanais argentinos, pertencentes aos gêneros *Lactococcus, Lactobacillus* e *Enterococcus*, com efeito antagônico sobre *L. monocytogenes*. A produção de listeriocinas foi observada somente em quatro estirpes de *Enterococcus*. Tarelli *et al*. (1994) isolaram 116 estirpes de *Enterococcus*, das quais 21 apresentaram efeito antagônico sobre *Listeria* pela produção de bacteriocinas.

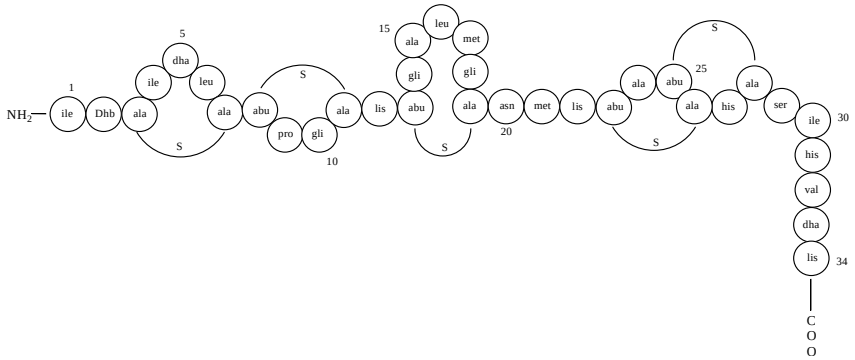
Além da utilização de substâncias antimicrobianas naturais, processos físicos como tratamento do leite com utilização de altas pressões pode ser uma boa alternativa para redução do risco de contaminação de queijos por *L. monocytogenes* (LINTON *et al*., 2008)

2.5. Nisina

A nisina é uma bacteriocina descoberta em 1928, produzida por várias estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Cleveland *et al*. (2001) avaliaram a produção de nisina por 40 estirpes de *L. lactis* subsp. *lactis* e observaram que a bacteriocina foi produzida por 35 estirpes. Segundo BOWER *et al*. (2002), a nisina é naturalmente produzida em alimentos fermentados, especialmente produtos lácteos e vem sendo consumida pelos humanos ao longo do tempo. Esta bacteriocina, isolada de bactérias do ácido lático (BAL), tem seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países e possui classificação GRAS (*Generally Recognized As Safe*) pelo FDA (*Food and Drug Administration*). No Brasil, seu uso é permitido, com limite de 12,5 $mg.kg^{-1}$ de produto final, para queijos (ANVISA, 1994).

Estudos de toxicidade têm indicado segurança no uso da nisina utilizada como aditivo, sendo o composto digerido pelo sistema digestório humano pela enzima α-quimotripsina. Pesquisas de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, assim como estudos *in vitro* e de resistência cruzada demonstram segurança para consumo humano na ingestão diária aceitável (IDA) de 2,9 mg/pessoa adulta/dia (CLEVELAND *et al*., 2001). No entanto, Moreno *et al*. (2000a) citam um valor de ingestão segura 20 vezes maior.

Segundo Toledo (2000), a molécula da nisina (Figura 4) é um peptídeo de 34 aminoácidos que possui peso molecular de 3,5 kDa, sendo formada por oito alaninas, quatro ácidos aminobutírico (ABA), três glicinas, três isoleucinas, três lisinas, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, uma serina, uma valina, uma prolina, uma asparagina e os aminoácidos incomuns deidroalanina (DHA) e deidrobutirina (DHB).



Fontes: Sebti e Coma (2002) e Melo (2003).

Figura 4 – Representação da estrutura química da molécula de nisina.

Uma propriedade química importante da nisina é sua considerável resistência térmica, especialmente em valores de pH ácidos, suportando aquecimento de 115 ºC durante 20 minutos com inativação inferior a 5 % em pH 3,0 (ADAMS, 2003).

A nisina possui amplo espectro de ação contra a maioria das bactérias Gram-positivas, inclusive formadoras de esporos, sendo seu principal mecanismo de ação relacionado à formação de poros na membrana citoplasmática, por meio da interação eletrostática com os fosfolipídeos da membrana (ADAMS, 2003).

A nisina tem demonstrado ser eficaz contra bactérias patogênicas importantes em alimentos como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes*, entre outras (CLEVELAND *et al*., 2001; BOWER *et al*., 2002). Bactérias Gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras são menos sensíveis à ação da nisina; no entanto, Bower *et al*. (2002) relataram efetividade deste composto contra bactérias Gram-negativas e fungos filamentosos quando usado em combinação com o EDTA, que é um agente quelante. Em estudo conduzido por Schillinger *et al*. (2001) foi relatada a eficácia de nisina juntamente com culturas de *Enterococcus faecium* e

Lactobacillus sakei contra *L. monocytogenes* em tofu. Hamama *et al*. (2002) relataram o efeito antagônico de nisina sobre *S. aureus* em queijos elaborados com leite cru.

2.6. Características físico-químicas em queijos Minas artesanais

Os estudos de caracterização físico-química feitos pelas associações de produtores (Tabela 3) indicam possibilidades mínimas de somente uma variedade de queijo representar a sua região. Na região do Serro, por exemplo, pode-se encontrar queijos com teor de gordura no extrato seco variando de 37,0 a 59,0 %. Queijos representantes de uma mesma região podem apresentar diferenças superiores a 100 pontos percentuais em relação a um mesmo constituinte. A alta discrepância da composição centesimal entre os queijos de uma mesma região pode dificultar o seu processo de caracterização.

A ausência de padronização de etapas específicas do processamento entre queijos de uma mesma região e muitas vezes entre os queijos de um mesmo produtor, como tempo de mexedura, corte da coalhada e prensagem, contribui efetivamente para a grande variação da composição centesimal encontrada nos queijos como é mostrado na Tabela 9.

A Tabela 9 corrobora a grande variação da composição centesimal dos queijos Minas artesanais verificadas nos estudos de caracterização feitos pelas associações e cooperativas. Citando como exemplo específico o teor de gordura, o queijo do Serro poderia ser enquadrado dentro dos limites mínimos e máximos das regiões do Cerrado e da Canastra.

Os teores de proteínas encontrados nos queijos do Serro (ARAÚJO, 2004; MARTINS, 2006) encontram-se fora dos limites máximos e mínimos verificados pela APAQS (2006). O mesmo acontece com o teor de cloreto encontrado no queijo do Serro por MACHADO (2004).

Estudos sobre a variação da composição dos diferentes lotes de queijos de produtores individuais são importantes e devem ser feitos para que haja respostas que auxilie a identificação de grupos de produtores homogêneos criando queijos característicos específicos dentro de uma mesma região.

Tabela 9 – Características físico-químicas do queijo Minas artesanal

Referência	Região	Maturação (dias)	pH	Gordura	Umidade	Cloretos	Extensão de Maturação	Profundidade de Maturação	Proteína Total
			Valores médios (%)						
Vargas (1998)	Serro e Canastra	--	5,60	25,00	48,59	3,05	--	--	28,00
Araújo (2004)	Araxá	7	4,85	28,30	45,05	2,06	9,35	5,43	24,40
Machado (2004)	Serro	6	4,98	29,22	50,84	4,39	---	9,18	18,75
Martins *et al*. (2004)	Cerrado	8	5,08	26,50	43,12	1,74	10,34	4,26	25,20
Pinto (2004)	Serro	7	4,75	28,21	48,22	1,62	11,01	4,62	22,40
Ornelas (2005)	Canastra	--	--	26,79	43,01	--	--	--	--
Martins (2006)[1/]	Serro	8	5,00	29,00	40,00	1,60	9,99	6,13	24,21
Martins (2006)[2/]	Serro	8	4,80	32,00	40,00	1,65	9,17	5,24	21,58
Dores (2007)[3/]	Canastra	8	5,03	26,88	45,42	1,43	10,78	6,72	24,75
Dores (2007)[4/]	Canastra	8	5,00	30,19	44,79	1,50	9,78	5,37	24,64
Silva (2007)	Canastra	9	5,24	28,15	43,63	1,95	12,28	9,47	23,90

[1/] período das águas; [2/] período da seca; [3/] período das águas; e [4/] período da seca.

Os estudos ainda se encontram em fase preliminar e ações específicas devem ser tomadas desde já para que o processo de caracterização seja eficiente e sirva, efetivamente, como respaldo para a regulamentação definitiva do queijo Minas artesanal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi conduzido nos laboratórios de físico-química e microbiologia do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora-MG e no Laboratório de embalagens do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG. Os experimentos *in loco* foram conduzidos em unidades produtoras da região do Serro-MG e no laboratório de análises clínicas da Associação dos produtores de Queijo Minas Artesanal do Serro.

3.1. Seleção das unidades produtoras

Foram selecionadas três unidades produtoras da cidade do Serro-MG, de acordo com os critérios de adequação de instalação, sanidade do rebanho, boas práticas de fabricação, higiene na ordenha, salubridade da queijaria e existência de energia elétrica. A escolha foi feita em reunião com o presidente da Cooperativa de Produtores de Queijo do Serro, o presidente da associação dos produtores e técnicos da Emater-MG.

3.2. Análises do fermento natural e dos queijos

3.2.1. Análises físico-químicas

A determinação do pH dos queijos foi feita utilizando medidor de pH modelo Tecnal, pH Meter Tec-2, introduzindo-se eletrodo específico para queijos na parte interna. A determinação da a_w foi feita utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T – Decagon Devices, Inc., Washington, USA, utilizando-se amostras coletadas em toda extensão dos queijos.

As análises de gordura, umidade, cloretos e nitrogênio total foram feitas de acordo com os métodos oficiais, descritos na Instrução Normativa nº 68, de 14 de abril de 2006 (BRASIL, 2006). O nitrogênio não-protéico (NNP) foi determinado de acordo com a técnica do ácido tricloroacético (PEREIRA *et al*., 2001). A proteína verdadeira foi determinada subtraindo-se o valor do NNP do nitrogênio total. Após esse cálculo, o resultado obtido foi multiplicado por 6,38 (PEREIRA *et al*., 2001). A extensão de maturação foi quantificada pela razão (%) entre o nitrogênio solúvel em pH 4,6 e o nitrogênio total, enquanto a profundidade de proteólise pela razão (%) entre o valor do nitrogênio não-protéico (NNP) pelo valor do nitrogênio total de cada amostra (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1989).

A análise de perfil de textura (TPA) foi conduzida em máquina universal de teste mecânico (Instron – Série 3367 Norwood, Massachusetts, USA). As condições de trabalho foram: uma velocidade pré-teste de 1 $mm.s^{-1}$, velocidade de teste de 1 $mm.s^{-1}$ e velocidade pós-teste de 1 $mm.s^{-1}$, tendo uma distância de compressão de 40 % da altura da amostra. Foi utilizada uma probe cilíndrica de 55 mm de diâmetro e uma célula de carga de 1 KN, que foi movida perpendicularmente sobre a amostra de queijo de formato cilíndrico de 25 mm de diâmetro e 35 de altura retiradas aleatoriamente das peças de queijos. A força exercida sobre a probe foi automaticamente captada e os parâmetros firmeza (N) fraturabilidade (N), gomosidade (N), mastigabilidade (N), elasticidade (mm) e coesividade foram calculados automaticamente pelo software Blue Hill 2.0 (Instron – Norwood, Massachusetts, USA), a partir da curva de força (N) x tempo (s) gerados durante o teste.

3.2.2. Análises microbiológicas

Para análises de *S. aureus*, coliformes totais e *E. coli* foram utilizados, respectivamente o Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) *Count Plate* (AOAC 981.15) e Petrifilm Coliformes/*E.coli* (AOAC 991.14 – Contagem de Coliformes e *E. coli* em alimentos, película Reidratável Seca), de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor, sendo ambos indicados para análises em leite e queijos (PONSANO *et al*., 2000; SCHOELLER e INGHAM, 2001). A contagem de bactérias láticas nos queijos foi feita utilizando-se a metodologia descrita por Silva *et al*. (2001).

A detecção de *Salmonella* sp. nos queijos foi feita utilizando-se o Reveal - *Salmonella Test System* (AOAC Licença 96080, Lesher Place Lansing, MI USA 1). A detecção de *L. monocytogenes* nos queijos foi feita utilizando-se os testes REVEAL para Listeria (AOAC Licença 960701, Neogen, Lesher Place Lansing, MI USA), de acordo com os procedimentos determinados pelo distribuidor. As placas CROMOCEN (BioCen, Campinas, SP, Brasil) foram utilizadas para contagens de *L. innocua* e *L. monocytogenes*. A confirmação dos resultados de detecção de *L. innocua* foi feita empregando-se o método qualitativo apresentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2003).

3.3. Culturas de *S. aureus, L. innocua* e *L. monocytogenes*

Foram utilizadas as culturas de *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* ATCC 15313 e *L. innocua* ATCC 33090. As culturas estoques foram congeladas, mantidas, repicadas e ativadas em caldo BHI (*S. aureus, L. innocua e L. monocytogenes*). Todas foram repicadas e ativadas a 37 ºC.

3.4. Adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em leite desnatado reconstituído (LDR) esterilizado

Foi utilizado o preparado comercial contendo Nisina (Chrisin® 2,5 % p/p), cedido pela Christian Hansen (Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda. – Valinhos-SP Brasil). O preparado comercial foi adicionado diretamente ao leite, até as

concentrações desejadas, como indica o fabricante para os testes *in vitro* e *in loco*.

