



Universidade Norte do Paraná



**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE**

WILMAR KRÜGER D'ALMEIDA

**USO DA LACTOFERRINA NA CONSERVAÇÃO DO
QUEIJO MINAS FRESCAL**



Londrina
2010

WILMAR KRÜGER D'ALMEIDA

**USO DA LACTOFERRINA NA CONSERVAÇÃO DO
QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada à Universidade Norte do Paraná - UNOPAR, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite.

Orientadora: Profª Drª Marcela de Rezende Costa

Londrina
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de catalogação-na-publicação
Universidade Norte do Paraná
Biblioteca Central
Setor de Tratamento da Informação

D193u D'Almeida, Wilmar Krüger.
 Uso da lactoferrina na conservação do queijo Minas Frescal
/ Wilmar Krüger D'Almeida. Londrina: [s.n], 2010
 xii; 62p.

 Dissertação (Mestrado). Ciência e Tecnologia do Leite.
 Universidade Norte do Paraná.
 Orientadora: Prof^a Dr^a. Marcela de Rezende Costa

 1- Tecnologia do leite- dissertação de mestrado – UNOPAR 2-
 Leite 3- Vida-de-prateleira 4- Antimicrobianos naturais 5-
 Microorganismos deteriorantes 6- Microorganismos patogênicos
 I- Costa, Marcela de Rezende, orient. II- Universidade Norte do
 Paraná.

CDU 637.333

WILMAR KRÜGER D'ALMEIDA

USO DA LACTOFERRINA NA CONSERVAÇÃO DO QUEIJO MINAS FRESCAL

Dissertação apresentada à Banca Examinadora da Universidade Norte do Paraná – UNOPAR, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite, com nota igual à _____, conferida pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Prof^a. Dr^a. Marcela de Rezende Costa
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Lina Casale Aragon Alegro
Universidade Norte do Paraná

Prof^a. Dr^a. Raquel Guttierres Gomes
Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho a todos que, por valorizarem sua vida, buscam compreendê-la em sua essência e melhorá-la através dos recursos nutricionais disponibilizados em alimentos de forma natural, conquistando assim vitalidade, saúde e conseqüentemente qualidade de vida.

À minha amada esposa Maria, por seu estímulo e suporte em vários momentos e em especial na elaboração deste trabalho.

Aos meus amados filhos Wagner, Schélen, Caroline e Lucas, pelo constante incentivo.

À minha mãe Helga, que na sua simplicidade, doou sua vida a nossa criação, sempre nos estimulando e incentivando para o melhor de nossa formação pessoal e profissional, podendo assim servir ao nosso semelhante, em honra e glória ao nosso Criador.

AGRADECIMENTOS

À professora Orientadora Dra. Marcela de Rezende Costa, que em seu conhecimento, sabedoria e paciência apoiou-me no caminho da conquista dessa importante etapa de minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

As professoras Dra. Lina C. A. Alegro e Dra. Elza E. W de Santana, pelas sugestões e correções no projeto de dissertação.

Aos demais professores do Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) por seus ensinamentos e estímulos.

Ao Técnico Jorge Donato do Laboratório de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da UNOPAR por sua competência profissional e capacidade de promover um ambiente de união e alegria.

Aos queridos estagiários Kleber Elias, Alisson Santana e Edson Renato que possibilitaram de maneira imprescindível a execução dos trabalhos práticos e a obtenção dos resultados da pesquisa.

Aos queridos colegas de Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite da UNOPAR pelo clima de comum união no decorrer do curso.

Um agradecimento especial a Vallée S.A, que empreende a produção de insumos veterinários e a qual estou ligado profissionalmente, por me possibilitar a realização deste mestrado.

*E conhecerão a verdade e a verdade
libertará vocês.*

João 8:32

D'ALMEIDA, Wilmar Krüger. **Uso da lactoferrina na conservação do queijo Minas Frescal**. 2010. 62p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

RESUMO

A lactoferrina é uma proteína natural do leite que apresenta propriedades antimicrobianas. Assim, pode ser utilizada em produtos alimentícios, especialmente produtos lácteos, como conservante natural. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da lactoferrina sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal durante seu armazenamento refrigerado. Foram produzidos queijos sem e com a adição de 0,2% de lactoferrina, os quais foram armazenados durante 28 dias sob refrigeração (6°C). Os queijos tiveram sua composição centesimal analisada no primeiro dia após a fabricação e a análise sensorial (teste triangular) foi realizada no dia 7. Nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de armazenamento, foram avaliadas suas características microbiológicas (contagens de *Staphylococcus aureus*, microrganismos mesófilos, microrganismos psicotróficos, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras e pesquisa de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*), além do pH e da acidez. Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram submetidos à análise de variância e os da análise sensorial ao teste qui-quadrado. Não foram encontrados coliformes, *Listeria* e *Salmonella* nos queijos. Houve ação inibitória da lactoferrina ($p < 0,05$) sobre as contagens de bolores e leveduras, e de microrganismos psicotróficos no queijo Minas Frescal, a partir do 21º dia de armazenamento, além de pH mais baixo no dia 28 nos queijos com lactoferrina. A adição de lactoferrina não afetou as características sensoriais do queijo Minas Frescal.

Palavras-chave: leite, vida-de-prateleira, antimicrobianos naturais, microrganismos deteriorantes, microrganismos patogênicos.

D'ALMEIDA, Wilmar Krüger. **Use of lactoferrin to Minas Frescal cheese conservation.** 2010. 62p. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciência e Tecnologia do Leite) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2010.

ABSTRACT

Lactoferrin is an indigenous milk protein that shows antimicrobial properties. Thus, it can be used in food products, especially dairy products, as natural preservative. The objective of this study was to evaluate the effect of lactoferrin on physicochemical and microbiological characteristics of Minas Frescal cheeses under refrigerated storage. Cheeses with 0.2% of lactoferrin addition or not were produced, whom were stored during 28 days under refrigeration (6 °C). The cheeses had their centesimal composition analyzed on the first day after manufacture and the sensory analysis (triangular test) was performed on day 7. Their microbiological characteristics (*Staphylococcus aureus*, mesophilic microorganism, psychotropic microorganism, thermotolerant coliform and yeast and mold counts, and search of *Salmonella* sp and *Listeria monocytogenes*) were evaluated on 1, 7, 14, 21 and 28 days of storage, as well as pH and acidity. The physicochemical and microbiological results were submitted to variance analysis and the sensory results to chi-square test. Coliforms, *Listeria* and *Salmonella* were not found in the cheeses. There was lactoferrin inhibitory action under the counts of yeasts and molds, and psychrotrophic microorganisms in the Minas Frescal cheese from day 21 forward, as well as the pH on day 28 was lower in the lactoferrin added cheese. Lactoferrin addition did not affect the sensory characteristics of the Minas Frescal cheese.

Keywords: milk, shelf-life, natural preservatives, spoiler microorganisms, pathogenic microorganisms.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Proteínas do leite.....	16
3.2 Lactoferrina.....	17
3.3 Queijo Minas Frescal	19
3.4 Microrganismos indicadores	22
3.4.1 Bolores e leveduras.....	22
3.4.2 Coliformes fecais ou termotolerantes.....	24
3.4.3 Microrganismos aeróbios mesófilos.....	25
3.4.4 Microrganismos psicrotróficos.....	26
3.5 Microrganismos patogênicos	27
3.5.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	27
3.5.2 <i>Salmonella sp.</i>	28
3.5.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Produção do queijo Minas Frescal.....	32
4.2 Análises microbiológicas.....	33
4.2.1 Amostragem.....	33
4.2.2 Enumeração de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
4.2.3 Contagem padrão de microrganismos mesófilos	34
4.2.4 Contagem padrão de microrganismos psicrotróficos	34
4.2.5 Enumeração de coliformes termotolerantes.....	35
4.2.6 Enumeração de bolores e leveduras.....	35
4.2.7 Pesquisa de <i>Salmonella sp</i>	35
4.2.8 Pesquisa de <i>Listeria sp</i>	36

4.3	Análises físico-químicas.....	36
4.4	Análise sensorial.....	37
4.5	Análise de dados	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	Caracterização da matéria-prima e dos queijos frescos	38
5.2	Análises dos queijos ao longo do armazenamento refrigerado.....	39
5.2.1	Acidez e pH.....	40
5.2.2	Bolores e leveduras.....	43
5.2.3	Microrganismos aeróbios mesófilos	44
5.2.4	Microrganismos psicrotróficos	46
5.2.5	Coliformes termotolerantes	47
5.2.6	<i>Salmonella</i> sp.....	48
5.2.7	<i>Listeria monocytogenes</i>	48
5.2.8	<i>Staphylococcus aureus</i>	49
5.3	Análise sensorial.....	50
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal.....	32
Figura 2 - Valores médios de acidez e pH nos queijos Minas Frescal controle e tratado com lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias.....	40
Figura 3 - Valores médios das populações de bolores e leveduras nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias.....	43
Figura 4 - Valores médios das populações de microrganismos aeróbios mesófilos nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias.....	45
Figura 5 - Valores médios das populações de microrganismos psicrótrópicos nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias.....	46

1 INTRODUÇÃO

Na indústria de laticínios, o leite bovino é a matéria-prima básica para a fabricação de inúmeros produtos. Sua qualidade é primordial, pois influencia de forma significativa as características dos produtos lácteos processados. Dados de 2007 mostram que cerca de 34% de todo leite industrializado no Brasil em estabelecimentos sob o Serviço de Inspeção Federal é utilizado para fabricação de queijos. No Brasil, em 2004 foram produzidas sob inspeção federal 445 mil toneladas (t) de queijos, sendo 33,5 mil t de queijo Minas Frescal incluindo 4,5 mil t produzidos pelo processo de ultrafiltração (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2007).