Foram adicionadas quantidades de nisina em tubos de vidro com tampas rosqueáveis contendo 200 mL de LDR 12 % nas concentrações de 100, 200, 400 e 500 IU/mL de nisina. As amostras foram homogeneizadas e transferidas em porções de 15 mL para tubos com tampas rosqueáveis estéreis. Imediatamente após adição de nisina foram inoculadas, em duplicata, quantidades de cultura de *S. aureus* para que a concentração atingisse, aproximadamente, 10^4 UFC.mL^{-1}. Após adição de nisina, as amostras provenientes de todos os tratamentos foram plaqueadas nos tempos 0, 3, 5, 8, 10, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação. Os controles foram feitos sem a presença de nisina.

3.4.1. Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido com três repetições, em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, sendo o tempo, os meios de cultura e as concentrações de nisina os fatores estudados. Os logaritmos do número de UFC.g^{-1} foram analisados adequadamente por meio de regressão linear. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS) – versão 9.1. Para análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor que 5 % para modelo e para coeficientes linear e quadrático quando foi o caso.

3.5. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em queijo Minas artesanal

De acordo com os resultados obtidos no item 3.4 foram escolhidas duas concentrações de nisina para continuidade dos experimentos. A nisina foi adicionada diretamente ao leite durante o processo de fabricação do queijo Minas artesanal do Serro em quantidade necessária para que atingissem as concentrações escolhidas. Após a fabricação, os queijos foram encaminhados ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes, onde foram maturados à temperatura

ambiente por 60 dias. Foram feitas análises microbiológicas de *S. aureus* e análises físico-químicas de pH, a_w, gordura, gordura no extrato seco (GES), umidade, cloretos, proteínas, extensão e profundidade de maturação. Foram feitas também análises de perfil de textura (TPA), no laboratório de embalagens de alimentos da Universidade Federal de Viçosa, avaliando-se a firmeza, fraturabilidade, gomosidade, mastigabilidade, elasticidade e coesividade. As análises dos queijos foram feitas nos tempos 3, 7, 14, 30, 45 e 60 dias após a fabricação. A determinação das contagens iniciais de *S. aureus* no leite foi feita no laboratório da Associação dos produtores de queijo do Serro.

3.5.1. Delineamento estatístico

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições em esquema fatorial, sendo o tempo e as concentrações de nisina os fatores estudados. Os logarítimos do número de *S. aureus* foram submetidos à análise de regressão linear. Os resultados físico-químicos e de TPA foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey em cada tempo isoladamente. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS) – versão 9.1. Para análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor que 5 % para modelo e para coeficientes linear e quadrático quando foi o caso.

3.6. Efeito antagônico do fermento natural *in vitro* x *L. innocua* e *L. monocytogenes*

Foram inoculadas três doses: 0,1, 0,3 e 0,5 mL de fermento em frascos contendo 200 mL de LDR 12 %. Em seguida, foram inoculadas culturas de *L. monocytogenes* e *L. innocua* em cada frasco. Os plaqueamentos foram feitos nos tempos 0, 4, 8, 12, 24 e 28 h de incubação a 37 ºC. Os resultados das curvas de crescimento dos microrganismos desafiados foram comparados com os seus respectivos controles, o qual foi feito sem a presença de fermento natural. Foram feitas análises de detecção de *L. innocua* e *L. monocytogenes* nos fermentos naturais.

3.6.1. Delineamento estatístico

O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, sendo o tempo, a dose do fermento e o microrganismo isoladamente os fatores estudados. Os valores foram submetidos à análise de variância e analisados adequadamente por meio de regressão linear e pelo teste de Tukey, quando foi o caso. Para análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor do que 5 % para modelo e para coeficientes linear e quadrático, quando for o caso. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS) versão 9.1.

3.7. Efeito antagônico *in loco* da microbiota endógena do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua*

Foram produzidos três lotes de 15 queijos no laboratório da Associação de Produtores de Queijo do Serro, Serro-MG, com três repetições adicionando-se três concentrações (10^1, 10^2 e 10^3 UFC.mL^{-1}) de *L. innocua* no leite para fabricação de queijo Minas artesanal. Cada lote continha entre 10 e 13 unidades experimentais. Em seguida, foram feitas análises de detecção e contagens de *L. innocua* nos tempos 3, 7, 14, 22, 30, 45 e 60 dias. Foram feitos também controles negativos, que consistiram na fabricação de queijos não-inoculados com *L. innocua*.

3.7.1. Delineamento estatístico

O experimento foi feito em delineamento inteiramente casualizado, sendo o tempo e o microrganismo os fatores estudados. Os logaritmos das contagens foram analisados adequadamente por meio de regressão linear e, ou, pelo teste de Tukey, quando foi o caso. Para análise de regressão foram aceitos os modelos que apresentaram nível de significância igual ou menor que 5 % para modelo e para coeficientes linear e quadrático, quando for o caso. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS) versão 9.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Características físico-químicas do fermento natural e do queijo Minas artesanal do Serro produzido nas propriedades selecionadas

A Tabela 10 mostra os resultados das propriedades fisico-químicas das amostras de fermentos naturais utilizadas no processo de fabricação dos queijos nas três unidades produtoras avaliadas.

Tabela 10 – Propriedades fisico-químicas do fermento natural utilizado para fabricação do queijo Minas artesanal do Serro em três unidades produtoras

Produtor	Número	pH	Acidez titulável	Cloretos
A	3	4,95 a	0,69 c	10,14 a
B	3	4,15 b	1,26 a	7,24 ab
C	3	5,08 a	0,84 b	5,36 b

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Os resultados mostraram grande variação nestas características entre os fermentos naturais utilizados pelos três produtores (Tabela 10). Trabalhos conduzidos por Pimentel Filho *et al*. (2005) apresentaram resultados que variaram de 3,55 a 22,48 % (m/m) de cloretos e 5,03 a 6,86 de pH. Os valores de pH do fermento são afetados, dentre outros fatores, pela concentração de

sal e pelo crescimento da microbiota existente nele. Quanto maior o tempo que o fermento permanece em temperatura ambiente, maior será o crescimento microbiano e, conseqüentemente, menor o pH. Não existe padronização do tempo de coleta do fermento e tão pouco na quantidade de sal adicionada ao queijo, o que ocasionam as grandes diferenças na composição final dos fermentos na hora da fabricação. Torna-se desejável a utilização de fermentos com pH inferior a 4,4, uma vez que neste pH há inibição do crescimento da microbiota patogênica, eliminando-a com o tempo, além de predominar nestes fermentos as bactérias láticas. Sob o ponto de vista tecnológico, estes fermentos podem contribuir de forma efetiva para discrepância acentuada na composição fisico-química dos queijos.

Os queijos fabricados com os fermentos analisados anteriormente apresentaram diferenças significativas nas propriedades fisico-químicas entre os queijos produzidos nas três unidades produtoras do Serro, como é mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Características fisico-químicas do queijo Minas artesanal do Serro com sete dias de maturação

Produtor	pH	Gordura	Umidade	Cloretos	Nitrog. Total	Proteínas
A	5,06 a	29,96 b	45,34 b	1,25 b	3,80 a b	22,62 c
B	5,05 ab	28,74 b	48,77 a	1,14 b	4,09 a	24,96 a
C	4,96 b	33,22 a	43,28 b	1,48 a	3,77 b	23,54 b

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Pode-se observar que os valores encontrados para gordura, umidade e cloretos encontram-se dentro dos limites encontrados pela APAQS (2006) mostrados na Tabela 3. Os teores de proteína dos queijos fabricados pelos produtores B e C encontram-se acima do limite verificado pela APAQS (2006), que é de 23,18 % (m/m). A atividade de água, extensão e profundidade da maturação não diferiram ($p \geq 0,05$) pelo teste de Tukey, apresentando médias de 0,93, 10,47 e 5,00, respectivamente.

Martins (2006) encontrou resultados de teor de proteína semelhantes aos encontrados neste estudo para o teor de proteínas; no entanto, os valores de atividade de água foram superiores aos verificados neste trabalho. Todas as

outras propriedades físico-químicas avaliadas nos queijos foram semelhantes aos diversos estudos feitos com queijos artesanais na Região do Serro, como é mostrado na Tabela 11.

4.2. Características microbiológicas do fermento natural e do queijo Minas artesanal do Serro

Os resultados das análises microbiológicas do fermento natural estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Valores dos logaritmos decimais das contagens de coliformes totais e de *S. aureus* de fermentos naturais obtidos de três produtores diferentes

Produtor	Coliformes totais	*S. aureus*
	Log UFC.mL^{-1}	
A	2,07 b	3,84 a
B	2,50 b	1,77 b
C	3,55 a	3,34 a

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

O fermento natural utilizado para fabricação dos queijos pelo produtor "C" foi o que apresentou maior contaminação por coliformes e *S. aureus,* sendo que este último apresentou médias iguais, estatisticamente, ao fermento utilizado pelo produtor "A" ($p \geq 0,05$). Comparando-se com a Tabela 12 verifica-se que o fermento utilizado pelo produtor "C" foi o que apresentou maior valor médio de pH e o menor índice de cloretos, o que pode ter contribuído para que o fermento apresentasse concentrações mais elevadas destes contaminantes. O pH médio de 4,15 pode ter contribuído para o baixo número de *S. aureus* e *coliformes totais* no fermento do produtor "B". A menor contagem de coliformes totais do queijo do produtor "A" pode ser atribuída ao elevado teor de cloretos nesse fermento, que apresentou média de 10,14 % (m/m). Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as contagens de *E. coli* nos fermentos dos três produtores avaliados, sendo a média obtida de 1,60.

Os valores de *E. coli*, *S. aureus* e coliformes totais em fermentos naturais encontrados por Martins (2006) no fermento natural são similares aos verificados neste estudo.

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos fabricados nas três unidades produtoras estudadas estão apresentados na Tabela 13. Não foi detectada presença de *Listeria* sp. e *Salmonella* sp. nas amostras analisadas.

Tabela 13 – Valores dos logaritmos decimais das contagens de coliformes totais, *S. aureus*, *E. coli*, mesófilos aeróbios e bactérias láticas dos queijos avaliados nas três unidades produtoras

Produtor	**Coliformes Totais**	***S.aureus***	***E. coli***	**Mesófilos Aeróbios**	**Bactérias Láticas**
			Log UFC.g^{-1}		
A	3,69 a	4,04 a	3,24 a	8,66 a	7,18 b
B	3,39 b	3,66 b	2,40 b	8,73 a	7,54 a
C	3,79 a	3,95 a b	3,29 a	7,94 b	7,76 a

Nas colunas, médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \geq 0,05$).

Os fermentos com maiores contaminações por *S. aureus* (produtores “A” e “C”, Tabela 13) foram os que originaram queijos mais contaminados com esta bactéria, como pode ser observado na Tabela 12 e 13. Este resultado reforça a evidência de que o fermento natural exerce efeito nas contagens finais de *S. aureus* e outros patógenos por ele carreado. No entanto, a contagem de *S. aureus* verificada no queijo do produtor “B”, cujo fermento continha baixa concentração de *S. aureus*, mostrou-se elevada não diferindo da contagem observada no queijo do produtor “C”, que utilizou fermento natural com alto número de *S. aureus*. A partir destes resultados fica evidente que a contaminação do fermento natural não é o único fator decisivo para garantir a fabricação de queijo com baixa contaminação deste patógeno. As condições higiênicas dos manipuladores e da qualidade microbiológica do leite também devem ser controladas para prevenir a contaminação do leite e do produto final.

4.3. Efeito antagônico *in vitro* do fermento natural do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua* e *L. monocytogenes*

Não houve diferença nos valores de pH em LDR 12 % inoculados com diferentes doses de fermento em cada tempo isoladamente ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey. Os coeficientes angulares das curvas de pH referentes às três doses de fermento e ao controle também não diferiram ($p \geq 0,05$). Os coeficientes angulares das curvas de crescimento de *L. innocua* em LDR 12 % associados com as doses 0 e 0,1 de fermento não diferiram, indicando que o comportamento desta bactéria nas diferentes doses testadas foram iguais. Os coeficientes angulares das curvas referentes às doses 0,3 e 0,5 mL também não diferiram entre si ($p \geq 0,05$); no entanto, foram maiores do que aqueles observados nas doses menores. O comportamento de *L. innocua* pelas diferentes doses do fermento natural podem ser observados na Figura 5 e na Tabela 14.

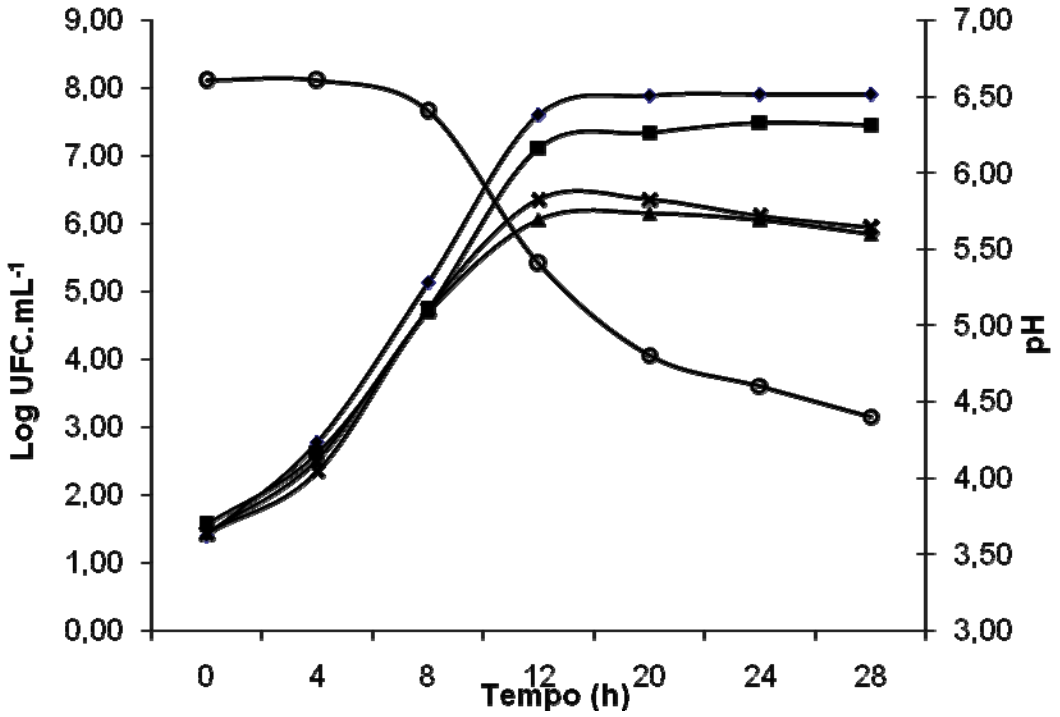


Figura 5 – Efeito de diferentes doses de fermento natural inoculado em LDR 12 % e sobre *L. innocua*: (♦) dose zero; (■) dose 0,1 mL; (▲) dose 0,3 mL (x); dose 0,5 mL; e (○) pH.

Tabela 14 – Equações dos comportamentos de *L. innocua* desafiadas com diferentes doses de fermento natural em LDR 12 %

Volume do Fermento Natural	Equação	r^2
0 mL	$y = -0{,}2733x^2 + 3{,}3488x - 2{,}1386$	0,9699
0,1 mL	$y = -0{,}2336x^2 + 2{,}9443x - 1{,}6414$	0,9628
0,3 mL	$y = -0{,}2594x^2 + 2{,}8856x - 1{,}3586$	0,9533
0,5 mL	$y = -0{,}2425x^2 + 2{,}7204x - 1{,}3586$	0,9703
pH	$y = 0{,}0389x^3 - 0{,}469x^2 + 1{,}1778x + 5{,}8571$	0,9836

Quando *L. monocytogenes* foi desafiada com as diferentes doses do fermento natural utilizadas, também não houve diferença ($p \geq 0{,}05$) nos coeficientes angulares das retas. Apenas o coeficiente angular da curva de crescimento em LDR 12 % associado com a dose de 0,5 mL de fermento diferiu ($p < 0{,}05$) das outras curvas que, por sua vez, não diferiram entre si ($p \geq 0{,}05$) como mostram a Figura 6 e a Tabela 15.

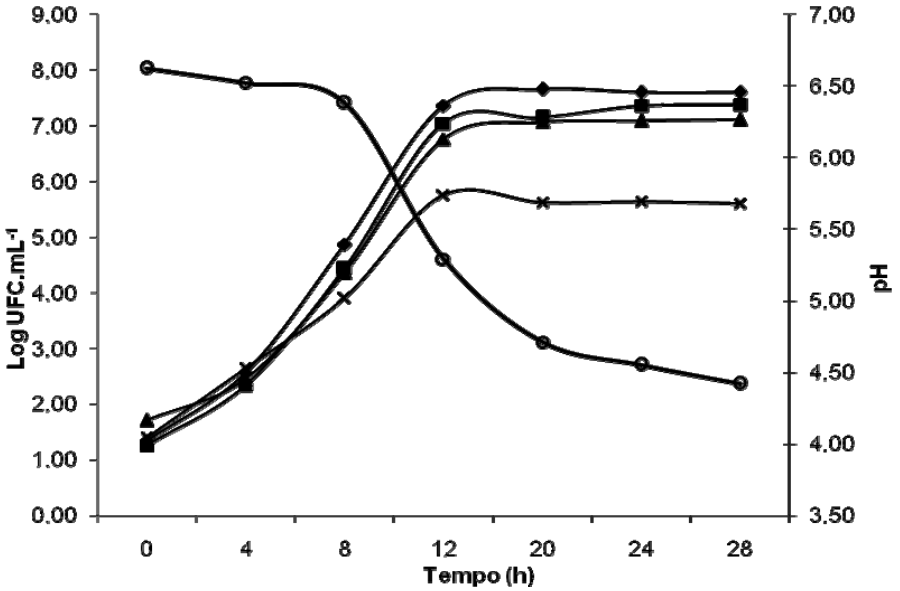


Figura 6 – Efeito de diferentes doses de fermento natural inoculado em LDR 12 % e do pH sobre *L. monocytogenes*: (♦) dose zero; (■) dose 0,1 mL (▲); dose 0,3 mL (x); dose 0,5 mL; e (○) pH.

Tabela 15 – Equações dos comportamentos de *L. monocytogenes* desafiadas com diferentes doses de fermento natural em LDR 12 %

Volume do Fermento Natural	Equação	r^2
0 mL	$y = -0{,}2663x^2 + 3{,}2608x - 2{,}1557$	0,9640
0,1 mL	$y = -0{,}2344x^2 + 2{,}9849x - 1{,}9771$	0,9592
0,3 mL	$y = -0{,}2055x^2 + 2{,}6495x - 1{,}2743$	0,9506
0,5 mL	$y = -0{,}1980x^2 + 2{,}3127x - 0{,}9329$	0,9670
pH	$y = 0{,}0400x^3 - 0{,}4708x^2 + 1{,}1306x + 5{,}9129$	0,9777

Os resultados apresentados indicam que a inibição de *L. innocua* e *L. monocytogenes* pelo fermento não deve ser atribuída exclusivamente ao decréscimo do pH resultante da produção de ácidos orgânicos. Algumas espécies de bactérias láticas presentes no fermento natural podem produzir compostos antimicrobianos exercendo, assim, efeito inibitório sobre os microrganismos estudados. Estudos mostram a produção de bacteriocinas por bactérias láticas, como *Lactococcus,* (MCAULIFFE *et al*., 1998; MAO *et al*., 2001) com efeito inibidor sobre *L. monocytogenes*. Castellano *et al*. (2001) também verificaram efeito inibidor de bacteriocina produzida por *Lactococcus* sobre *L. monocytogenes* e *L . innocua*. Hoover *et al*. (1988) e Pucci *et al*. (1988) verificaram efeito inibitório de bacteriocina produzida por *Pediococcus* sobre *L. monocytogenes*.

Harris *et al*. (1989) demonstraram poder inibitório de bacteriocinas produzidas por *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* sobre oito estirpes de *L. monocytogenes*. Motlagh *et al*. (1992), Lewus *et al*. (1992), Blom *et al*. (1999) e Callewaert *et al*. (2000) observaram efeito inibitório de bacteriocinas produzidas por bactérias láticas sobre *Listeria*.

A inibição observada após o período de 12 horas pode ser atribuída ao sinergismo de compostos produzidos por bactérias láticas e ao decréscimo do pH. Os coeficientes angulares das equações de *L. innocua* e *L. monocytogenes* analisados separadamente em cada dose não diferiram entre si ($p < 0{,}05$) pela análise de regressão.

Verificou-se que, à medida que a concentração do fermento natural aumentou, o crescimento de *L. monocytogenes* e *L. innocua* diminuiu, evidenciando, assim, o seu efeito inibitório como é mostrado na Tabela 16.

Tabela 16 – Logaritmos decimais das contagens (UFC.g^{-1}) de *L. innocua* e *L. monocytogenes* em leite inoculado com diferentes concentrações de fermento

Dose de Fermento em 200 mL de Leite	***Listeria innocua* (log UFC.mL^{-1})**		***Listeria monocytogenes* (log UFC.mL^{-1})**	
	Tempo 0	**Máximo**	**Tempo 0**	**Máximo**
0	1,39 aA	7,90 aA	1,33 aA	7,65 aA
0,1	1,55 aA	7,49 aA	1,26 aA	7,37 aA
0,3	1,34 aA	6,15 bB	1,70 bA	7,10 aA
0,5	1,43 aA	6,35 bB	1,59 bA	6,72 bA

Letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey. Letras maiúsculas na linha iguais e de mesma cor não diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Quanto maior a dose de fermento inoculado maior a contagem de bactérias láticas para sobrepujar o crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes*, pela produção de compostos que exercem efeito antagônico e, ou, pelo decréscimo do pH.

Não houve diferença no crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* no controle e na dose 0,1 mL ($p \geq 0,05$). No entanto, as doses 0,3 e 0,5 mL de fermento natural foram mais efetivas contra *L. innocua* do que *L. monocytogenes* ($p > 0,05$).

Estudos relatam o uso de *L. innocua* em substituição a *L. monocytogenes* destacando comportamentos similares de ambas as espécies a tratamentos térmicos e acidez em frangos e vinhos (FERNANDES *et al*., 2007; LEPCONTE *et al*., 2008). Char *et al*. (2009) verificaram a similaridade nos resultados referentes à resistência à acidez e ao tratamento térmico que justificaram o uso de *L. innocua* como indicadora do comportamento a *L. monocytogenes* em suco de laranja.

4.4. Efeito antagônico *in loco* da microbiota endógena do queijo Minas artesanal do Serro sobre *L. innocua*

A presença de *L. innocua* não foi verificada nas amostras de queijo Minas artesanal produzidas como tratamento-controle. Nas amostras de queijos fabricadas com leite inoculado com população de 10^1, 10^2, 10^3 UFC.mL^{-1} de *L. innocua* observou-se aumento de, aproximadamente, dois ciclos log no número desta bactéria na massa do queijo (Figura 7). Este aumento é em razão da concentração da população de células pela remoção do soro. A redução do número de células viáveis de *L. innocua* foi observada nas amostras analisadas a partir do 20º dia de maturação dos queijos (Figura 7). A redução na população aos 60 dias de maturação foi de, aproximadamente 1 ciclo log independentemente do número inicial de *L. innocua* adicionada ao leite para fabricação do queijo. A perda de viabilidade de células de *L. innocua* ao longo da maturação do queijo Minas pode ser atribuída à presença de compostos antagônicos produzidos por bactérias láticas (PITT *et al*., 1999) e também às mudanças físico-químicas ocorridas nos queijos ao longo do tempo de maturação. Os resultados mostraram que a ação da microbiota endógena do leite adicionada à ação do fermento não foram suficientes para garantir a ausência de *L. innocua* mesmo após 60 dias de maturação (Tabela 17). Com base nesses resultados, pode-se inferir que a ausência de *Listeria* em queijos do Serro, relatados em diversos trabalhos científicos (Tabela 12), pode estar relacionada à ausência deste microrganismo no leite.

Como base nos dados apresentados na Figura 7, pode-se observar que o comportamento de *L. innocua* ao longo de 60 dias foi similar, independentemente do número inicial nas três doses estudadas. As curvas e equações obtidas são úteis para estimar o tempo necessário para completa eliminação de *L. innocua*, em função da população inicial verificada. Morgan *et al*. (2000) detectaram *L. monocytogenes* em queijos frescos inoculados com 10 e 10^2 UFC.mL^{-1} após 42 dias de maturação sob temperatura ambiente e sob refrigeração. Os autores atribuíram o decréscimo na população de *L. monocytogenes* aos baixos valores de pH do queijo durante o intervalo de pH correspondente a 4,25 (7 dias de maturação) até 4,97 (28 dias de maturação). Após este período, a população permaneceu a mesma até 42 dias

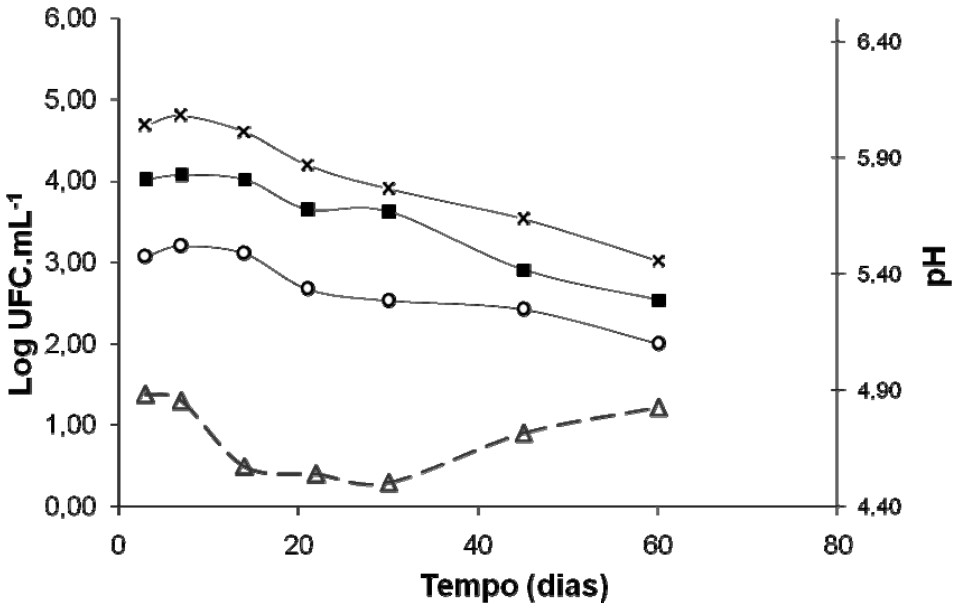


Figura 7 – Efeito antagônico *in loco* da microbiota endógena do queijo Minas artesanal do Serro sobre diferentes concentrações de *L. innocua* e pH*:* (x) 10^3 UFC. mL^{-1}; (■) 10^2 UFC. mL^{-1}; (o) 10^1 UFC. mL^{-1}; e (Δ) pH.