O consumidor, quando compra um queijo, espera que o produto satisfaça suas expectativas sensoriais, seja nutritivo e, além disso, seja seguro sob o ponto de vista microbiológico. Os fabricantes de queijos esperam que os mesmos mantenham essas características pelo maior tempo possível após o processamento, ou seja, tenham uma longa vida-de-prateleira. Em produtos lácteos, um dos maiores fatores limitantes do período de validade é o desenvolvimento microbiano (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

Valle (1995) ressalta que a matéria-prima, os equipamentos, as embalagens e o manuseio podem ser as principais fontes de contaminação, por exemplo, na indústria de queijos. Assim, é necessário um controle rigoroso das condições higiênico-sanitárias destas etapas a fim de se evitar o crescimento de microrganismos deteriorantes bem como a exposição do consumidor a alimentos contaminados com microrganismos que podem causar danos à sua saúde. Diversos métodos de conservação podem ser utilizados para impedir ou reduzir o desenvolvimento destes microrganismos, como congelamento, calor, irradiação, produtos químicos ou conservantes, dentre outros (FELLOWS, 1994).

O aumento da procura dos consumidores por produtos alimentares naturais tem exercido certa pressão sobre a indústria e agências reguladoras para a busca de outros métodos de conservação, além dos tradicionais, especialmente com relação ao uso de substâncias conservantes. Nos últimos anos, um grande número de pesquisadores (LÖNNERDAL; IYER, 1995; MURDOCK et al., 2007) tem estudado compostos naturais visando sua utilização como antimicrobianos para impedir ou controlar o crescimento de agentes patogênicos e deteriorantes em

alimentos. Dentre os compostos estudados, a lactoferrina, uma proteína ligadora de ferro encontrada no leite e outras secreções de mamíferos (BAKER, 2009), têm se mostrado efetiva no controle de alguns grupos microbianos em alimentos (CHUN-HUI; CHUN-CHIN, 2005; NAKAMURA, 2002; SHAH, 2000).

Dentro deste contexto, a lactoferrina, um composto natural do leite, apresenta potencial para uso em produtos lácteos, como queijos, atuando como conservante natural, já que poderia controlar o desenvolvimento microbiano e, assim, melhorar a vida-de-prateleira e segurança alimentar dos produtos.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

- Avaliar o efeito da adição de lactoferrina nas características microbiológicas do queijo Minas Frescal durante sua vida-de-prateleira.

2.2 Específicos

- Avaliar as contagens de grupos e/ou microrganismos específicos durante o período de vida-de-prateleira do queijo Minas Frescal, adicionado ou não de lactoferrina.
- Avaliar se a adição da lactoferrina afeta as características sensoriais do queijo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Proteínas do leite

O leite é secretado pelas glândulas mamárias como uma mistura de componentes derivados de precursores da alimentação e do metabolismo animal. Os principais constituintes do leite são: a água (87,5%), lipídios (3,6%), proteínas (3,0%), lactose (4,6%) e sais minerais (0,7%) (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS 2006).

Além de sua finalidade nutricional, o leite contribui também para uma série de funções fisiológicas, sendo a de proteção gastrointestinal, provavelmente, a mais importante. A maioria dessas funções de proteção tem como base suas proteínas e peptídeos, os quais são originados, em grande parte, durante a hidrólise enzimática ocorrida durante a digestão (FOX; McSWEENEY, 2003).

As proteínas do leite podem ser divididas em caseínas e proteínas do soro. As caseínas representam cerca de 80% do total protéico e precipitam quando se acidifica o leite até pH 4,6. As proteínas do soro, as quais somam ao redor de 20% do total de proteínas permanecem solúveis nesse pH. Distinguem-se quatro tipos de caseínas conhecidas como frações: alfa-S1-, alfa-S2-, beta- e kappas-caseínas. As proteínas do soro compreendem principalmente beta-lactoglobulina (50,8%), alfa-lactoalbumina (19,1%), soroalbumina (6,3%), imunoglobulinas (12,7%) e lactoferrina (1,6%) (FOX; McSWEENEY, 1998; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006).

Muitos trabalhos têm demonstrado a bioatividade de inúmeros compostos do leite (Tabela 1). Dentre eles, proteínas e peptídeos do leite fisiologicamente importantes incluem imunoglobulinas, enzimas, inibidores enzimáticos, fatores de crescimento, hormônios e agentes antibacterianos (FOX; McSWEENEY, 2003).

Tabela 1 - Componentes bioativos do leite e suas implicações na saúde humana

Aspecto afetado	Componente lácteo envolvido		
	Derivados protéicos	Derivados lipídicos	Outros componentes
Aumento da resposta imunológica	Soro proteínas Proteínas da membrana do glóbulo de gordura do leite (MGGL)	Ác. linoléico conjugado	Probióticos Zinco
Prevenção de câncer	Soro proteínas Caseína Lactoferrina α -Lactalbumina Peptídeos Proteínas da MGGL	Ác. linoléico conjugado Ácido vacênico Esfingolipídeos Ácido butírico Ác. metiltetradecanóico	Cálcio e Selênio Lactose Vitaminas A e D Oligossacarídeos Nucleosídeos Probióticos
Aumento na saúde cardiovascular	Soro proteínas Caseína	Ác. linoléico conjugado Ácido esteárico Ácidos graxos ômega-3	Cálcio e Potássio Vitamina D
Aumento na saúde óssea	Peptídeos	Ác. linoléico conjugado	Cálcio, Fósforo, Vit. K

Fonte: Adaptado de Bauman et al. (2006) e Haug et al. (2007).

3.2 Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína monomérica, ligadora de ferro da família transferrina, com massa molecular de aproximadamente 80 kilodaltons (ANDERSON et al., 1987). A afinidade da lactoferrina por ferro é 260 vezes maior do que a transferrina presente no sangue (BAKER; BAKER, 2005).

Essa proteína pode ser encontrada em superfícies mucosas, nos grânulos específicos dos leucócitos polimorfonucleares, e em fluidos biológicos, incluindo leite, saliva e líquido seminal, o que indica que ela pode desempenhar um papel protetor na resposta imune inata (FARNAUD; EVANS, 2003; JENSSEN; HANCOCK, 2009).

O leite é a principal fonte de lactoferrina. Ela é encontrada abundantemente no colostro de bovinos, em concentrações de 7 mg/mL (LONNERDAL; IYER, 1995), diminuindo ao longo da lactação para 0,2 a 1,5 mg/mL (FONSECA; SANTOS, 2000; MARSHALL, 2004). No leite bovino mastítico, a concentração de lactoferrina se eleva, podendo chegar a 10 mg/mL (FONSECA; SANTOS, 2000).

Segundo Garofalo e Goldman (1999), a lactoferrina *in vitro*, exerce atividade bactericida, bacteriostática e fungicida, em sinergismo ou não com outros componentes antibacterianos do leite, como a lisozima. A lactoferrina, bem como seu peptídeo derivado – a lactoferricina, inibe a proliferação de bactérias gram-positivas e gram-negativas, em virtude de sua habilidade de sequestrar o ferro disponível no meio, privando os microrganismos desse nutriente essencial para o seu crescimento (ALMSTÅHL; WIKSTRÖM; GROENINK, 2001; SGARBIERI, 2004).

Durante muito tempo, acreditou-se que esse era o único mecanismo de ação antimicrobiana da lactoferrina (YAMAUCHI et al., 1993). Porém, pesquisas demonstraram que ela também possui ação bactericida ferro-independente, por ligar-se diretamente à parede de bactérias. Estudos utilizando-se cristalografia por difração de raios-X demonstraram que na superfície dessa proteína existem certas regiões catiônicas que facilitam sua interação com lipídeo A, que é um componente dos lipopolissacarídeos (LPS) da membrana de bactérias gram-negativas. Essa interação modifica a permeabilidade da parede celular das bactérias, fazendo com que ocorra a liberação da porção LPS, provocando o colapso da bactéria (APPELMELK et al., 1994; ELLISON; GIEHL; LAFORCE, 1998).

Outras funções também foram atribuídas à lactoferrina, tais como imunomodulação, regulação do crescimento celular, função antitumoral, atividade antioxidante e antiinflamatória (RODRIGUES; TEIXEIRA, 2007; WARD; URIBELUNA; CONNEELEY, 2002), agente antiviral, antiparasitário e antifúngico (JENSSEN; HANCOCK, 2009; NABET; LINDEN, 2001). Além disso, ela age na agregação de bactérias e ativação de células fagocíticas (FARNAUD; EVANS, 2003; TENOVOU, 1989).

As funções biológicas da lactoferrina conduziram ao interesse na obtenção do produto purificado para aplicações comerciais. Já se encontram disponíveis comercialmente a lactoferrina bovina purificada, bem como a lactoferrina recombinante humana (FOX; McSWEENEY, 2003).

Sendo a lactoferrina um composto natural do leite, apresenta potencial para uso em alimentos, especialmente em produtos lácteos, como queijos, atuando como conservante natural, já que poderia controlar o desenvolvimento microbiano e, assim, melhorar a vida-de-prateleira e segurança alimentar dos produtos.

Chun-Hui e Chun-Chin (2005) avaliaram o efeito da adição de lactoferrina (40 mg/kg) em um embutido cárneo por 60 dias de armazenamento e verificaram contagens de bactérias lácticas e bacteriana total menores no produtos adicionados de lactoferrina do no controle até o 15º dia. Já Kenjin (2002) estudou o uso da lactoferrina (1%) com e sem glicosilação no controle de bactérias Gram negativas em queijo Cottage. A lactoferrina não glicosilada apresentou efeito antimicrobiano sobre *Escherichia coli* enquanto a lactoferrina glicosilada mostrou atividade contra *Salmonella typhimurium*, além de efeito mais pronunciado sobre a população de *E. coli*.

3.3 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal surgiu nas serras mineiras, na metade do século XVIII, onde o leite produzido passou a ser utilizado nas fazendas para a fabricação de queijo, destinado à alimentação dos exploradores de ouro (AGRIDATA, 2002). O estado de Minas Gerais é um grande produtor de queijos e seu modo artesanal de fazer queijo é um patrimônio cultural imaterial brasileiro desde 2008 (IPHAN, 2008).

O queijo Minas Frescal é um produto de grande popularidade, aceitação, consumo e produção em todo o Brasil. Sua produção representa cerca de 7,5% do total de queijos fabricados no Brasil sob inspeção federal, ocupando a quarta posição depois dos queijos Mozzarella, Prato e Requeijão (EMBRAPA, 2007). Sua produção é intensa devido ao alto rendimento e à ausência de período de maturação, o que possibilita um retorno rápido de investimento e, conseqüentemente, custos menores ao consumidor (OLIVEIRA; MORENO; MESTIERI, 1998).

De acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 1997, 2004), o queijo Minas Frescal, é um queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Ele é classificado com um queijo semigordo (25,0-44,9% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (não inferior a 55%), a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL, 1996).

Diversas tecnologias são utilizadas na fabricação do queijo Minas Frescal. A mais tradicional faz uso de fermento láctico, o que fornece ao queijo a proteção promovida pelas bactérias lácticas. Buscando maior rendimento de processo e reduzir as alterações físico-químicas durante sua vida de prateleira, foi desenvolvido o processamento de acidificação direta, com a substituição da cultura láctica pelo ácido láctico industrial. Mais recentemente, também vem sendo utilizada a ultrafiltração como tecnologia de produção do queijo Minas Frescal (CARVALHO, 2003).

A adoção de diferentes métodos de fabricação, como a substituição do fermento láctico pela acidificação direta, visando minimizar o problema de acidificação excessiva durante a comercialização, tornou o queijo Minas Frescal mais susceptível ao desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos. O queijo obtido por acidificação direta não conta com barreiras de proteção originadas pela presença do fermento láctico, como a produção de ácido láctico e outros compostos antimicrobianos, dentre os quais, as bacteriocinas (NASCIMENTO, 2007).

Queijos acidificados com ácido láctico apresentam valores de pH maiores que os queijos acidificados com fermento láctico. Isto acontece porque a quantidade de ácido produzida pelas bactérias lácticas do fermento aumenta durante o tempo de armazenamento, abaixando os valores de pH. Quando o queijo é acidificado diretamente com ácido láctico, essa quantidade de ácido tende a permanecer constante, não havendo muita variação do pH. A diminuição dos valores de pH em queijos produzidos com acidificação direta pode ser influenciada pela produção de ácidos pela microbiota natural do leite, processo também observado em queijos produzidos com fermento láctico (ARAGON-ALEGRO, 2008).

A composição do queijo Minas Frescal logo após sua fabricação normalmente é 55-60% de umidade, 1,4-1,6% de sal (NaCl), 17-19% de gordura e pH de 5,0-5,3 para queijos fabricados com fermento láctico. No caso dos queijos fabricados com ácido láctico, o pH varia entre 6,1-6,3 e a umidade, de 60-63% (CAMPOS, 2000).

O queijo Minas Frescal é um produto de massa macia e crua, muito úmido, com baixo teor de sal, baixa acidez e não maturado. Essas características permitem o desenvolvimento de muitos microrganismos. Alguns, como as bactérias

láticas, utilizam a lactose para produção de ácido láctico e outros subprodutos, deteriorando o queijo. Outros são patogênicos, como *Salmonella* sp, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, os quais podem causar infecções ou intoxicações de origem alimentar (FOX et al., 2000).

O problema da contaminação do queijo Minas Frescal por microrganismos patogênicos e deterioradores é relatado em diversos trabalhos, os quais identificam vários pontos críticos na linha de processamento do queijo, destacando-se a matéria-prima, o tanque de coagulação e a salmoura (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000; ARAÚJO et al., 2001; BARCELLOS, 2006; SANGALETTI, 2007).

Para se obter um bom queijo, o principal requisito é o uso da matéria-prima de qualidade. Quando o número de contaminantes é elevado no leite cru, a pasteurização e outros processos industriais não são suficientes para a destruição efetiva dos microrganismos indesejáveis (HOFFMAN et al., 1999). Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenamento contribuem, também, de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (PEREIRA et al., 1999).

De acordo com os padrões microbiológicos estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), os queijos de muita alta umidade elaborados por coagulação enzimática, como o Minas Frescal, devem apresentar ausência de *Salmonella* sp e de *Listeria monocytogenes* em 25 g. Além disso, para queijos com presença de bactérias lácticas viáveis e abundantes é tolerado no máximo 5×10^3 número mais provável (NMP)/g de coliformes termotolerantes e 10^3 unidades formadoras de colônia (UFC)/g de estafilococos coagulase positiva, e para queijos não adicionados de bactérias lácticas admite-se no máximo 5×10^2 NMP/g de coliformes termotolerantes e 5×10^2 UFC/g de estafilococos coagulase positiva.

Segundo Sabioni et al. (1998), a maioria dos queijos comercializados no Brasil não apresenta níveis microbiológicos satisfatórios. Analisando-se a literatura existente a respeito da qualidade microbiológica desses queijos, torna-se evidente o quadro desfavorável da qualidade sanitária deste produto em várias cidades brasileiras, como no Rio de Janeiro-RJ (BARROS et al., 2004), Poços de

Caldas-MG (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2000), Cuiabá-MT (LOGUERCIO; ALEIXO, 1999), São Paulo-SP (SILVA et al., 2003), Brasília-DF (BARCELLOS, 2006), Teresina-PI (CASTRO et al., 2007), Arapongas e Londrina-PR (PASSOS et al., 2009).

Devido à susceptibilidade a contaminações, a vida-de-prateleira do queijo Minas Frescal é relativamente curta, de aproximadamente 14 dias, desde que sob refrigeração adequada, em temperatura não superior a 8 °C (BRASIL, 1996). Uma das maneiras de se tentar prolongar a vida útil do queijo Minas Frescal pode ser a adição de compostos antimicrobianos como a lactoferrina que, devido às suas ações, tem aparecido como uma das mais importantes proteínas do soro do leite (JELEN; LUTZ, 1998).

3.4 Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores são grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias durante o processo, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

3.4.1 Bolores e leveduras

Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, a maioria originária do solo ou do ar. Os bolores são extremamente versáteis, sendo a maioria das espécies capaz de assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. A maioria também é indiferente com relação às fontes de nitrogênio, podendo utilizar o nitrato, os íons de amônia e o nitrogênio orgânico. As leveduras são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos, algumas necessitam de vitaminas ou não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono. Esses fatores limitam a gama de alimentos susceptíveis à deterioração por leveduras (SILVA et al., 2007).

O crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que observado para bactérias, em alimentos com baixa acidez e alta atividade de água. Portanto, dificilmente serão responsáveis pela deterioração desses alimentos. Em alimentos ácidos e de baixa atividade de água, no entanto, o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração com grande prejuízo econômico em frutas frescas, vegetais e cereais (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

A temperatura ótima de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28 °C, não crescendo bem nas temperaturas mesófilas (35-37 °C), e raramente nas temperaturas de bactérias termotolerantes (45 °C). Seu crescimento não é incomum sob condições de refrigeração (5 °C), porém, abaixo de 10 °C negativos, os alimentos podem ser considerados microbiologicamente estáveis em relação a este grupo (SILVA et al., 2007).

A consistência do alimento, assim como a atmosfera de armazenamento, exerce uma considerável influência sobre os tipos de fungos que irão provocar a deterioração do produto. Em linhas gerais, as leveduras predominam em alimentos líquidos, porque são unicelulares e se dispersam mais facilmente em líquidos. Além disso, substratos líquidos oferecem maior oportunidade para desenvolvimento de condições anaeróbias, ideais para as leveduras fermentativas. Os bolores, ao contrário, são favorecidos por substratos sólidos firmes, em cuja superfície há fácil acesso ao oxigênio. Por outro lado, essa afirmação não deve ser entendida como absoluta, sugerindo que leveduras não possam deteriorar alimentos sólidos ou bolores alimentos líquidos. Simplesmente, as leveduras são mais competitivas em líquidos, provocando alterações percebidas mais fácil ou rapidamente (SILVA et al., 2007).

Algumas leveduras contribuem para o desenvolvimento do sabor dos queijos por produzirem etanol, acetaldeído, etilacetato e etil butirato, resultantes da fermentação da lactose (WELTHAGEN; VILJOEN, 1999). As leveduras, pela atividade proteolítica e lipolítica, colaboram na liberação de precursores do aroma tais como aminoácidos, ácidos graxos e ésteres. Estes microrganismos também contribuem para o aumento do pH do queijo, metabolizando o ácido láctico e produzindo fatores de crescimento tais como vitamina B, ácido pantotênico, niacina, riboflavina e biotina (ASHENAFI, 1989; TEMPEL; JAKOBSEN, 1998; VILJOEN, 2001; WELTHAGEN; VILJOEN, 1999). Além disso, presença de algumas leveduras

pode ser resultante de condições higiênico-sanitárias inadequadas, e estas podem causar no queijo alterações sensoriais indesejáveis (TEMPEL; JAKOBSEN, 1998).

Na Costa Rica, Tzanetakis e Tzanetakis (1992), analisando a qualidade microbiológica de 205 amostras de queijos produzidos artesanalmente, detectaram valores médios para bolores e leveduras de $4,2 \times 10^5$ UFC/g. Eles concluíram que fatores ambientais tais como umidade relativa e temperatura, associadas com a qualidade microbiológica da água e a manipulação do produto durante e após o processamento, devem ser levados em consideração na avaliação da sua qualidade microbiológica.

Araújo et al. (2001), analisando 24 amostras de queijo Minas Frescal de sete diferentes marcas, destacou que 18 (75%) apresentaram-se com níveis de bolores e leveduras significativos, igual e/ou acima de 10^2 UFC/g.

Bairros et al. (2007) avaliaram oito amostras de queijo Minas Frescal obtidas em feiras livres no município de Pelotas-RS e detectaram a presença de leveduras em seis amostras (75%), com populações entre $8,0 \times 10^3$ e $3,3 \times 10^5$ UFC/g. Na análise de bolores, foi detectada presença em duas amostras (25%), com população de $1,0 \times 10^3$ UFC/g para ambas.

Apesar da inexistência de padrão normativo para bolores e leveduras em queijo Minas Frescal na legislação vigente (BRASIL, 2001), a presença desses microrganismos é um indicador de qualidade dos produtos alimentícios (ARAÚJO; SILVA, 1998). Em legislações anteriores, o limite tolerável para estes microrganismos era de 5×10^3 UFC/g (BRASIL, 1996, 1997).