Tabela 17 – Equações obtidas para o comportamento de *L. innocua* em queijo e do pH do produto durante 60 dias de maturação

População inicial de *L. innocua* (UFC.mL^{-1} leite)	**Equação**	r^2
10	$y = -2 \times 10^{-5} x^2 - 0{,}0301x + 4{,}9026$	0,9780
10^2	$y = -0{,}0002x^2 - 0{,}0146x + 4{,}1572$	0,9706
10^3	$y = -2 \times 10^{-5} x^2 - 0{,}0215x + 3{,}2471$	0,9255
pH	$y = 0{,}0004x^2 - 0{,}0269x + 4{,}952$	0,8212

de maturação. Kovincic *et al*. (1991) atribuíram a sobrevivência de *L. monocytogenes* em queijos, principalmente ao pH e à temperatura de estocagem.

Estudos mostram que queijos frescos com pH próximo a 4,5 e 2 % de sal mostraram-se efetivos para inibição deste patógeno, mas, ainda, permitiram a sobrevivência por pelo menos 90 dias de estocagem a 4 ºC. (PAPAGEORGIOU e MARTH, 1989; GENIGEORGIS *et al*., 1991). Os teores de cloretos encontrados nos queijos elaborados com diferentes doses de *L. innocua* ultrapassaram 2 % somente após 30 dias de maturação (Figura 8). Durante os

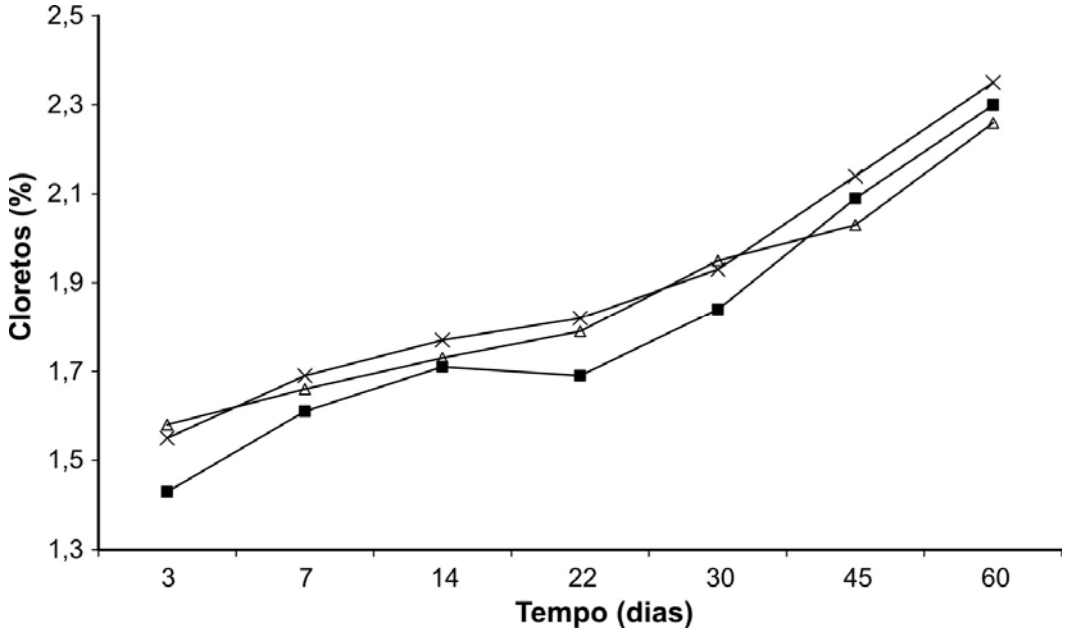


Figura 8 – Teores de cloretos do queijo Minas artesanal do Serro inoculados com diferentes concentrações de *L. innocua*: (■) 10^3 UFC.mL^{-1}; (x) 10^2 UFC. mL^{-1}; e (Δ) 10^1 UFC. mL^{-1}.

60 dias de maturação os valores de pH situaram-se entre 4,50 e 4,87 (Figura 8) e é provável que o sinergismo dos valores de pH e cloretos possam ter contribuído para diminuição das contagens de *L. innocua*.

Rogga *et al*. (2005) detectaram presença de *L. monocytogenes* em queijos Galotyri, elaborados a partir de leite cru e leite pasteurizado e estocados a 4 e 12 ºC após 28 dias de maturação. Os autores verificaram que a inoculação de 10^3 UFC.mL^{-1} e de 10^7 UFC.mL^{-1} de *L. monocytogenes* no leite, a temperatura de estocagem e o tratamento térmico do leite não afetaram a sobrevivência de *L. monocytogenes*.

Leuschner e Boughtflower (2002) demonstraram que *L. monocytogenes* pode sobreviver em queijos frescos elaborados com leite cru mesmo que a concentração inicial no leite seja de 1 a 10 UFC.mL^{-1}. A Tabela 18 mostra os resultados correspondentes às médias das contagens de *L. innocua* nos queijos inoculados com os três valores de população inicial de *L. innocua* até os 60 dias de maturação.

Analisando a redução média da população de *L. innocua* após 60 dias de maturação, verifica-se que a inoculação de um maior número de *L. innocua* inoculada resulta em maior redução (1,66 ciclos Log). Efeito similar pode ser

Tabela 18 – Logaritmos decimais das contagens (UFC.g^{-1}) de *L. innocua* em queijo Minas artesanal do Serro

Concentração de *L. innocua* no Leite Imediatamente Antes da Fabricação UFC. mL^{-1}	*L. innocua* (log UFC.g^{-1})						
	Tempo (dias)						
	3	7	14	22	30	45	60
0	0	0	0	0	0	0	0
10	3,07c	3,20c	3,11c	2,67c	2,53c	2,42c	2,00c
10^2	4,03 b	4,08 b	4,02 b	4,66 b	3,63 b	2,91 b	2,54 b
10^3	4,68 a	4,80 a	4,61 a	4,20 a	3,90 a	3,53 a	3,02 a

Letras iguais na coluna não diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

observado comparando-se as reduções dos outros dois tratamentos (1,51 ciclos Log quando foram inoculadas 10^2 UFC.mL^{-1} e 1,07 ciclos Log quando inoculou-se 10 UFC.mL^{-1} de leite). Morgan *et al*. (2001) iniciaram a fabricação de queijos com leite apresentando contagens de 10^2 UFC.mL^{-1} de *L. monocytogenes* e verificaram reduções de 1 ciclo Log no interior dos queijos após 42 dias de maturação. Estes resultados são similares aos encontrados no presente estudo após 45 dias de maturação, quando a fabricação do queijo foi iniciada com 10^2 e 10^3 UFC.mL^{-1} do leite (Tabela 19). Embora alguns estudos relatam a eliminação de *L. monocytogenes* em queijos com 60 dias de maturação (AHMED e MARTH, 1990; MAHMOUD *et al*., 1992), Gameiro *et al*. (2007) verificaram a sobrevivência desse patógeno em queijos fabricados com leite cru de ovelha contaminados naturalmente por 120 dias.

4.5. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* em LDR 12 %

O efeito de diferentes concentrações de nisina, adicionada ao LDR sobre *S. aureus* está apresentado na Figura 9. Observou-se redução gradativa do crescimento quando as doses 100 e 200 IU.mL.$^{-1}$ foram utilizadas em relação ao controle. Foi observado também, um efeito bactericida sobre *S. aureus* quando foram utilizadas as doses 400 e 500 IU.mL^{-1} nas primeiras 48 h de incubação. A duração da fase estacionária de *S. aureus* no controle ocorreu entre 24 e 72 h após a incubação (Figura 9). As fases estacionárias observadas na presença das doses de 100 e 200 IU.mL^{-1} ocorreram entre 48 e

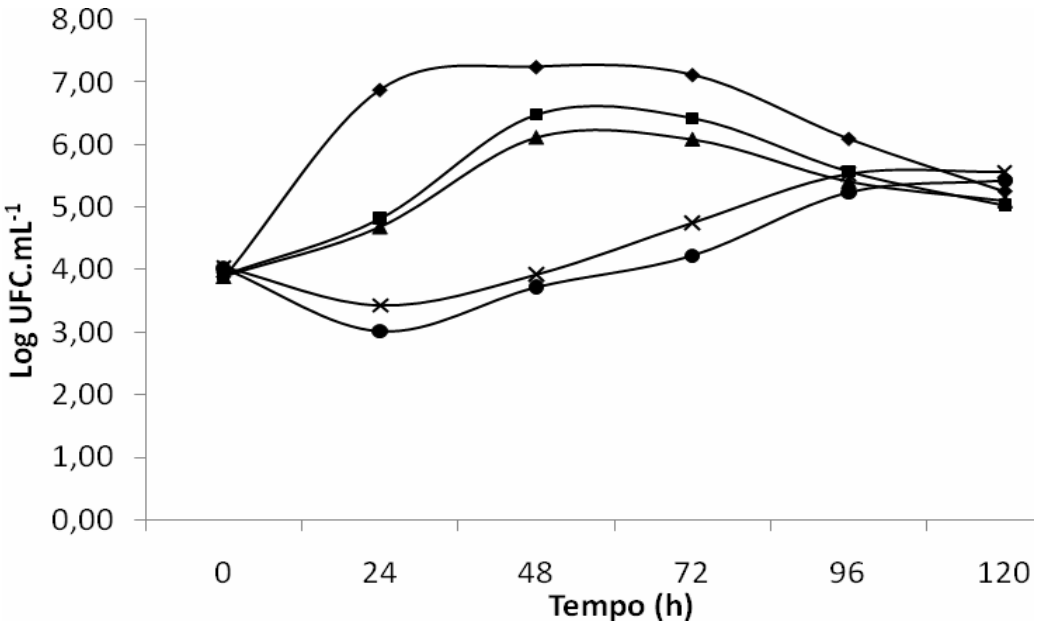


Figura 9 – Efeito de diferentes doses de nisina em LDR 12 % sobre *S. aureus*: (♦) 0, (■) 100 IU.mL^{-1}; (▲) 200 IU.mL^{-1}; (x) 400 IU.mL^{-1}; e (●) 500 IU.mL^{-1}.

72 h após o período de incubação, enquanto para as doses de 400 e 500 IU.mL^{-1} o intervalo observado foi 96 e 120 h. O tempo para o crescimento máximo e as concentrações máximas de *S. aureus* foram inversamente proporcionais à dose de nisina adicionada, conforme é apresentado na Tabela 19.

A concentração final de *S. aureus* em LDR observada nas amostras contendo nisina mostrou que esta bacteriocina é eficiente no controle deste microrganismo em leite. Estudos mostram que a efetividade de nisina diminui em função do aumento do tamanho da população do microrganismo-alvo (RAYMAN *et al.*, 1981; SCOTT e TAYLOR, 1981). Tal fato pode ser uma das explicações para o aumento da população de *S. aureus* após 24 horas em todos os tratamentos. Várias pesquisas relatam o uso de nisina na conservação de leite fluido. Takahashi *et al*. (2003) verificaram que 400 IU.mL^{-1} de nisina inibiram 26,2 % da cultura de *S. aureus* FRI-196E.

Wirjantoro e Lewis (1996) verificaram aumento da vida de prateleira de leite com 40 IU. mL^{-1} de nisina. Em estudo anterior, Fowler e Gasson (1991) relataram a extensão da vida de prateleira de leite pasteurizado integral por mais de 6 dias, com a adição de 20 a 400 IU. mL^{-1} de nisina. Wajid e Kalra (1976) reportaram a validade de 60 dias em leite de vaca esterilizado adicionado

Tabela 19 – Tempo e concentrações máximas de *S. aureus* em função de diferentes doses de nisina adicionadas em LDR 12 %

Dose de Nisina (IU. mL^{-1})	*S. aureus* Log UFC. mL^{-1} Inicial	Log UFC. mL^{-1} Máximo (horas de incubação)
0	3,88	7,24 (48 horas)
100	3,92	6,47 (48 horas)
200	3,89	6,11 (48 horas)
400	4,05	5,53 (96 horas)
500	4,03	5,42 (120 horas)

de 30 a 50 IU. mL^{-1} nisina em comparação a validade de 3 a 7 dias do leite sem nisina.

4.6. Efeito da adição de nisina sobre o crescimento de *S. aureus* no queijo Minas artesanal do Serro

Tanto o tempo quanto a dose de nisina adicionados ao queijo influenciaram ($p < 0,05$) no comportamento de *S. aureus*. A Figura 10 mostra a sobrevivência de *S. aureus* em queijos na ausência e na presença de concentrações de nisina. Observa-se que houve aumento da população de *S. aureus* na massa em relação ao leite no controle, enquanto nos queijos dos tratamentos com nisina houve redução em função, possivelmente, da atividade bactericida da bacteriocina. A redução foi diretamente proporcional à dose de nisina inoculada. A nisina foi efetiva na redução da população entre a inoculação de *S. aureus* no leite até o momento da obtenção da massa. Após esse período, a taxa de morte pode ter sido provocada pelas alterações físico-químicas (Tabela 20) do queijo, em função do tempo de maturação e também pela produção de ácidos orgânicos, bacteriocinas e outros compostos que agem sinergisticamente com nisina, aumentando a sua efetividade (PROCTOR e CUNNINGHAM, 1993; BUNCIC *et al*., 1995; AVERY e BUNCIC, 1997; ZAPICO *et al*., 1998; BOUSSOUEL *et al*., 2000; CHUNG e HANCOCK, 2000). No entanto, ao mesmo tempo outros fatores podem ter contribuído para diminuir a efetividade da nisina ao longo do tempo de maturação, como o aumento do pH e o crescimento da microbiota resistente à nisina residual no queijo (SCOTT e TAYLOR, 1981a,b; RAYMAN *et al*., 1981).

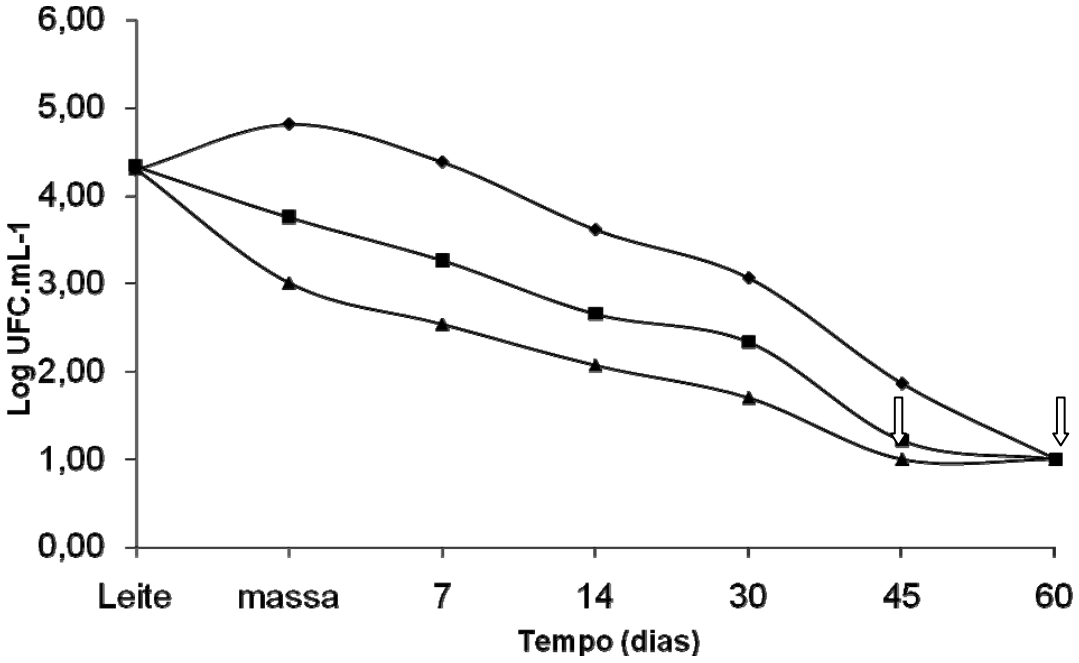


Figura 10 – Sobrevivência de *S. aureus* em queijos Minas artesanais do Serro, fabricados com diferentes concentrações de nisina: (♦) 0; (■) 100 $IU.mL^{-1}$; e (▲) 500 $IU.mL^{-1}$. As setas indicam contagens não-detectáveis pela técnica utilizada.

Houve diferença nos valores de pH dos queijos dos diferentes tratamentos em função do tempo ($p < 0,05$). As alterações dos valores de pH ocorridas nos queijos de todos os tratamentos e o controle durante os 60 dias de maturação podem não ter influenciado nas diferenças entre as contagens de *S.aureus* entre os tratamentos e o controle, uma vez que não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) quando analisados em cada tempo isoladamente, como mostra a Tabela 20.

A dose e a atividade do fermento natural podem ocasionar em variações dos valores de pH dos queijos. As doses de fermento utilizadas neste experimento foram padronizadas para que interferissem o mínimo possível na variação da acidificação dos queijos entre os diferentes tratamentos. Tal prática não é seguida pelos diferentes produtores e até mesmo entres os diferentes lotes fabricados por um mesmo produtor que ajusta a dose do fermento em função das estações do ano e até de dias chuvosos (PINTO, 2004). Tal fato pode contribuir de forma efetiva para a variação dos valores de pH encontrados nos diversos trabalhos envolvendo queijo do Serro (Tabela 9). A padronização da quantidade de fermento é impraticável, segundo a maioria dos produtores

Tabela 20 – Mudanças nas características físico-químicas dos queijos, nos diferentes tempos de maturação, em função das diferentes doses de nisina adicionadas

Dias	DN (IU. mL^{-1})	UMID (%)	GORD (%)	pH	CL (%)	a_w
7	0	44,63^b	24,17^a	4,85^a	1,78^b	0,94^a
	100	44,35^b	23,67^a	4,78^a	2,03^a	0,93^a
	500	46,73^a	23,17^a	4,84^a	2,21^a	0,94^a
14	0	38,47^a	27,83^a	5,01^a	1,96^b	0,92^a
	100	37,97^a	27,67^a	5,08^a	2,18^b	0,92^a
	500	37,07^a	26,38^a	5,12^a	2,44^a	0,92^a
30	0	29,29^b	32,37^a	5,13^a	2,24^b	0,88^a
	100	31,25^a	30,40^b	5,17^a	2,21^b	0,89^a
	500	32,39^a	32,10^a	5,21^a	2,55^a	0,89^a
45	0	24,78^b	34,47^a	5,20^a	2,37^b	0,86^a
	100	28,34^a	34,33^a	5,16^a	2,43^b	0,86^a
	500	27,16^a	33,03^a	5,24^a	2,87^a	0,87^a
60	0	23,12^a	37,67^a	5,22^a	2,41^b	0,83^a
	100	22,50^a	36,23^a	5,28^a	2,34^b	0,83^a
	500	23,26^a	36,17^a	5,28^a	2,90^a	0,85^a

Para cada tempo isoladamente, nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey. DN = dose de nisina; UMID = umidade; GORD = gordura; CL = cloretos; e a_w = atividade de água.

entrevistados por Pinto (2004), devido à microbiota do mesmo ser fortemente influenciada pelas condições climáticas.

O queijo Minas artesanal do Serro é consumido em média com 7 dias de maturação. No decorrer do período de maturação há aumento dos valores de pH, que está relacionado com a proteólise que ocorre neste período, com a utilização do ácido lático por outras bactérias ou leveduras e levá-lo à formação de compostos nitrogenados alcalinos (CORTEZ, 1998). Os resultados deste estudo são similares aos encontrados por Martins (2006) em queijos Minas artesanal do Serro maturado por 60 dias à temperatura ambiente.

Além da maturação e do fermento, a prensagem também tem influência no pH final do queijo, já que neste ponto da fabricação a massa ainda contém considerável teor de lactose, que depende do tratamento a que foi submetida a coalhada na elaboração, e que será eliminado se o queijo for adequadamente prensado (FURTADO, 1990).

Houve aumento ($p < 0,05$) dos teores de cloretos nas amostras de queijos de todos os tratamentos durante o período de maturação, devido à perda de umidade, em função do tempo prolongado de maturação. Uma

evidência da eficiência da nisina na inibição de *S. aureus* pode ser observada comparando-se os teores de cloretos dos tratamentos e o controle (Tabela 20). O queijo-controle e o queijo tratado com 100 IU. mL^{-1} de nisina apresentaram menores ($p < 0,05$) teores de cloretos, do que o queijo tratado com 500 IU. mL^{-1} durante o período de 60 dias de maturação, com exceção do sétimo dia onde os teores de cloretos dos dois tratamentos foram maiores ($p < 0,05$) que o queijo-controle. Os valores de cloretos encontrados no presente estudo são similares aos encontrados em estudo de maturação de queijo Minas artesanal do Serro, maturados sob temperatura ambiente (MARTINS, 2006). Thomas e Wimpenny (1996) verificaram que concentrações de cloretos acima de 2 % aumentam a eficiência da nisina contra *S. aureus*, tornando-se ainda maior quando associada às temperaturas baixas, que não foi o caso deste estudo. A dose de nisina a ser utilizada deve estar relacionada aos fatores intrínsecos de crescimento do microrganismo-alvo, como pH e concentração de cloretos, no alimento específico que exercem influência significativa no seu crescimento (FALEIRO *et al*., 2003; MILLET *et al*., 2006).

Nos queijos do Serro, como os outros queijos artesanais, a salga é feita com sal grosso ou sal refinado na superfície da massa. Segundo Jaramillo *et al*. (1999), neste método o sal atua de forma muito direta, dispersa-se rapidamente e acelera a expulsão do soro, sendo utilizado principalmente em queijos frescos, de consumo imediato. As variações dos teores de cloretos entre os tratamentos encontrados no presente trabalho foram mínimas, quando comparadas com outros trabalhos. Este fato pode ser explicado pela ausência de qualquer medidor que determine a dosagem exata de sal a ser adicionado na massa do queijo entre os produtores. Neste trabalho todas as etapas do processamento foram realizadas de modo que as variações ocasionadas por essa etapa fossem mínimas. Outro ponto determinante é a falta de controle do tempo de salga, contribuindo ainda mais para esta variação.

A umidade dos queijos diminuiu ($p < 0,05$) ao longo do tempo de maturação. Pequena diferença de umidade ($p < 0,05$) foi observada entre os queijos no sétimo dia e entre 30 e 45 dias de maturação. Com 7 dias de maturação, a umidade dos queijos tratados com 500 IU. mL^{-1} de nisina encontrava-se maior ($p < 0,05$) do que aquelas observadas nos queijos tratados com 100 IU. mL^{-1} e nos queijos-controle. Ainda que a umidade dos

queijos tratados com 500 IU. mL^{-1} seja mais favorável à sobrevivência de *S. aureus*, este tratamento foi o que apresentou maior taxa de morte do microrganismo, segundo as equações apresentadas na Tabela 21. Após 30 e 45 dias de maturação, os queijos dos diferentes tratamentos apresentaram umidade maior ($p < 0,05$) do que o controle. Com 60 dias de maturação, os queijos não apresentaram diferença ($p \geq 0,05$) nos valores de umidade.

Tabela 21 – Equações obtidas para o comportamento de *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro sob diferentes concentrações de nisina

Dose de nisina	Equação	r^2
0	$y = -0,122x^2 + 0,371x + 4,255$	0,979
100 IU.mL^{-1}	$y = -0,08x^2 - 0,502x + 4,830$	0,983
500 IU.mL^{-1}	$y = 0,066x^2 - 1,056x + 5,138$	0,978

O tempo total de fabricação do queijo do Serro é relativamente pequeno, o que contribui sensivelmente para um alto teor de umidade presente neste queijo durante os primeiros dias de fabricação. O conteúdo de umidade do queijo não é, em grande parte, afetado pelo pH durante a dessoragem, mas é determinado principalmente pela quantidade de sinérese ocorrida durante a fabricação. Quanto maior o tempo total de fabricação, maior a oportunidade de sinérese e menor o teor de umidade no queijo final (KINDSTEDT, 1997).

Verificou-se aumento dos teores de gordura nos queijos ($p < 0,05$) ao longo do tempo de maturação, provocado pela perda de umidade que promove o aumento da concentração dos solutos no queijo ao longo da maturação. Os teores de gordura verificados neste trabalho encontram-se abaixo daqueles encontrados por Martins (2006). Este fato pode ter sido ocasionado pelo grande período de estiagem na região (7 meses) antes da realização deste experimento. Somente no 30º dia de maturação o queijo inoculado com 100 IU mL^{-1} de nisina apresentou teor de gordura menor ($p < 0,05$) que os queijos inoculados com 500 IU. mL^{-1} e o controle. De acordo com o regulamento técnico de identidade dos queijos – Portaria nº 146/96 (BRASIL, 1996), os queijos do Serro podem ainda ser considerados semigordos, por estarem dentro da faixa de 25 a 44,9 % de gordura.

Segundo Eck (1987), a matéria gorda não participa na formação do coágulo, encontrando-se nele aprisionada de forma inerte. Quando à taxa de matéria gorda e o seu grau de dispersão aumentam, a sinérese é retardada. Uma pequena fração de matéria gorda é eliminada com o soro lático. Estas perdas aumentam com a riqueza do leite em matéria gorda e com a intensidade do trabalho mecânico, antes e depois da coagulação.

A a_w verificada nas amostras de queijos dos diferentes tratamentos diminuiu ($p < 0,05$) ao longo do tempo de maturação. Os valores de a_w encontrados no presente estudo encontram-se abaixo daqueles encontrados por Martins (2006). No entanto, o autor calculou a a_w por método indireto. Não houve diferença ($p \geq 0,05$) nos valores de a_w dos queijos dos diferentes tratamentos e do grupo-controle quando analisados isoladamente em cada tempo durante os 60 dias de maturação.

Além da umidade, outros parâmetros como os índices de maturação e o teor de sal também influenciam a a_w presente nos queijos. O teor de sal influencia devido ao seu baixo peso molecular e à sua alta solubilidade. O índice de maturação também interfere na a_w, devido ao efeito dos aminoácidos de cadeias laterais com grupos polares ou ionizáveis que interagem facilmente com a água, abaixando a a_w (FURTADO, 1990). Durante todo o período de maturação, a a_w é alterada, pois a desidratação contribui para o seu abaixamento.

Ainda que os valores de a_w encontrados nos queijos estejam abaixo do mínimo necessário para o crescimento de microrganismos patogênicos, a a_w não pode por si própria ser considerada uma barreira para inibição do crescimento de patógenos, uma vez que estes valores podem mudar em diferentes regiões do queijo, criando, assim microambientes que favoreçam o crescimento do patógeno (BERESFORD *et al*., 2001).