3.4.2 Coliformes fecais ou termotolerantes

O grupo dos coliformes fecais é um subgrupo dos coliformes totais. As bactérias deste grupo apresentam a capacidade de fermentar lactose com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44-45 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Essa definição objetivou, em princípio, englobar as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*Escherichia coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal, como várias cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Com isto, a denominação “coliformes fecais” vem sendo substituída por “coliformes termotolerantes” (SILVA et al., 2007).

O uso da *E. coli* como um indicador de contaminação de origem fecal presente em água foi proposto, em 1892, por Teobaldo Smith, uma vez que esse microrganismo é encontrado no conteúdo intestinal do homem e animais homeotérmicos (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Os critérios microbiológicos que envolvem *E. coli* são úteis quando se deseja determinar se houve contaminação de origem fecal em um alimento (DOYLE; BEUCHAT; MONTIVILLE, 1997).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes, da Resolução Colegiada (RDC) nº 12 (BRASIL, 2001) o queijo Minas Frescal produzido com acidificação direta deve apresentar tolerância máxima de 5×10^2 UFC de coliformes de origem fecal/g. Ornela et al. (2005) avaliaram o perfil microbiológico do queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra (MG) e, de quarenta amostras analisadas, 50% atendiam aos padrões para coliformes totais e 50%, para coliformes termotolerantes.

3.4.3 Microrganismos aeróbios mesófilos

As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae, e apresentam temperatura ótima de crescimento em torno de 32 °C, incluindo a maioria dos contaminantes do leite (PERRY, 2004).

O número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrado em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante o processo de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada (ICMSF, 1996). Esta determinação permite, também, obter informação referente à alteração incipiente dos alimentos, sua provável vida útil, a falta de controle no descongelamento dos alimentos ou desvios na temperatura de refrigeração estabelecida (MORTON, 2001).

Em uma pesquisa realizada no município de Ilha Solteira-SP, foram analisadas 20 amostras de queijo Minas Frescal, sendo que, deste total, 15 (75%) amostras encontraram-se fora dos padrões microbiológicos vigentes para contagem total de mesófilos e/ou coliformes fecais, indicando produtos em condições higiênicas insatisfatórias (ISEPON; SANTOS; SILVA, 2003).

3.4.4 Microrganismos psicrotróficos

Dentre tantos microrganismos deteriorantes na indústria de alimentos os psicrotróficos têm destaque por alterar o produto sob refrigeração devido à produção das enzimas proteases e lipases (SANGALETTI, 2007), que são geralmente termoestáveis (PICARD; PLARD; COLLIN, 1996).

No leite, as proteases agem, preferencialmente, sobre a caseína, especialmente sobre a κ -caseína, o que pode causar uma desestabilização das micelas, podendo levar à coagulação do leite (CHEN; DANIEL; COOLBEAR, 2003; GEBRE-EGZIABHER; HUMBERT; BLANKENAGEL, 1980).

Os principais problemas tecnológicos provocados por atividade de proteases de psicrotróficos incluem, também, a redução no rendimento de queijos e o desenvolvimento de defeitos sensoriais, como sabor amargo, durante a estocagem (SHAH, 1994).

O Minas Frescal é um queijo consumido sem maturação, porém, a tecnologia de fabricação e conseqüentemente a proteólise, influenciam decisivamente na consistência, sabor e durabilidade do produto (WOLFSCHOON-POMBO; LIMA, 1989).

As lipases atuam sobre os lipídeos do queijo, liberando ácidos graxos livres e ácidos graxos voláteis, podendo resultar em alterações nas características do produto, pelo processo de deterioração (SANGALETTI, 2007). As lipases produzidas pelos psicrotróficos são mais importantes no desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma em queijos do que as proteases; isto porque as proteases são solúveis em água e são perdidas no soro, enquanto as lipases são adsorvidas pelos glóbulos de gordura, ficando retidas na massa do queijo (FOX et al., 2000).

O termo psicrotróficas se aplica às bactérias que crescem em temperaturas de refrigeração comercial, ou seja, 2 a 7 °C, independente de sua temperatura ótima de crescimento (SILVA et al., 2007). É um grupo importante em produtos que são conservados sob refrigeração por períodos entre 1-4 semanas (PERRY, 2004).

Os microrganismos psicrotróficos são largamente distribuídos na natureza e podem se apresentar como bastonetes, cocos ou vibrios, formadores ou não de esporos, Gram positivos ou negativos, aeróbios, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. A maioria dos microrganismos psicrotróficos é encontrada em leite, produtos lácteos, carnes bovina, de aves e de peixes e em frutos do mar, incluindo os gêneros de *Aeromonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Vibrio*, *Citrobacter* e *Erwinia*, entre outros (COUSIN; JAY; VASAVADA, 1992).

Segundo a ICMSF (1996), as evidências iniciais de deterioração por psicrotróficos somente são constatadas quando essa microbiota atinge valores superiores a 10^7 UFC/g no alimento. As principais bactérias psicrotróficas que provocam deterioração dos produtos lácteos pertencem ao gênero *Pseudomonas*. Estes microrganismos são termolábeis, e facilmente destruídos na pasteurização. Porém, as enzimas extracelulares que eles produzem (lipases e proteases) são termorresistentes, permanecendo no leite após a pasteurização e limitando a vida útil desse produto durante a estocagem (FRANK; CHRISTEN; BULLERMAN, 2005).

3.5 Microrganismos patogênicos

3.5.1 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é agente causador de enfermidades graves para homens e animais, está amplamente distribuída na natureza, e tem como características a capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e a relativa resistência térmica (ICMSF, 1996). Alguns relatos têm demonstrado o envolvimento de produtos lácteos em surtos alimentares, causando listeriose (CDC, 2001; BILLE, 1990; LINNAN et al., 1988; SANAA; COROLLER; CERF, 2004).

O meio científico foi despertado para o perigo da listeriose durante a década de 80, quando uma série de surtos ocorreu na América do Norte e Europa, sendo a *Listeria monocytogenes* responsável por várias formas de listeriose em humanos. A partir de 1988, principalmente nos países da Europa Central,

pesquisadores passaram a investigar a listeriose como doença de origem alimentar (FABER; PETERKIN, 1991; OLIVEIRA, 1993).

As listérias crescem em temperatura de 1 a 45 °C, sendo a faixa ótima, de 30 a 37 °C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0 °C. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2003; LOVETT; TWEDT, 1988; SEELIGER; JONES, 1996). De acordo com Jay (2005), das espécies pertencentes ao gênero *Listeria*, a *L. monocytogenes* é o patógeno de maior importância para os humanos.

Devido à ocorrência de muitos surtos de listeriose de origem alimentar, inclusive com casos fatais, vem ocorrendo um aumento de interesse na pesquisa de *Listeria monocytogenes* em alimentos. Populações acima de 10⁶ UFC/g têm sido encontradas em queijos moles e patês de carne. Em uma grande proporção de alimentos são comumente encontrados pequenos números de *L. monocytogenes*, porém, muitas especificações microbiológicas estipulam a ausência de *L. monocytogenes* em 25 g de alimento (HARRIGAN, 1998).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes, da Resolução Colegiada (RDC) n° 12 (BRASIL, 2001) o queijo Minas Frescal deve apresentar ausência de *Listeria monocytogenes* em 25 g de amostra. Alguns trabalhos já constataram a ocorrência dessa bactéria em queijos Minas Frescal em níveis acima do permitido pela legislação (SILVA; HOFER; TIBANA, 1998; SILVA et al., 2003), enquanto outros relataram todas as amostras dentro dos padrões estabelecidos (PERESI et al., 2001; SALOTTI et al., 2006).

3.5.2 *Salmonella sp.*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é composto por bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos e não produtores de oxidase. A temperatura de crescimento varia entre 5 e 46 °C, com ótima entre 35 e 43 °C. Seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e dos animais de sangue quente (SIQUEIRA, 1995). Apresentam sensibilidade aos tratamentos térmicos e, sob congelamento, observa-se uma redução significativa em sua atividade (CHAVES, 1993).

As cepas mais freqüentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que respondem por 99% das salmoneloses humanas (SILVA et al. 2007). A gastroenterite provocada pela ingestão de alimentos contaminados com qualquer espécie de *Salmonella* é denominada salmonelose. Em casos mais graves, algumas espécies de *Salmonella* podem provocar febre tifóide e febre entérica (JAY, 2000).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes, da Resolução Colegiada (RDC) n° 12 (BRASIL, 2001) o queijo Minas Frescal deve apresentar ausência de *Salmonella* sp em 25 g de amostra.

3.5.3 *Staphylococcus aureus*

Dentre os diversos tipos de microrganismos patogênicos que podem ser veiculados por leite e derivados, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, cuja importância na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção, nos alimentos contaminados, de toxinas causadoras de gastroenterites alimentares (ZECCONI; HAHN, 2000).

A primeira associação entre estafilococos e intoxicação alimentar ocorreu em 1884, quando foi descrito um grande surto, em Michigan, devido ao consumo de queijo, que, no exame ao microscópio, se mostrou contaminado com microrganismos esféricos, chamados de micrococcos (ICMSF, 1996).

S. aureus estão classificados no gênero *Staphylococcus*, pertencente à família Micrococaceae, apresentando-se como cocos Gram positivos imóveis, não formadores de esporos, que se dividem em mais de um plano, formando cachos irregulares tridimensionais. Produzem catalase e são anaeróbios facultativos, sendo o gênero é composto de 32 espécies e subespécies. A separação dessas espécies pode ser realizada por testes bioquímicos, padrões de resistência às drogas, sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem e análise plasmidial (ICMSF, 1996).

Os estafilococos são bactérias mesófilas, apresentando crescimento na faixa de temperatura entre 7 e 47,8 °C; as enterotoxinas são produzidas entre 10 e 46°C, com ótimo entre 40 e 45 °C. Os surtos de intoxicação alimentar são provocados por alimentos que permaneceram neste intervalo de temperatura por tempo variável, de acordo com a população inicial e a temperatura. Em geral, quanto mais baixa for a temperatura, maior será o tempo necessário para a produção de enterotoxina. Em condições ótimas, a enterotoxina torna-se evidente dentro de quatro a seis horas (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O *S. aureus* é resistente ao congelamento e sobrevive bem em alimentos estocados a temperaturas iguais ou menores a -20 °C e suas toxinas permanecem estáveis se congeladas (HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989).

Esses microrganismos produzem intoxicação alimentar devido à produção de toxina por certas cepas. Estas toxinas são proteínas simples, solúveis em água e soluções salinas, resistentes a ação de enzimas e termorresistentes (FRANCO; LANGRAF, 2003; SIQUEIRA, 1995). A capacidade de produzir uma ou mais enterotoxinas é verificada em 30 a 50% das cepas de *S. aureus* (CARDOSO, 2005).

A ingestão de uma dose menor que 1 µg da enterotoxina pode provocar os sintomas da intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* alcança populações acima de 10⁶ UFC/g de alimento (SILVA et al. 2007).

Geralmente, os sintomas de intoxicação por *S. aureus* ocorrem entre 2-4 horas após a ingestão da toxina pré-formada no alimento. Os sintomas mais comuns são vômito, náuseas, dores abdominais e diarreia e, às vezes, dor de cabeça. A recuperação normalmente ocorre em até três dias. Os casos de óbitos são raros, embora a reposição de eletrólitos possa ser necessária para compensar a perda de fluidos pela diarreia e vômito (ICMSF, 1996; HALPIN-DOHNALEK; MARTH, 1989; TRANTER, 1990). O tempo para o aparecimento e a gravidade dos sintomas depende da quantidade de toxina consumida e da susceptibilidade do indivíduo (BRYAN, 1980; ICMSF, 1996).

O principal reservatório de *S.aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais indivíduos humanos saudáveis (SILVA et al. 2007).

De acordo com os padrões microbiológicos vigentes, da Resolução Colegiada (RDC) nº 12 (BRASIL, 2001) o queijo Minas Frescal deve apresentar tolerância máxima de 5×10^2 UFC de estafilococos coagulase positiva/g.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produção do queijo Minas Frescal

Os queijos Minas Frescal foram produzidos seguindo o fluxograma descrito na Figura 1.

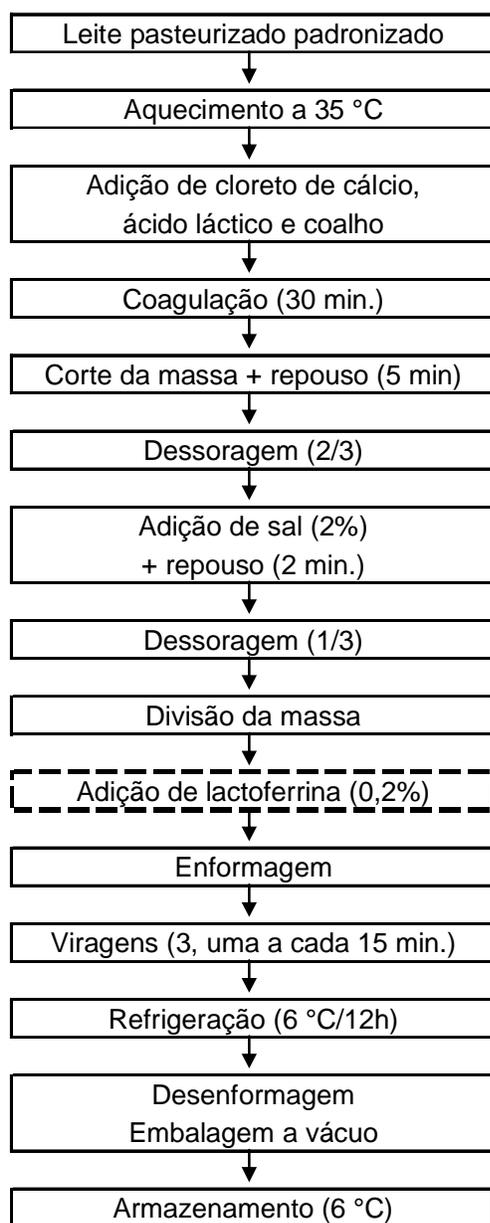


Figura 1 – Fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal

O leite pasteurizado integral teve seu teor de gordura padronizado para 3%, com a adição de leite pasteurizado desnatado. Em seguida, foi aquecido a 35 °C, e adicionado de cloreto de cálcio 50% (0,25 mL/L), ácido láctico 85% (0,25 mL/L) e coalho (diluído 1:10 em água destilada – 0,15 mL/L). Após 35 minutos, o ponto de corte foi verificado e a massa cortada quando estivesse com consistência desejada. A massa permaneceu em repouso durante cinco minutos e, em seguida, foi retirado dois terços do soro, adicionado cloreto de sódio (20 g/kg) e feito um repouso de dois minutos. Após o repouso, foi feita outra dessoragem, retirando-se um terço do total de soro. A massa, com o soro residual, foi dividida em duas partes iguais, sendo que a lactoferrina (0,2 g/100g massa) foi adicionada em uma delas. A massa foi deixada em repouso por dois minutos. Os queijos foram enformados e virados a cada 15 minutos, totalizando três viragens. Depois, foram armazenados por 12 horas a 6 °C antes de serem retirados das formas, fracionados e embalados a vácuo. Os produtos embalados foram estocados sob refrigeração (6 °C) até a realização das análises. Todo o experimento foi realizado em triplicata.

4.2 Análises microbiológicas

4.2.1 Amostragem

As análises microbiológicas foram realizadas após 1, 7, 14, 21 e 28 dias da produção dos queijos. Foram realizadas as seguintes análises: enumeração de *Staphylococcus aureus*, de microrganismos mesófilos, de microrganismos psicrótrópicos, de coliformes termotolerantes e de bolores e levedura, e pesquisa de *Listeria* sp e *Salmonella* sp

Para a realização das análises, com exceção da pesquisa de *Listeria* sp e *Salmonella* sp descritas adiante, 10 gramas das amostras foram homogeneizados em 90 mL de solução salina 0,85% esterilizada, em sacos plásticos apropriados. A partir desta diluição inicial foi preparada uma série de diluições decimais, utilizando-se o mesmo diluente.

4.2.2 Enumeração de *Staphylococcus aureus* (LANCETTE; TATINI, 1992)

Para a enumeração dos estafilococos, as amostras diluídas foram depositadas na superfície de placas de Petri contendo ágar Baird-Parker, suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo. Após a incubação a 37 °C/48 h, foi realizada a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) nas placas. As colônias suspeitas de estafilococos coagulase positiva apresentam-se de cor negra, com ou sem halo. Destas, no máximo, cinco colônias foram isoladas e repicadas para tubos com TSA inclinado, incubados por 24 horas, a 35 °C. As colônias suspeitas foram submetidas aos testes de catalase e coagulase.

4.2.3 Contagem padrão de microrganismos mesófilos (SWANSON et al, 1992)

Para tal determinação, foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade em placa de Petri com ágar padrão (Plate Count Agar), fundido e resfriado a uma temperatura de, aproximadamente, 45 °C. Após a homogeneização e solidificação do ágar, as placas foram incubadas em posição invertida. Após incubação a 37 °C/24 h, foi realizada a contagem das UFC e o resultado foi expresso em UFC/g.

4.2.4 Contagem padrão de microrganismos psicotróficos (SWANSON et al, 1992)

Para a contagem destes microrganismos, foi utilizada a técnica da semeadura em superfície de ágar padrão (Plate Count Agar). As placas foram incubadas a 7 °C/ 10 dias, e após o período de incubação, foi realizada a contagem das UFC e o resultado foi expresso em UFC/g.

4.2.5 Enumeração de coliformes termotolerantes (KORNACKI; JOHNSON, 2001)

Uma alíquota de 1 mL das diluições decimais foram semeadas em placas Petrifilm™ para coliformes e posteriormente incubadas a 44,5 °C. Após 24 horas, as colônias avermelhadas associadas a bolhas de gás foram contadas, e a população, calculada. Os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2.6 Enumeração de bolores e leveduras (TANIWAKA et al., 1999)

Para a contagem destes microrganismos, foi utilizada a técnica da semeadura em superfície em ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico 10% até pH 4,0. As placas foram incubadas a 25 °C/ 5 dias, e após o período de incubação, foi realizada a contagem das UFC e o resultado foi expresso em UFC/g.

4.2.7 Pesquisa de *Salmonella* sp (ANDREWS et al., 2001)

Foram homogeneizados 25 g de queijo em 225 mL de caldo lactosado e incubados a 35 °C/24 h. Decorrido esse período, 0,1 mL do caldo lactosado foi transferido para 10 mL do caldo de enriquecimento Rappaport-Vassiliadis e incubado a 42 °C/24 h. Simultaneamente, foi adicionado 1 mL do caldo lactosado a 10 mL do caldo tetratoato e incubado a 35 °C/24 h. Decorridas 24 horas de incubação, os dois caldos foram semeados em placas de ágar Hektoen Enteric (HE) e ágar *Salmonella*-*Shigella* e incubadas a 37 °C/24 h. As colônias com características de *Salmonella* sp nesses meios foram inoculadas em ágar ferro lisina (LIA) e ágar tríplice açúcar ferro (TSI) e os tubos incubados a 35 °C/24 h. Posteriormente, as colônias características foram submetidas a outras provas bioquímicas (EPM, Mili e Citrato).

4.2.8 Pesquisa de *Listeria* sp (PAGOTTO et al., 2001)

Uma porção de 25 gramas da amostra foi pesada e homogeneizada em 225 mL de caldo LEB (*Listeria Enrichment Broth*) e incubada a 30 °C/24 h. Em seguida, 0,1 mL foi transferido desse caldo para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser, que foi incubado a 37 °C/24 h. Os caldos Fraser enegrecidos foram semeados em placas de ágar Palcam e Oxford, incubadas a 37 °C/24h. Três colônias características de *Listeria*, em cada uma das placas, foram transferidas para placas de ágar tripticase de soja adicionado de 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE), para verificação de sua pureza. A seguir, as colônias foram submetidas à identificação bioquímica, utilizando-se os testes para produção de catalase e beta-hemólise, fermentação de carboidratos (xilose, manitol, ramnose e dextrose) e motilidade em ágar semi-sólido.

4.3 Análises físico-químicas

No leite utilizado para a fabricação dos queijos foram avaliados teor de gordura, pH e acidez titulável. Os queijos frescos foram analisados quanto sua composição centesimal (teores de proteína, lipídeos, cinzas, cloretos e sólidos totais), pH e acidez titulável. Aos 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, os queijos tiveram o pH e a acidez mensurados.

O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber de acordo com Kosikowski e Mistry (1997) e o teor de cloretos pelo método de Volhard (RICHARDSON, 1985).

As demais análises foram realizadas seguindo os procedimentos da *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC, 2003). O pH foi mensurado utilizando-se um potenciômetro de imersão previamente calibrado. A acidez foi determinada através de titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1N utilizando fenolftaleína como indicador. O teor de nitrogênio determinado pelo método de Kjeldahl e o teor de proteína total calculado multiplicando o teor de nitrogênio total por 6,38. O teor de cinzas pelo método gravimétrico de incineração em mufla a 550 °C e o teor de sólidos totais por secagem em estufa à 105 °C por 16 h.

4.4 Análise sensorial

Foi realizado um teste triangular, com o objetivo de verificar se havia diferença perceptível entre o queijo controle e o que contém lactoferrina. Avaliadores não-treinados (funcionários, alunos e pessoas da comunidade) foram recrutados no campus da Universidade Norte do Paraná - UNOPAR. O teste foi realizado no período matutino entre às 9:00 e 10:30 h. Foram apresentadas, a cada provador, três amostras codificadas com números aleatórios. Duas amostras eram iguais e uma diferente. Cada provador foi orientado a experimentar as amostras e anotar na ficha qual era a diferente. Os resultados foram avaliados utilizando tabela específica, baseada no teste qui-quadrado, para nível de significância de 5% para testes triangulares (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

4.5 Análise de dados

O efeito do uso da lactoferrina sobre as características físico-químicas e microbiológicas do queijo Minas Frescal durante sua vida de prateleira foi avaliado através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Statistica (STATSOFT, 2000).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da matéria-prima e dos queijos frescos

A composição físico-química do leite pasteurizado padronizado utilizado como matéria-prima e dos queijos Minas Frescal frescos (1 dia de fabricação) produzidos nesse estudo está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos do leite e dos queijos Minas Frescal

Parâmetro	Leite	Queijos Frescos
Umidade (%)	88,91 ± 0,42	65,80 ± 1,02
Cinzas (%)	0,73 ± 0,07	2,67 ± 0,17
Sal (%)	-	1,25 ± 0,13
Proteínas (%)	3,35 ± 0,03	14,25 ± 0,70
Lipídios (%)	3,00 ± 0,10	13,17 ± 0,58
Lipídios no extrato seco (%)	27,05 ± 0,90	38,50 ± 1,53
pH	6,78 ± 0,07	6,48 ± 0,04

O leite apresentou características consideradas normais de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002) e dados da literatura nacional e internacional (FONSECA; SANTOS, 2000; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006).

O queijo Minas Frescal é classificado como semigordo e de muito alta umidade, ou seja, deve apresentar entre 25 e 44,9% de gordura no extrato seco e umidade não inferior a 55% (BRASIL, 1996). Os resultados obtidos mostram que os queijos atenderam aos padrões oficiais exigidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997, 2004).

Não foi observada diferença ($p > 0,05$) entre os queijos frescos (um dia de fabricação), adicionados ou não de lactoferrina, quanto suas características físico-químicas. De acordo com a literatura, há uma grande variação na composição do queijo Minas Frescal. O teor de sal obtido nesse trabalho ficou abaixo da faixa de 1,4 a 1,6% reportada em outros estudos (CAMPOS, 2000; DORNELLAS, 1997), o

que, juntamente com o alto teor de umidade apresentado, pode facilitar o desenvolvimento de microrganismos. Os outros parâmetros encontram-se dentro dos valores apresentados por alguns autores, os quais obtiveram teores de umidade de 63 a 69%, proteína de 11 a 15%, lipídeos de 12 a 21% e valores de pH de 6,30 a 6,72 (ALEGRO, 2003; BURITI; ROCHA; SAAD, 2005; DORNELLAS, 1997).

5.2 Análises dos queijos ao longo do armazenamento refrigerado

Os valores médios de pH e acidez e das contagens de bolores e leveduras, de microrganismos aeróbios mesófilos e de microrganismos psicrotróficos durante 28 dias de armazenamento refrigerado dos queijos Minas Frescal elaborados nesse estudo encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos queijos Minas Frescal

	pH	Acidez (% ac. láctico)	Bolores e Leveduras (UFC/g)	Aeróbios mesófilos (UFC/g)	Psicrotróficos (UFC/g)
Queijos controle					
Dia 1	6,48 ^a	0,107 ^a	2,3 x 10 ^{2a}	8,5 x 10 ^{3a}	6,7 x 10 ^{1a}
Dia 7	6,53 ^a	0,113 ^a	5,0 x 10 ^{2a}	6,1 x 10 ^{4a}	1,6 x 10 ^{5a}
Dia 14	6,45 ^a	0,132 ^a	5,0 x 10 ^{3a}	1,1 x 10 ^{6a}	1,4 x 10 ^{6a}
Dia 21	6,41 ^a	0,137 ^a	2,9 x 10 ^{5a}	2,1 x 10 ^{6a}	3,4 x 10 ^{6a}
Dia 28	6,41 ^a	0,137 ^a	2,5 x 10 ^{6a}	1,6 x 10 ^{7a}	5,1 x 10 ^{6a}
Queijos com adição de lactoferrina					
Dia 1	6,48 ^a	0,107 ^a	< 10 ^{2a}	1,0 x 10 ^{2a}	5,7 x 10 ^{1a}
Dia 7	6,52 ^a	0,118 ^a	3,8 x 10 ^{2a}	5,4 x 10 ^{4a}	2,7 x 10 ^{4a}
Dia 14	6,45 ^a	0,126 ^a	2,1 x 10 ^{3a}	3,4 x 10 ^{5a}	5,6 x 10 ^{5a}
Dia 21	6,44 ^a	0,134 ^a	4,7 x 10 ^{4b}	2,0 x 10 ^{6a}	3,8 x 10 ^{5b}
Dia 28	6,39 ^b	0,148 ^a	1,3 x 10 ^{5b}	1,0 x 10 ^{7a}	7,4 x 10 ^{5b}

^{ab} Para cada parâmetro e dia, valores com letras iguais não diferem estatisticamente (p>0,05).

5.2.1 Acidez e pH

Os valores médios de pH e acidez observados nos queijos controle e tratado com lactoferrina, armazenados a 6 °C, durante a vida-de-prateleira, encontram-se na Figura 2.

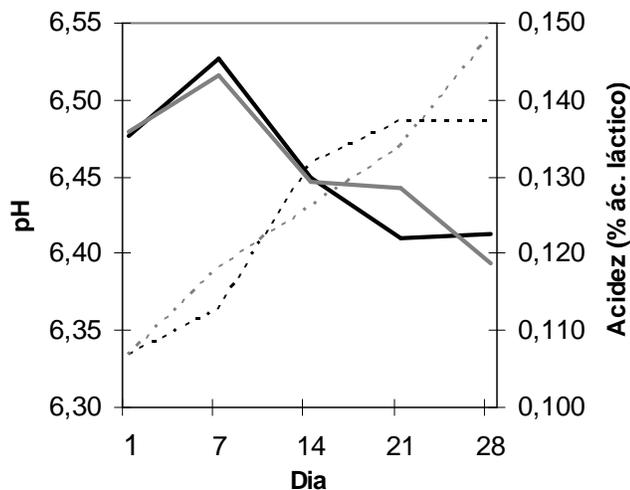


Figura 2 - Valores médios de acidez e pH nos queijos Minas Frescal controle e tratado com lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias. (pH - controle = linha preta contínua; lactoferrina = linha cinza contínua. Acidez - controle = linha preta tracejada; lactoferrina = linha cinza tracejada)

Na Figura 2, observa-se que o pH dos queijos controle e tratado com lactoferrina aumentou nos primeiros 7 dias de armazenamento e, a partir daí, diminuiu até o final do período de análises (28 dias). Diferença estatística entre os dois tipos de queijo, em relação a esse parâmetro, só foi observada no 28º dia de armazenamento, quando o queijo contendo lactoferrina apresentou valores menores de pH, quando comparados aos obtidos no queijo controle ($p=0,01$). A redução dos valores de pH entre o 7º e o 28º dia foi de 6,53 a 6,41 (0,12) para amostra controle e de 6,52 a 6,39 (0,13) para a amostra com lactoferrina.

Ainda na Figura 2, são apresentados os resultados de acidez para os dois tipos de tratamentos, onde é verificado o aumento na porcentagem de ácido láctico durante os 28 dias de armazenamento. O aumento da acidez foi de 0,030%

de ácido láctico para amostra controle e de 0,049% de ácido láctico para a amostra com lactoferrina durante as quatro semanas de análise ($p > 0,05$).

A queda nos valores de pH e a elevação da acidez verificada nesse trabalho (Figura 2) deve-se, provavelmente, à produção de ácido láctico durante a fermentação da lactose por bactérias (ESKIN, 1990). Neste trabalho, observou-se que, nas enumerações dos microrganismos, as populações de bactérias e fungos presentes no queijo Minas frescal estão diretamente relacionados com os valores obtidos de pH e acidez, uma vez que o aumento dos microrganismos resultou em diminuição dos valores de pH e aumento de acidez. Em estudo conduzido por Sangaletti et al. (2007), os autores observaram uma correlação linear entre o aumento da população dos microrganismos e elevação da acidez.

O valor inicial de pH encontrado nesse trabalho foi 6,48, tanto para o queijo controle, quanto para o adicionado de lactoferrina (Figura 2). Segundo Furtado (2005), o pH inicial de queijo Minas produzido com ácido láctico, varia entre 6,3 e 6,5, e o queijo apresenta sabor muito suave. Esses valores podem diminuir menos, mas podem chegar a 5,2-5,4, em função do grau de contaminação e das condições do local de comercialização.