Houve aumento dos índices de maturação dos queijos de cada tratamento ($p < 0,05$) ao longo do tempo de maturação (Figura 11). Os queijos tratados com nisina apresentaram menor extensão e profundidade de maturação ($p < 0,05$) ao longo de 60 dias, em relação ao controle, em cada tempo analisado isoladamente. No entanto, diferiram entre si ($p < 0,05$) somente nos tempos 45 e 60 dias. Partindo de valores iguais de extensão e profundidade nos dois tratamentos, pode-se concluir que os queijos tratados com a maior dose de nisina apresentaram maior extensão e profundidade de

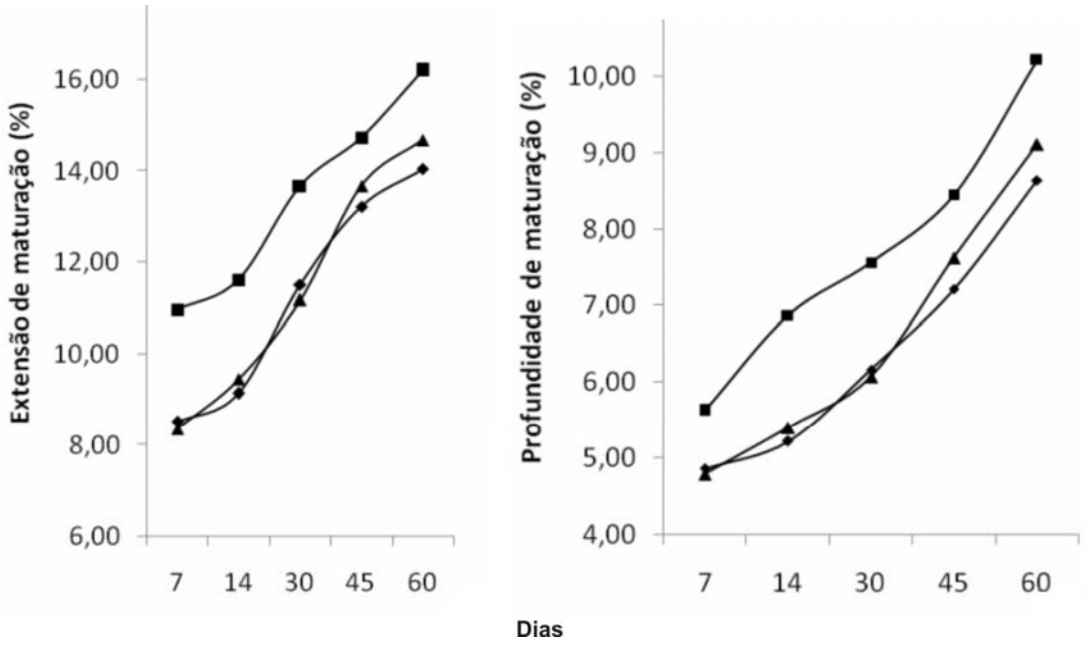


Figura 11 – Extensão e profundidade de maturação em queijos Minas artesanais do Serro, fabricados com diferentes concentrações de nisina: (■) 0; (♦) 100 IU.mL^{-1}; e (▲) 500 IU.mL^{-1}.

maturação ($p < 0,05$) depois de 60 dias maturados. Apesar de os queijos tratados com nisina apresentarem menor índice de proteólise durante a maturação, ainda assim estes valores foram similares aos encontrados por Martins (2006).

O menor índice de maturação nos queijos tratados com nisina em relação ao controle ($p < 0,05$), quando analisados isoladamente em cada tempo, pode ser explicado pela ação da nisina sobre a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas responsáveis pela proteólise do queijo durante a maturação (MONTVILLE e CHEN, 1998). De fato, os queijos tratados com nisina apresentaram menor contagem de bactérias láticas ($p < 0,05$) ao final dos 60 dias de maturação, como é mostrado na Figura 12. Os valores para extensão e profundidade de maturação em queijos Minas artesanais encontrados na literatura são variados. Em relação à extensão, essa variação é ocasionada pelo uso indiscriminado do coalho e a grande variação no tempo de coagulação (PINTO, 2004), já a profundidade varia possivelmente em virtude da microbiota diversificada presente no fermento natural.

Segundo BALDINI *et al*. (1998), a proteólise é o fenômeno mais importante que ocorre durante a maturação da maioria dos queijos e influencia fortemente suas características de aroma, sabor e textura. As bactérias láticas

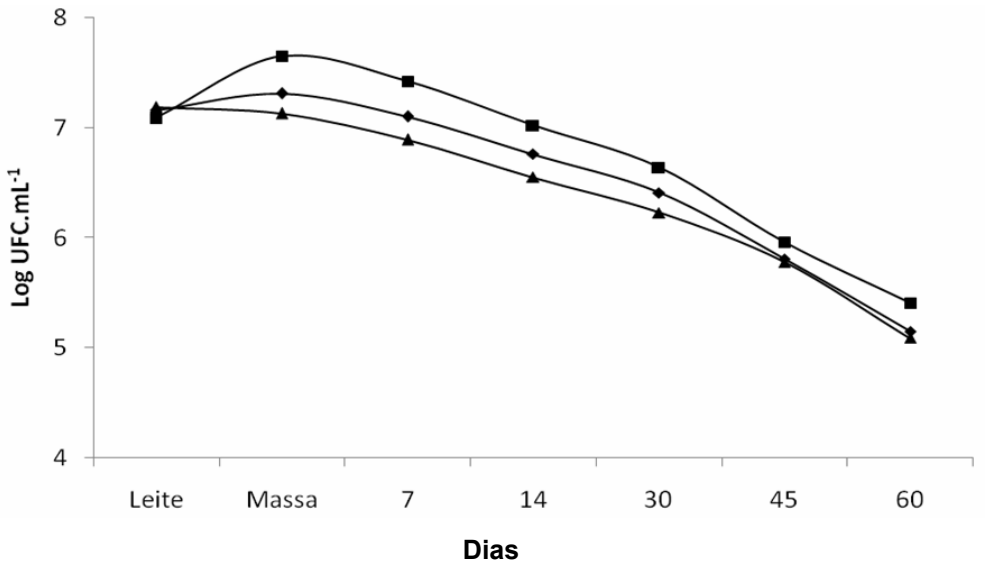


Figura 12 – Logaritmo do número de UFC.mL^{-1} de bactérias láticas em queijos Minas artesanais do Serro fabricados com diferentes concentrações de nisina: (■) 0; (♦) 100 IU.mL^{-1}; (▲) 500 IU.mL-1.

são as principais responsáveis pela formação de aminoácidos e pequenos peptídeos, em razão da natureza das enzimas proteolíticas encontradas nestes microrganismos (ECK, 1987).

Tanto o tempo quanto a dose de nisina influenciaram ($p < 0,05$) no comportamento de bactérias láticas ao longo do tempo. Observou-se aumento do número de bactérias láticas na massa em relação ao leite no grupo-controle. O mesmo não ocorreu com os queijos adicionados de nisina devido à ação da bacteriocina sobre diversas espécies de bactérias láticas (MORENO *et al*, 2000b). Este fenômeno foi similar ao ocorrido quando *S. aureus* foi avaliado (Figura 17), em que a maior efetividade da nisina ocorreu no intervalo entre a inoculação da nisina no leite e a obtenção da massa. Ao longo do tempo, a morte de bactérias láticas pode ser atribuída, além do efeito da nisina, às alterações físico-químicas ocorridas nos queijos em função da maturação. Avanços em engenharia genética, por meio da utilização de transposon, possibilitam a utilização de cultura *starter* resistente à ação da nisina (RAUCH e VOS, 1992). No entanto, atualmente isso não é aplicado em queijos Minas artesanais.

Não houve diferença ($p \geq 0,05$) entre as concentrações iniciais de bactérias láticas no leite. No entanto, as concentrações de bactérias láticas

diferiram entre si ($p < 0,05$) na massa e nos tempos 7, 14 e 30 dias, sendo que o controle apresentou as maiores médias destes microrganismos e o queijo tratado com a maior dose de nisina apresentou a menor média. Nos tempos 45 e 60 dias, o controle apresentou maior média ($p < 0,05$) do que os queijos tratados com nisina, que, por sua vez, não diferiram entre si ($p \geq 0,05$).

A adição de nisina em queijo Camembert, feito com leite cru, tem resultado na diminuição de cinco a seis ciclos Log na população de *L. monocytogenes* (Maisnier-Patin *et al*., 1992). Em ricota contendo nisina, a inibição de *L. monocytogenes* foi por mais de oito semanas estocadas a 6-8 ºC, enquanto o controle continha números não-aceitáveis do patógeno, ao longo de duas semanas (DAVIES *et al*., 1997). As contagens de *L. monocytogenes* reduziram sete ciclos log em queijos Cottage, contendo nisina e estocados a 20 ºC, em três dias, enquanto nos queijos-controle a redução foi de apenas um ciclo log após sete dias (FERREIRA e LUND, 1996).

Hamama *et al*. (2002) observaram ausência de *S. aureus* em queijos Jben inoculados (10^3 UFC.mL^{-1}) após três dias de estocagem a 4º C, utilizando-se culturas de *Lactococcus* produtoras de nisina. *S. aureus* foi detectado no mesmo período quando a cultura *starter* de *Lactococcus* não era produtora de nisina. Neste mesmo estudo, a cultura *starter* produtora de nisina não foi suficiente para eliminar uma população inicial de 10^5 UFC.mL^{-1} de *S. aureus* e nem impedir a produção de enterotoxinas.

O efeito inibitório de nisina sobre *S. aureus* em queijo Minas artesanal do Serro pode estar associado não só à concentração de nisina, mas, também, ao efeito sinergístico da microbiota endógena do leite, que produz antimicrobianos naturais, como ácido lático e peróxido de hidrogênio com conseqüente redução do pH.

4.7. Efeito da adição de nisina sobre as características mecânicas (TPA) do queijo Minas artesanal do Serro

A interação entre tempo e os tratamentos foi significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros: firmeza, fraturabilidade, elasticidade, gomosidade, mastigabilidade e coesividade. Não foi observada interação ($p \geq 0,05$) entre o tempo e os tratamentos para o parâmetro adesividade, cujas médias ao longo do tempo de

maturação foram de -0,003, -0,002 e -0,003 $N.cm^{-1}$ para o controle e os queijos tratados com 100 e 500 IU. mL^{-1}, respectivamente. Não foi observada diferença ($p \geq 0,05$) entre os queijos dos tratamentos com nisina e o controle ao longo do tempo de maturação, quando analisados isoladamente em cada tempo específico para os parâmetros analisados, exceto com relação à elasticidade (Tabela 22). Observou-se aumento da firmeza, gomosidade coesividade e mastigabilidade em relação ao tempo ($p < 0,05$), devido, provavelmente, à porosidade do queijo, que permite decréscimo da umidade, aumentando, assim, os valores dos parâmetros citados (ECK, 1987; DIMITRELI e THOMAREIS, 2007). Resultados similares foram encontrados por Green *et al*. (1986) e Stampanoni e Noble (1991), que observaram aumento dos valores desses parâmetros com redução do teor de umidade dos queijos. Creamer e Olson, (1986), Marshall (1990) e Dimitreli e Thomareis (2007) verificaram que o aumento do teor de proteínas e a penetração do sal na matriz protéica do queijo ocasionam aumento nos valores dos parâmetros acima avaliados.

Aumento da firmeza provocou, conseqüentemente, aumento ($p < 0,05$) da fraturabilidade dos queijos, em relação ao tempo de maturação. A fraturabilidade é influenciada pela a_w, pH, umidade e concentração de sal (LAWRENCE *et al*., 1897; FERNANDEZ DEL POZO, 1988; BUFFA *et al*., 2001;).

A elasticidade dos queijos aumentou ($p < 0,05$) com o tempo de maturação. Este fenômeno ocorre, provavelmente, em razão da atividade do coalho residual, que é o principal agente da proteólise primária, responsável pelo amaciamento da rede protéica, relaxando a cadeia e, aumentando, assim, a elasticidade do queijo (FOX 1993; PRENTICE *et al*., 1993). Nos tempos 14 e 30 dias de maturação, os queijos tratados com 500 IU.mL-1 de nisina apresentaram maior elasticidade. No entanto, com 60 dias de maturação não foi verificada diferença entre os queijos que continham nisina e os do tratamento-controle, sem nisina ($p \geq 0,05$).

Pinto (2004) relata que o queijo Minas artesanal do Serro é consumido principalmente até o sétimo dia de maturação. Isto pode ser explicado pelo fato de os parâmetros avaliados pelo perfil de textura serem aceitos ou não pelos consumidores, em função da expectativa que têm de cada queijo (FOEGEDING e DRAKE, 2007).

Tabela 22 – Perfil de Textura de queijo Minas artesanal do Serro tratado com diferentes doses de nisina ao longo do tempo de maturação

Maturação (dias)	DN	FIR	FRAT	GOM	COES	ELAST	MAST
7	0	47,59[a]	31,93[a]	26,76[a]	0,67[a]	6,39[a]	181,01[a]
	100	53,83[a]	59,44[a]	31,07[a]	0,60[a]	6,51[a]	210,50[a]
	500	57,44[a]	36,78[a]	24,24[a]	0,64[a]	6,44[a]	242,48[a]
14	0	135,04[a]	44,91[a]	53,29[a]	0,68[a]	6,07[b]	432,97[a]
	100	132,29[a]	87,55[a]	48,71[a]	0,66[a]	6,17[b]	487,16[a]
	500	139,02[a]	95,47[a]	59,52[a]	0,66[a]	7,37[a]	563,29[a]
30	0	192,28[a]	115,61[a]	68,35[a]	0,67[a]	5,86[b]	644,28[a]
	100	217,94[a]	146,97[a]	71,47[a]	0,66[a]	6,49[b]	714,86[a]
	500	201,21[a]	134,99[a]	76,70[a]	0,67[a]	7,48[a]	767,12[a]
45	0	243,76[a]	186,36[a]	72,82[a]	0,71[a]	6,57[b]	708,47[a]
	100	256,95[a]	180,97[a]	84,42[a]	0,71[a]	7,13[a]	780,79[a]
	500	272,33[a]	232,62[a]	84,71[a]	0,70[a]	7,54[a]	836,76[a]
60	0	453,78[a]	276,85[a]	98,15[a]	0,70[a]	6,69[a]	1116,45[a]
	100	423,76[a]	300,52[a]	104,57[a]	0,70[a]	7,17[a]	1073,68[a]
	500	434,96[a]	315,76[a]	116,61[a]	0,72[a]	7,52[a]	1166,33[a]

Para cada tempo, nas colunas, as médias seguidas pelas mesmas letras sobrescritas não diferem entre si ($p \geq 0,05$), pelo teste de Tukey. DN = dose de nisina (IU. mL^{-1}); FIR = firmeza (N); FRAT = fraturabilidade; GOM = gomosidade (N); COES = coesividade; ELAST = elasticidade; e MAST = mastigabilidade (N).