A velocidade de formação e quantidade de ácido láctico produzidos influenciam na qualidade do queijo, além de regular o pH e o equilíbrio iônico, que é muito importante na formação de lactato de cálcio e na inibição do crescimento de patógenos potenciais (WOLFSCHOON-POMBO, 1984). Além disso, a formação do ácido láctico é essencial para o sabor do queijo Minas Frescal, bem como para sua qualidade e vida de prateleira. Entretanto, um excesso na produção de ácido láctico pode conduzir a um sabor muito ácido no queijo e descaracterizar o produto (CASAGRANDE; WOLFSCHOON-POMBO, 1988).

Durante o tempo de armazenamento, apesar da queda nos valores de pH (Figura 2), os valores finais não foram tão baixos a ponto de serem considerados um fator limitante para a proliferação das bactérias estudadas. Segundo Beresford et al. (2001), o pH ótimo para a multiplicação da maioria das bactérias é próximo ao pH 7,0 e a multiplicação destas é prejudicada em valores menores que 5,0.

Naldini (2002) observou valores maiores de pH durante a vida de prateleira dos queijos Minas Frescal produzidos por acidificação direta (6,45 no 1° dia e 5,42 no 18° dia) do que nos queijos fabricados pelo método convencional, ou seja, com adição de fermento láctico (5,31 no 1° dia e 4,58 no 18° dia).

Rocha, Buriti e Saad (2006) produziram queijos Minas Frescal com adição de ácido láctico e de cultura láctica. Os autores verificaram que, em todos os queijos, os valores de pH diminuíram durante o armazenamento; porém, essa diminuição foi significativa estatisticamente somente nos queijos produzidos com adição de cultura láctica. Segundo esses autores, apesar da tendência de substituir parcial ou total a utilização de culturas lácticas por ácido láctico nos queijos brasileiros, somente a adição das culturas lácticas assegura a permanente produção de ácido láctico e, conseqüentemente, valores mais baixos de pH dos produtos durante o armazenamento.

Souza (2006), ao analisar as características físico-químicas de queijos Minas Frescal produzidos com acidificação direta, observou uma redução dos valores de pH de 6,58 a 6,34 em 21 dias de armazenamento e valores para a acidez que variaram de 0,18 a 0,29mL de ácido láctico em 100g do queijo no mesmo período.

Em estudo realizado por Alves (2010), foram avaliados os valores de pH e acidez do queijo Minas Frescal durante o armazenamento. Para o processo de produção foi utilizada a adição de ácido láctico e o leite foi previamente pasteurizado. Os valores encontrados de pH variaram de 6,66 a 6,48 durante 30 dias de armazenamento. Os valores de acidez variaram de 0,28g a 0,61g de ácido láctico em 100g de amostra, durante 30 dias de análise.

Carvalho (2003), ao avaliar 93 amostras de queijos tipo Minas Frescal, elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializadas no varejo de Campinas-SP, comparou os valores médios de pH entre os diferentes processamentos e verificou uma diferença não significativa entre as amostras com adição de cultura láctica (5,87) e com acidificação direta (5,75). Semelhante ao ocorrido com o pH, a comparação das médias para a acidez titulável não mostrou uma diferença significativa entre as amostras com cultura láctica e acidificação direta.

5.2.2 Bolores e leveduras

Na Figura 3, pode-se observar que houve um aumento na população de bolores e leveduras durante o período de armazenamento dos queijos, sendo que os valores verificados nas amostras controle, mantiveram-se sempre acima dos observados para as amostras com adição de lactoferrina, demonstrando a ação desse antimicrobiano contra fungos. Diferença estatística significativa só foi observada após 21 dias de armazenamento. No 21º dia, foram verificadas populações de $2,9 \times 10^5$ UFC/g para a amostra controle e $4,7 \times 10^4$ UFC/g, para a tratada com lactoferrina ($p=0,01$). No 28º dia, os valores para as amostras controle e com adição de lactoferrina foi de $2,5 \times 10^6$ e $1,3 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente ($p=0,03$).

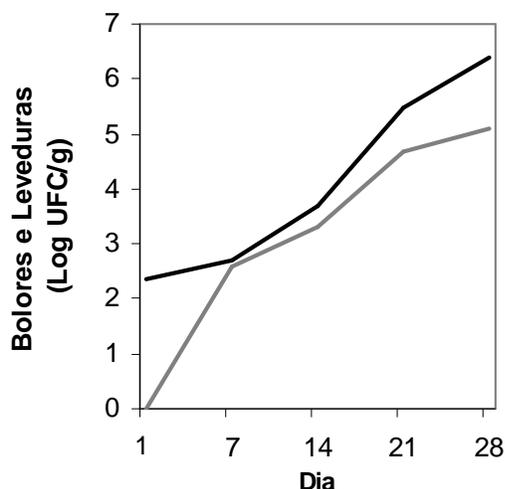


Figura 3 - Valores médios das populações de bolores e leveduras nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias. (Controle = linha preta; lactoferrina = linha cinza)

A extinção de parâmetros para análise de bolores e leveduras no queijo pela legislação vigente (BRASIL, 2001) não parece coerente, uma vez que esses microrganismos apresentaram aumento de, no mínimo, 1,5 ciclos logarítmicos durante o tempo de vida-de-prateleira normal do queijo Minas, ou seja, 14 dias (Figura 3).

Araújo et al. (2001), ao avaliar 24 amostras de queijo Minas Frescal, comercializadas em diversos estabelecimentos localizados na região Metropolitana de Salvador, observou que 18 amostras (75%) apresentaram-se, em média, com níveis de bolores e leveduras iguais e/ou acima de 10^2 UFC/g, o que denota processamento e/ou armazenamento inadequados.

Ao analisar 60 amostras de queijo Minas Frescal provenientes de um laticínio da cidade de Morrinhos-GO, no período de abril a setembro, Quintana e Carneiro (2007) observaram que as populações de bolores e leveduras variaram de <10 a $3,4 \times 10^2$ UFC/g. Os valores mais significativos foram encontrados nos meses de abril ($3,4 \times 10^2$ UFC/g) e setembro ($3,0 \times 10^1$ UFC/g), sendo que nos outros meses as contagens obtidas foram $<10^1$ UFC/g.

Vasquez-Belda et al. (1995) relatam a presença de fungos toxigênicos em queijos com alta umidade e consistência mole (tipo Arzua) e constataram, ainda, a produção de micotoxinas (citrinina, aflotoxinas, acrotoxina A, patulina e esterigmatocistina) por cepas fúngicas.

5.2.3 Microrganismos aeróbios mesófilos

Na Figura 4, são apresentados os resultados obtidos para as enumerações de microrganismos aeróbios mesófilos nos queijos. Pode-se observar que, durante todo o período de armazenamento (28 dias), os valores médios das populações de mesófilos nas amostras com adição de lactoferrina foram menores que os observados para as amostras controle. Apesar de esta diferença entre os tratamentos não ser significativa ($p > 0,05$), de acordo com a análise estatística dos dados, esses resultados apontam para um cenário favorável à atividade antimicrobiana da lactoferrina.

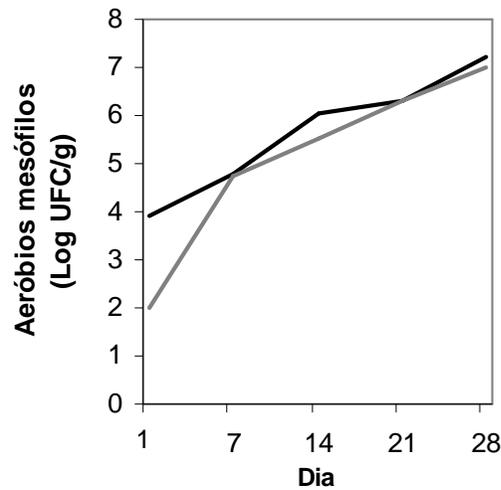


Figura 4 - Valores médios das populações de microrganismos aeróbios mesófilos nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias. (Controle = linha preta; lactoferrina = linha cinza)

Em trabalho realizado no município de Ilha Solteira-SP, Isepon, Santos e Silva (2003), avaliaram 20 amostras de queijo Minas Frescal, sendo 11 com selo de inspeção e 9, clandestinas. Foi observado que, para as amostras de queijos inspecionados, as populações de bactérias aeróbias mesófilas variaram de $2,0 \times 10^5$ a $6,5 \times 10^7$ UFC/g e para os queijos clandestinos, de $1,95 \times 10^6$ a $6,5 \times 10^7$ UFC/g.

Carvalho, Viotto e Kuaye (2007) analisaram 46 amostras de queijo Minas Frescal, sendo 23 artesanais e 23 industriais de quatro diferentes marcas. A coleta das amostras foi realizada aleatoriamente no comércio de Alfenas-MG e região. Ao realizarem a quantificação de aeróbios mesófilos, os autores observaram populações de $5,05 \times 10^7$ a $4,44 \times 10^9$ UFC/g para os queijos caseiros. Nas amostras de queijos industrializados, os resultados foram mais elevados, variando de $2,72 \times 10^9$ a $8,00 \times 10^9$, evidenciando possíveis falhas na pasteurização do leite usado na fabricação do queijo industrializado ou, ainda, re-contaminação do produto final.

5.2.4 Microrganismos psicrotróficos

Na Figura 5, apresentam-se os valores médios das populações de microrganismos psicrotróficos nos queijos controle e tratado com lactoferrina, durante os 28 dias de análise.

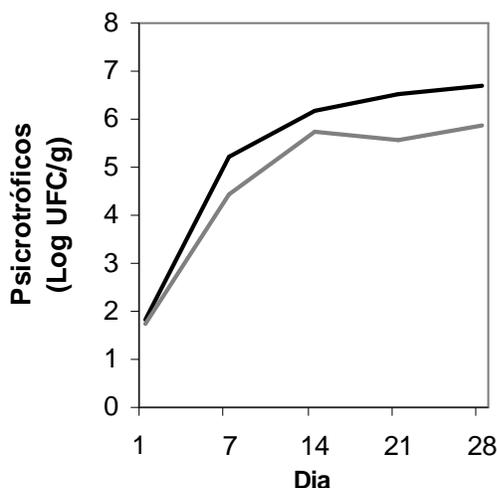


Figura 5 - Valores médios das populações de microrganismos psicrotróficos nos queijos Minas Frescal com e sem lactoferrina, mantidos sob refrigeração durante 28 dias. (Controle = linha preta; lactoferrina = linha cinza)

Observando-se os resultados apresentados na Figura 5, nota-se que os valores das contagens para psicrotróficos obtidos nas amostras contendo lactoferrina foram menores que os observados nos queijos controle, durante todo o período de análise, sendo que essas diferenças foram estatisticamente significativas no 21º ($p=0,01$) e 28º dias ($p<0,05$). Os valores médios encontrados no dia 21 foram de $3,4 \times 10^6$ UFC/g para a amostra controle e $3,8 \times 10^5$ UFC/g para a amostra tratada com lactoferrina. No 28º dia, os valores para as amostras controle e com adição de lactoferrina foram de $5,1 \times 10^6$ e $7,4 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente.

Sangaletti et al. (2009) avaliaram a vida útil do queijo Minas Frescal por um período de 30 dias. Para a seleção do queijo, foram analisadas seis marcas comercializadas em supermercados de Piracicaba-SP, com registro no SIF, sendo apenas uma selecionada por ser a única que atendeu aos requisitos microbiológicos

determinados pela legislação vigente (BRASIL, 2001). A partir da marca selecionada, os queijos foram adquiridos diretamente do laticínio, totalizando três lotes do produto, e analisados um dia após sua fabricação. As peças de queijo foram armazenadas em incubadora BOD a 4 °C, durante o período de 30 dias. Foram analisadas 2 peças de queijo de 250 g por período (1, 10, 20 e 30 dias), sendo que foram realizadas três repetições do experimento, cada uma referindo-se a um lote diferente. Os resultados mostraram um aumento médio final da população de psicotróficos totais, de 8,5 log UFC/g entre o 1º e o 30º dia de armazenamento. Esse aumento foi maior que o verificado neste trabalho, onde se observou aumento de cinco e quatro log UFC/g, durante os 28 dias de armazenamento dos queijos controle e tratado com lactoferrina, respectivamente (Figura 5).

Cardoso (2005) avaliou a influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal produzido com leite cru granelizado, refrigerado a 10 °C. Foi constatada uma redução de 6,78% no rendimento em termos de litros de leite por quilograma de queijo e de 6,38%, em gramas de sólidos totais no queijo por litro de leite. O leite que resultou nestas perdas de rendimento apresentava uma população de 10^8 UFC/mL a 10^9 UFC/mL de bactérias psicotróficas.

5.2.5 Coliformes termotolerantes

Nos queijos produzidos neste trabalho, as populações obtidas para coliformes termotolerantes em todas as amostras de queijo analisadas foram sempre <10 UFC/g durante todo o período de armazenamento.

Barros et al. (2004), ao analisarem amostras de queijo Minas Frescal, coletadas em estabelecimentos comerciais na cidade do Rio de Janeiro, RJ, verificaram que, em 30 amostras, somente 11 (37%) estavam de acordo com os padrões vigentes (BRASIL, 2001), ou seja, a presença de coliformes termotolerantes era igual ou maior a 5×10^3 UFC/g.

Bellaguarda et al (2008) enumeraram as populações de coliformes fecais em 10 amostras de queijo Minas Frescal provenientes de duas feiras-livres no município de Uberlândia/MG, e notaram que oito encontravam-se de acordo com os padrões exigidos pela legislação (BRASIL, 2001) para coliformes. Dentre as oito amostras aprovadas no estudo, quatro apresentaram um excelente resultado ficando

o índice de contaminação próximo à zero.

Sapata et al. (2008) analisaram 48 amostras de queijo Minas Frescal. Foram realizadas análises de coliformes fecais entre outras, e os resultados demonstraram um padrão microbiológico insatisfatório para 28 amostras (58,30%), sendo que, dentre estas, em 15 foram isoladas *E. coli* e, em sete, *Enterobacter* sp.

5.2.6 *Salmonella* sp.

Não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. nas amostras controle e nas tratadas com lactoferrina, durante o período de armazenamento dos queijos. A ausência de *Salmonella* sp. é comum, sendo que em vários trabalhos podem ser observados resultados semelhantes aos obtidos nessa pesquisa.

Barros et al. (2004), ao analisar 30 amostras de queijo Minas Frescal, coletadas em estabelecimentos comerciais na cidade do Rio de Janeiro-RJ, verificaram ausência de *Salmonella* em todas as amostras. Brant, Fonseca e Silva (2007), em trabalho realizado na região do Serro-MG, pesquisaram *Salmonella* em 40 amostras de queijo Minas Frescal, não encontrando o patógeno. Ávila e Galo (1996) analisaram amostras de queijo Minas Frescal comercializado em diferentes estabelecimentos no município de Piracicaba/SP e não detectaram a presença de *Salmonella* sp. Carvalho, Viotto e Kuaye (2007), ao analisarem 93 amostras de Minas Frescal, provenientes de estabelecimentos comerciais no município de Campinas-SP, verificaram a ausência de *Salmonella* sp.

5.2.7 *Listeria monocytogenes*

Não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* nas amostras controle e nas tratadas com lactoferrina, durante o período de armazenamento dos queijos.

Silva, Hofer e Tibana, em 1998, constataram alta incidência (41,17%) de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal artesanal, em estudo realizado no Rio de Janeiro/RJ. Silva et al. (2003) pesquisaram a ocorrência de *Listeria* spp. nos pontos críticos da cadeia de produção do queijo Minas Frescal em

São Paulo-SP. De 218 amostras coletadas durante a produção, 13 apresentavam o microrganismo.

Peresi et al. (2001) não encontraram *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo minas adquiridas em feiras livres de São José do Rio Preto. Salotti et al. (2006) avaliaram 30 amostras de queijo Minas Frescal em Jaboticabal-SP, e também observaram ausência deste microrganismo.

Carvalho (2003), ao avaliar 63 amostras de queijo Minas Frescal, sendo 31 produzidas com acidificação direta e 31, com adição de cultura láctica, observou a presença de *Listeria monocytogenes* somente em 3 amostras produzidas por acidificação direta. Brant, Fonseca e Silva (2007), não encontrou *Listeria monocytogenes* em 40 amostras de queijo minas comercializadas na região do Serro-MG.

5.2.8 *Staphylococcus aureus*

Neste trabalho, as populações de *S. aureus*, até o 14º dia de análise, foram inferiores a 10^2 UFC/g para todos os queijos. Após esse período, foi observado um aumento nessas populações. Nas análises realizadas em 21 e 28 dias de armazenamento, as contagens médias para o queijo controle foram de $3,7 \times 10^5$ UFC/g e $5,7 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Nos mesmos períodos, os queijos tratados com lactoferrina apresentaram populações médias de *S. aureus* de $5,7 \times 10^5$ UFC/g e $1,2 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente. Não foi verificada diferença estatística significativa entre os queijos ($p > 0,05$).

Artimonte (2009) avaliou a atividade antibacteriana da lactoferrina sobre três espécies de bactérias (*S. aureus*, *Proteus mirabilis* e *E. coli*), e observou que *S. aureus* foi o microrganismo que apresentou maior resistência à lactoferrina.

Em 1994, Pereira et al. estudaram um surto de intoxicação estafilocócica, ocorrido numa área metropolitana, no sudeste do Brasil, onde três crianças e quatro adultos ficaram doentes após ingerirem um bolo de aniversário com creme, no dia seguinte ao da festa. Foi encontrada uma população de $1,2 \times 10^8$ UFC/g de *S. aureus*. A toxina isolada da região nasal, unhas e mãos da pessoa que fez o bolo foi a mesma existente no alimento.

Passos et al. (2009) analisou 30 amostras de queijo Minas Frescal, comercializadas em padarias, supermercados e feiras-livres das cidades de Londrina e Araçongas-PR, a fim de observar a qualidade higiênico-sanitária e a presença de *Staphylococcus aureus* nesses alimentos. Das 30 amostras de queijo Minas analisadas, 22 (67%) apresentaram-se em desacordo com a legislação.

Komatsu et al (2008) coletaram 50 amostras de queijos Minas Frescal de 05 propriedades rurais em Uberlândia-MG. As análises revelaram que 88% das amostras de queijo estavam contaminadas com níveis inaceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positiva, de acordo com a legislação.

Hoffman et al. (2002), analisando 10 amostras de queijos Minas Frescal comercializadas em feiras livres no município de São José do Rio Preto-SP, verificaram que todas as amostras apresentavam-se fora dos padrões microbiológicos vigentes para *S. aureus*.

5.3 Análise sensorial

Sessenta avaliadores não treinados participaram dos testes triangulares para avaliação sensorial dos queijos Minas Frescal adicionados ou não de lactoferrina, quanto a diferenças globais entre as amostras. Dentre os provadores, 22 pessoas identificaram corretamente a amostra diferente. O número de julgamentos corretos foi menor do que o necessário para estabelecer diferença entre as amostras ao nível de 5% de significância. Portanto, verificou-se que a adição de lactoferrina não afetou as características sensoriais do queijo Minas Frescal.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, pôde-se verificar a atividade antimicrobiana da lactoferrina em relação aos bolores e leveduras e microrganismos mesófilos e psicrotópicos presentes no queijo Minas Frescal. Em relação aos coliformes, *Listeria* e *Salmonella*, não foi possível avaliar a ação dessa proteína, uma vez que essas bactérias não foram encontradas nos queijos. A lactoferrina, na concentração utilizada, não se mostrou eficiente na inibição de *S. aureus*.

Mais estudos são necessários para que se possa verificar melhor a ação desse agente antimicrobiano natural sobre a microbiota do queijo Minas Frescal, testando-se outros microrganismos ou, até mesmo, aumentando-se a concentração da lactoferrina nos queijos.