Estudos sobre o perfil de textura são de extrema importância no processo de caracterização dos queijos Minas artesanais, pois essa característica está diretamente relacionada com a aceitabilidade do consumidor. Além disto, estudos detalhados do perfil de textura desses queijos tornam-se valiosa ferramenta para diferenciar os queijos de uma região e possibilita que padrões rigorosos sejam estabelecidos.

6. CONCLUSÃO

Variações microbiológicas nas populações de *E. coli*, *S. aureus*, mesófilos aeróbios e bactérias láticas, encontradas nos queijos produzidos nas unidades estudadas, podem ter sido ocasionadas pelas variações, em relação ao pH, à acidez titulável e aos cloretos verificados no fermento natural utilizados nas três unidades produtoras. Pode-se concluir que se os fermentos naturais possuem propriedades diferentes, serão produzidos queijos com variações em suas características físico-químicas e microbiológicas, por conseguinte, os fermentos oriundos desses queijos apresentarão propriedades diferentes, tornando-se um ciclo.

Apesar da implementação de boas práticas de fabricação nas unidades selecionadas, os queijos analisados apresentaram contagens acima dos limites preconizados pela legislação de *E. coli* e *S. aureus*, oriundos, provavelmente, do leite cru.

O fermento natural inibiu o crescimento de *L. innocua* e *L. monocytogenes* no teste *in vitro*. A inibição foi diretamente proporcional à dose de fermento utilizada, sugerindo, assim, que aliado à maturação, o fermento pode eliminar os microrganismos presentes se a contaminação inicial do leite for menor do que as verificadas neste estudo.

A microbiota endógena do leite e o tempo de maturação de 60 dias não foram suficientes para eliminar *L. innocua* no queijo, quando o leite possuía contaminação inicial de 10 $UFC.mL^{-1}$ deste microrganismo. Este resultado

permite concluir que o queijo Minas artesanal do Serro pode carrear *Listeria* mesmo depois de 60 dias de maturação, quando o leite utilizado para fabricação conter pelo menos, 10 UFC.mL^{-1} de *Listeria*.

As doses de nisina adicionadas em LDR apresentaram efeito bactericida sobre *S. aureus*, aumentando a fase lag deste microrganismo no leite e diminuindo as concentrações máximas finais no leite.

A nisina apresentou eficiência contra *S. aureus* no queijo, principalmente na etapa de coagulação do leite e separação do soro. Este fato resultou em menores concentrações iniciais de *S. aureus* no queijo.

A utilização de nisina não implica em níveis aceitáveis de *S. aureus*, pois a dose a ser utilizada é dependente da contaminação inicial da matéria-prima. Sendo assim, ela pode ser eficiente no controle de *S. aureus* quando houver cuidados na obtenção da matéria-prima, e condições higiênicas de manipulação que minimizam a contaminação inicial do leite. Utilizando-se leites com baixas contagens de *S. aureus* e adicionando-se nisina ao processo de fabricação, os queijos produzidos podem apresentar contagens de *S. aureus* abaixo do limite preconizado pela legislação.

A adição de nisina ao processo de fabricação resultou em menor número de bactérias láticas no queijo. Este fato provocou menores índices de maturação nos queijos ao longo do tempo. No entanto, o mercado demanda queijos frescos, o que implica que esses menores índices de maturação não ocasionarão menor aceitabilidade desses queijos no mercado. Além disto, a nisina não provocou alterações nas características físico-químicas e mecânicas dos queijos, ao longo do período de maturação, de acordo com os resultados apresentados da análise de perfil de textura, evidenciando que a menor contagem de bactérias láticas não foi suficiente para ocasionar mudanças nos queijos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. Nisin in multifactorial food preservation. In: ROLLER, S. (Ed.) **Natural antimicrobials for the minimal processing of foods**. Cap. 2, England: Woodhead Publishing Limited, 2003.

AHMED, E. Y.; MARTH, E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Parmesan cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 3351-3356, 1990.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Mercosul/GMC/Resolução nº 79/1994. Regulamento técnico geral Mercosul de identidade e qualidade de queijos**. Disponível em: <http:/www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 15 jun. 2007.

APAQS. **Caracterização do queijo Minas artesanal do Serro**. Associação dos Produtores Artesanais do Queijo do Serro, dezembro, 2006.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. Viçosa: UFV. 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

AVERY, S. M.; BUNCIC, S. Antilisterial effect of a sorbate-nisin combination in vitro and on packaged beef at refrigeration temperature. **J. Food Prot.**, v. 60, p. 1075-1080, 1997.

BALDINI, V. L. S.; CAMPOS, S. D. S.; SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; LAJOLO, F. M. Alterações das características químicas e textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 15., 1998, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: ILCT, 1998, 300 p.

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

BLOM, H., KATLA, T., HOLCK, A., SLETTEN, K., AXELSSON, L., HOLO, H. Characterization, production, and purification of leucocin H, a two-peptide bacteriocin from Leuconostoc MF215B. **Curr. Microbiol**., v. 39, p. 43. 1999.

BORELLI, B. M. **Quantificação dos indicadores higiênico-sanitários e da diversidade de leveduras durante a fabricação do queijo Minas curado da Serra da Canastra-MG**. 2002. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

BORELLI, B. M.; FERREIRA, E. G.; LACERDA, I. C. A.; SANTOS, D. A.; CARMOS, L. S.; DIAS, R. S.; SILVA, M. C. C.; ROSA, C. A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.

BOWER, C. K.; PARKER, J. E.; HIGGINS, A. Z.; OEST, M. E.; WILSON, J. T.; VALENTINE, B. A.; BOTHWELL, M. K.; McGUIRE, J. Protein antimicrobial barriers to bacterial adhesion: in vitro and in vivo evaluation of nisin-treated implantable materials. **Colloids and Surfaces**, v. 25, p. 81-90, 2002.

BOUSSOUEL, N.; MATHIEU, F.; REVOL-JUNELLES, A.-M.; MILLIERE, J.-B. Effects of combinations of lactoperoxidase system and nisin on the behaviour of *Listeria monocytogenes* ATCC15313 in skim milk. **Int. J. Food Microbiol**., v. 61, p. 169-175, 2000.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Brasília, 3977-3986, 11 de março de 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério de Estado da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62, 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, 18 set. 2003, Seção I, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006**. Brasília, 2006. Diário Oficial da União de 14/12/2006, Seção 1, página 8.

BUFFA, M. M.; TRUJILLO, A. J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural and colour characteristics during ripening of chesses made from raw Milk, pasteurize dor high-pressure-treated goats' Milk. **International Dairy Journal,** v. 11. p. 927-934, 2001.

BUNCIC, S.; FITZGERALD, C. M.; BELL, R. G.; HUDSON, J. A. Individual and combined listericidal effects of sodium lactate, potassium sorbate, nisin and curing salts at refrigeration temperature. **J. Food Safety**, v. 15, p. 247–264, 1995.

CALLEWAERT, R.; HUGAS, M.; DE VUYST, L. Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococcus* in the production of spanish-style dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 57, p. 33, 2000.

CASTELLANO, P.; FARIAS, M. E.; HOLZAPFEL, W.; VIGNOLO, G. Sensitivity variations of Listeria strains to the bacteriocins, lactocin 705, enterocin CRL35 and nisin. **Biotechnol. Lett**., v. 23, p. 605, 2001.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; MESQUIARI, M.; RODRIGUES, R. Freqüência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 52, n. 299, p. 17-20, 1997.

CHAR, C.; GUERRERO, S.; ALZAMORA, S., M. Survival of *Listeria innocua* in thermally processed orange juice as affected by vanillin addition. **Food Control**, v. 20, p. 67-74, 2009.

CHEN, A. H.; LARKIN, J. W.; CLARK, C. J.; IRWIN, W. E. Textural analysis of cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 901-907, 1979.

CHUNG, W.; HANCOCK, R. E. W. Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol**., v. 60, p. 25-32, 2000.

CIMONS, M., Food safety concerns drive FDA review of fine cheeses. **ASM News**, v. 67, p. 1-6, 2001.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

CREAMER, L. K.; OLSON, N. F. Rheological evaluation of maturing Cheddar cheese. **Journal of Food Science**, v. 47, p. 631-646.

DAVIES, E. A.; BEVIS, H. E.; DELVES-BROUGHTON, J. The use of bacteriocin, nisin, as a preservative in ricota-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. **Appl Microbiology**, 24: 343-346, 1997.

DE BUYSER, M. L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, Issues 1-2, p. 1-17, 20 July, 2001.

DIMITRELI G.; THOMAREIS, A. S. Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. **Journal of Food Engineering**, v. 79, p.1364-1373, 2007.

DORES, M. T. **Implicações do processo de maturação a temperatura ambiente e sob refrigeração do queijo Minas artesanal da Canastra produzido na região de Medeiros, Minas Gerais**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

ECK, A. **O queijo**. Edição nº 137.024/5.141. Vol. 1, Coleção EUROAGRO, Portugal: Publicações Europa-América, 1987.

EL–GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Listeria monocytogenes and listeriosis related to milk, milk products and dairy ingredients: A review II. Listeria monocytogenes and dairy technology. **Milchwissenschaft**, v. 46, p. 82-86, 1991.

EMATER 2002. **Caracterização da região do Serro/MG como produtora de queijo Minas artesanal**. Serro, outubro/2002.

EMATER 2003. **Memória da reunião de 10/07/03 – Anexo 1: Programa de apoio aos queijos tradicionais de fabricação artesanal do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte** – Sede da EMATER.

EMATER 2004. **Caracterização da microrregião da Canastra como produtora de queijo Minas artesanal**. São Roque de Minas, 2004.

ESMOLAEVA, S.; NOVELLA, S.; VEGA, Y.; RIPIO, M. T.; SCORTTI, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Negative control of Listeria monocytogenes virulence genes by a diffusible autorepressor. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 601- 611, 2004.

ESTEPAR, J.; SANCHEZ, M. M.; ALONSO, L.; MAYO, B. Biochemical and microbiological characterization of artisanal 'Penãmellera' cheese: analysis of its indigenous latic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 737-746, 1999.

FALEIRO, M. L.; ANDREW P. W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 207-216, 2003.

FARIA, L. M. **Perfil microbiológico do queijo Minas fresco e após maturação de 30 e 60 dias em câmara fria produzido a partir de leite cru na região do Serro em Minas Gerais**. 2003. 43 f Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2003.

FARIAS, M. E. F.; HOLGADO, A. R.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inibition of foodborne pathogenes. **J. Food Protection**, v. 57, p. 1013-1015, 1994.

FERNANDEZ DEL POZO, B.; GAYA, P.; MEDINA, M.; RODRIGUEZ-MARIN, M. A.; RODRIGUEZ-MARÍN, M. A.; NUÑEZ, M. Changes in chemical and reological characteristics of La Serena ewe's milk cheese during ripening. **Journal of Dairy Research**, v. 52, p. 565-572, 1985.

FERNANDES, J.; GOMES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T. The antimicrobial eVect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. **Food Control**, v. 18, p. 1477-1483, 2007.

FERREIRA, M. A. S. S.; LUND, B. M. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long life cottage cheese. **Appl. Microbiology**, v. 22, p. 432-438, 1996.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. **Journal of Dairy Sci**., v. 90, p. 1611-1624, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Tradução de Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S/A, 2002.

FOWLER, G. G.; GASSON, M. J. Antibiotics - nisin. In: RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. (Ed.). **Food preservatives**. London, UK: Blackie Academic and Professional, 1991. p. 135-153.

FOX, P. F. **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. 2. ed., Vol. 1, General aspects. London UK: Chapman e Hall, 1993. 601 p.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: Tradição e história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, n. 210, p. 33-36, 1980.

GAMEIRO. N.; FERREIRA-DIAS S.; FERREIRA, M.; BRITO, L. Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe's milk cheese. **Food Control**, v. 18, p. 1258-1262, 2007.

GENIGEORGIS, C.; CARNICIU, M.; DUTULESCU, D.; FARVER, T. B. Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 ºC to 30 ºC. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 662-668, 1991.

GLASER, P.; FRANGEUL, L.; BUCHRIESER, C.; RUSNIOK, C.; AMEND, A.; BAQUERO, F. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 849-852, 2001.

GUERRA, M. M. M.; BERNARDO, F. M. A. Caracterização de efeitos inibidores de Listeria monocytogenes Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 96, n. 538, p. 65-69, 2001.

HAMAMA, A.; HANKOURI, N. E.; AYADI, M. E. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* straim during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 933-938, 2002.

HARRIS, L. J.; DAESCHEL, M. A.; STILES, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot**., v. 52, p. 384, 1989.

HILL, C.; COTTER, P. D.; SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G. M. Bacterial stress response in Listeria monocytogenes: jumping the hurdles imposed by minimal processing. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 273-283, 2002.

HOOVER, D. G.; WALSH, P. M.; KOLAETIS, K. M.; DALY, M. M. A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5.5-megadalton plasmid. **J. Food Prot**., v. 51, p. 29, 1988.

ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. 5. **Microbiological specifications of food pathogens**, London: Blackie Academic e Professional, 1996.

IEPHA. **Programa de Registro do Queijo do Serro como Patrimônio Imaterial**. Minas Gerais, Brasil, 2001.

JARAMILLO, M.; MEJIA, L. G.; SEPÚLVEDA, J. U. **Los quesos**. Universidad Nacional de Colombia – Medellin. Facultad de Ciencias Agropecuarias – Departamento de Ingenieria Agricola y Alimentos, 1999. 192 p.

KINDSTEDT, P. S.; GUO, M. R. Recent developments in the science and technology of pizza cheese. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 41-43, 1997.

KOVINCIC, I.; VUJCIC, I. F.; SVABIC-VLAHOVIC, M.; VULIC, M.; GAGIC, M.; WESLEY, I. V. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Trappist cheese. **Journal of Food Protection**, v. 54, p. 418−420, 1991.

LAWRENCE, R. C., CREAMER, L. C., GILLES, J. Textural developments during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 70, p. 1748-1760, 1987.

LE MARC, Y.; HUCHET, V.; BOURGEOIS, C. M.; GUYONNET, J.P.; MAFART, P.; THUAULT, D. Modeling the growth kinetics of Listeria as a function of temperature, pH and organic acid concentration. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 219- 237, 2002.

LEWUS, C. B.; SUN, S.; MONTVILLE, T. J. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, p. 143. 1992.

LEPCONTE, J.; KONDJOYAN, A.; SARTER, S.; PORTANGUEN, S.; COLLIGNAN, A. Effects of steam and lactic acid treatments on inactivation of *Listeria innocua* surface-inoculated on chicken skins. **International Journal of Food Microbiology**. Disponível em: <www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro>.. Acesso em: 12 jul. 2008.

LEUSCHNER, R. G. K.; BOUGHTFLOWER, M. P. Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovars typhimurium, enteritidis, and dublin. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 508-514, 2002.

LINTON, M.; MACKLE, A. B.; UPADHYAY, V. K.; KELLY, A. L.; PATTERSON. M. F. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 2008. Disponível em: < www.sciencedirect.com>. Acesso em: 12 jul. 2008.

LOESSNER, M.; GUENTHER, S.; STEFFAN, S.; SCHERER, S., A Pediocinproducing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1854-1857, 2003.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JUNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal do Serro, Minas Gerais. **Rev. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, out.-dez. 2004.

MACEDO, A. C.; COSTA, L. M.; MALCATA, F. X. Changes in the microflora of Serra cheese: evolution through ripening time, lactation period and axial location. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 79-94, 1996.

MAHMOUD, M. B.; JOHNSON, M. E.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 380-386, 1992.

MAISNIER-PATIN, S.; DESCHAMPS, N.; TATINI, S. R.; RICHAR, J. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. **Lait**, v. 72, p. 249-263, 1992.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 153-161, 2003.

MAO, Y.; MURIANA, P. M.; COUSIN, M. A. Purification and transpositional inactivation of lacticin FS92, a broad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. **Food Microbiol**., v. 18, p. 165. 2001.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da Região do Serro**. 2006. 158 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTINS, J. M.; PIMENTEL FILHO, N. J.; CORREIA, L. O.; FERRREIRA, D. S.; CUNHA, L. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Parâmetros microbiológicos de leite e água utilizados na fabricação de queijos Minas artesanais da Região do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 321-324, 2005.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; BARBOSA, T. S.; SILVA, T. T.; OLIVEIRA, R. C.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais produzidos na cidade de Serra do Salitre. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 320-324, 2004.

MARSHALL, R. J. Composition, structure, rheological properties and sensory texture of processed cheese analogues. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 50, p. 237-252, 1990.

McAULIFFE, O.; RYAN, M. P.; ROSS, R. P.; HILL, C.; BREEUWER, P.; ABEE, T. Lacticin 3147, a broadspectrum bacteriocin which selectively dissipates the membrane potential. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 64, p. 439. 1998.

McKELLAR, R. C.; LU, X.; KNIGHT, K. P. Proposal of a novel parameter to describe the influence of pH on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 73, p. 127-135, 2002.

MEYER–BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S.; RIVIERE, J.; CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 1-15, 2003.

MILLET, L.; SAUBUSSE, M.; DIDIENNE, R.; TESSIER, L.; MONTEL, M. C. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 105-114, 2006.

MOSSEL, D. A. A.; CORRY, J. E. L.; STRUIJK, C. B.; BAIRD, R. M. **Essentials of the microbiology of foods**. A textbook for advanced studies. New York: John Wiley e Sons Ltd., 1995.

O' DONNELL, E. T. The incidence of Salmonella and Listeria in raw milk from farm bulk tanks in England and Wales. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 48, p. 25-9, 1995.

MELO, N. R. **Avaliação de embalagem ativa por incorporação de nisina na inibição de *Staphylococcus* sp**. 2003. 73 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

MENENDEZ, S.; GODINEZ, R.; CENTENO, J. A.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows – milk cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 151-158, 2001.

MILLET, L.; SAUBUSSE, M.; DIDIENNE, R.; TESSIER, L.; MONTEL, M. C. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p. 105-114, 2006.

MINAS GERAIS. Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispões sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. **Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de Terceiros**, n. 21, de 1º fev. 2002.

MONTVILLE, T. J.; CHEN, Y. Mechanistic action of pediocin weaker and there was no activity for gram-negative and nisin: recent progress and unresolved questions. Appl. food pathogens and food spoilage organisms. **Microbiol. Biotech**, v. 50, p. 511-519, 1998.

MOR-MUR, M.; CARRETERO, C.; PLA, R.; GUAMIS, B. Microbiological changes during Ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. **Food Microbiology**, n. 11, p. 177-185, 1994.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; BALDINE, V. L. S.; LEITAO, M. F. F. Characterization of bacteriocins produced by Lactococcus lactis strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 184-192, 2000a.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; VIALTA, A.; LEITAO, M. F. F. Efeito da nisina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em diferentes linhagens de Lactococos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 55, n. 315, p. 35-40, 2000b.

MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M-P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made form raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, 64, p. 217-221, 2001.

MOTLAGH, A. M.; HOLLA, S.; JOHNSON, M. C.; RAY, B.; FIELD, R. A. Inhibition of *Listeria* spp. In sterile food systems by pediocin AcH, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. **J. Food Prot**., v. 55, p. 337, 1992.

NÓBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

OLARTE, C.; SANZ, S.; GONZALEZ-FANDOS, E.; TORRE, P. Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. **Food Microbiology**, v. 16, p. 615-621, 1999.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para a caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

PAPAGEORGIOU, D. K.; MARTH, E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of Feta cheese. **Journal of Food Protection**, v. 52, p. 82-87, 1989.

PARENTE, E.; ROTA, M. A.; RICCIARD, A.; CLEMENTI, F. Characterization of natural Starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**, v. 7, p. 775-783, 1997.

PIMENTEL FILHO, N. J.; MARTINS, J. M.; CUNHA, L. R.; LOPES, J. P.; FERNANDES, P. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Modulação de parâmetros microbiológicos e do pH pelo cloreto de sódio, no fermento endógeno utilizado na produção de queijo Minas artesanal do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 295-298, 2005a.

PIMENTEL FILHO, N. J.; MARTINS, J. M.; RAMOS, M. P. P.; ROSADO, M. S.; OLIVEIRA, N. P.; CUNHA, L. R.; COSTA, K. F.; FERREIRA, C. L. L. F. Características microscópicas de queijo Minas artesanal da Região do Alto Paranaíba. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 298-301, 2005b.

PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PINTO, M. S.; MARTINS, J. M.; ARAÚJO, R. A. B. M.; PIRES, A. C. S.; DUARTE, G. K.; CUNHA, L. R.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Programa de apoio ao queijo Minas artesanal produzido no Estado de Minas Gerais. Diagnóstico socioeconômico e cultural dos produtores e avaliação microbiológica do queijo Minas artesanal do Serro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, n. 339, p. 86-92, 2004.

PINTO, M. S.; PIRES, A. C. S.; PAULA, J. C. J.; FURTADO, M. M. Índice de *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* em queijos artesanais produzidos no Brasil e na Europa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 331-334, 2005.

PITT, W. M.; HARDEN, T. J.; HULL, R. R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. **Aust. J. Dairy Technol**., v. 54, p. 49-65, 1999.

POZNANSKI, E.; CAVAZZA, A.; CAPPA, F.; COCCONCELLI, P. S. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, Issue 2, p. 141-151, 2004.

PRENTICE, J. H.; LANGLEY, K. R.; MARSHALL, R. J. Cheese Rheology. In: FOX, P. F. **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. New York: Chapman e Hall, 1993. 599 p.

PROCTOR, V. A.; CUNNINGHAM, F. E. The antimicrobial properties of lysozyme alone and in combination with other additives in vitro and in selected meat products. **J. Rapid Methods Automat. Microbiol**., v. 145, p. 1227-1233, 1993.

PSONI, L.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. **Food Microbiology**, v. 20, p. 575-582, 2003.

PUCCI, M. J.; VEDAMUTHU, E. R.; KUNKA, B. S.; VANDENBURGH, P. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-I produced by Pediococcus acidilactici PAC 1.0. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 54, p. 2349. 1988.

RAPINI, L. S.; FEIJÓ, L. D.; VERAS, J. F.; NASCIMENTO, K. F.; AMADO, J.B.; COUTO, I. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Listeria* sp e *Staphylococcus* sp e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em queijo tipo coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 60-65, 2002.

RAUCH, P. J. G.; VOS, W. M. Characterization of the novel nisin sucrose conjugative transposon Tn 5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. **J. Bacteriol**., v. 174, p. 1280-1287, 1992.

RAYMAN, M. K.; ARIS, B.; HURST, A. Nisin: a possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 41, p. 375-380, 1981.

ROGGA, K. J.; SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; KATSIARI, M. C.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M.G. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4º C and 12º C. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 59-67, 2005.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in european red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 63, p. 91-98, 2001.

TARELLI, G. T.; CARMINATI, D.; GIRAFFA, G. Production of bacteriocins active against *Listeria innocua* from dairy enterococci. **Food Microbiology**, v. 11, p. 243-252, 1994.

TIENUNGOON, S.; RATKOWSKY, D. A.; MCMEEKIN, T. A.; ROSS, T. Growth limits of Listeria monocytogenes as a function of temperature, pH, NaCl, and lactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4979-4987, 2000.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ- BERNAL, G.; GOEBEL, W. Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, n. 3, p. 584- 640, 2001.

SCHILLINGER, U.; BECKER, G.; HOLZAPFEL, W. H. Efficacy of nisin combination with protective cultures against *Listeria monocytogenes* Scott A in tofu. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 159-168, 2001.

SCOTT, V. N.; TAYLOR, S. L. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **J. Food Sci**., v. 46, p. 117-120, 126, 1981a.

SCOTT, V. N.; TAYLOR, S. L. Temperature, pH and spore load effects on the ability of nisin to prevent outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. **J. Food Sci**., v. 46, p. 121-126, 1981b.

SEBTI, I.; COMA, V. Active edible polyssacharide coating and interactions between solution coating compounds. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, p.139-144, 2002

SILVA, J.G. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. 2007. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SILVA, J. V.; HOFFMANN, F. L.; MANSOR, A. P.; COELHO, A. R.; VINTURIM, T. M. Monitoramento da qualidade microbiológica de queijos tipo "Minas Frescal" fabricados artesanalmente. **Revista Indústria de Laticínios**, jul./ago. 2001, p. 71-75.

SOLANO-LÓPEZ, C.; HERNANDEZ-SÁNCHEZ, H. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua mexican cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 149-153, 2000.

STAMPANONI, C. R.; NOBLE, A. C. The influence of fat, acid and salt on the temporal perception of firmness, saltiness and sourness of cheese analogues. **Journal of Texture Studies**, v. 22, p. 381-392, 1991.

TAKAHASHI, H. T.; MIGLIORANZA, L. H. S.; GÓMEZ, R. J. H. C. Aplicação da nisina em leite cru para inibição de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos. **Revista Indústria de Laticínios**, jul./ago. v. 58 p. 78-84, 2003.

THOMAS, L. V.; WIMPENNY, J. W. T. Investigation of the effect of combined variations in temperature, pH, and NaCl concentration on nisin inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*.American. **Society for Microbiology**, v. 62. p. 2006-2012, 1996.

TOLEDO, M. M. **Crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCK 400 e produção de nisina em meio à base de extratos vegetais**. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

VARGAS, O. L.; PORTO, M. A. C.; BRITO, A. L. de. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: Município do Serro e de São Roque de Minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 53, n. 301/303, p. 19-49, jan./jun. 1998.

WAJID, H. R. A.; KALRA, M. S. Nisin as an aid for extending shelf life of sterilized milk. **J. Food Sci. Technol. (Mysore)**, v. 13, p. 6-8, 1976.

WIRJANTORO, T. I.; LEWIS, M. J. Effect of nisin and high temperature pasteurization on the shelf life of whole milk. **J. Soc. Dairy Technol**., v. 49, p. 99-102, 1996.

ZAPICO, P.; MEDINA, M.; GAYA, P., NUNEZ, M. Synergistic effect of nisin and the lactoperoxidase system on *Listeria monocytogenes* in skimmed milk. **Int. J. Food Microbiol**., v. 40, p. 35-42, 1998.

ZÁRATE, V.; BELDA, F.; PÉREZ, C.; CARDELL, E. Changes in the microbial flora of tenerife goats' milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 635-641, 1997.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo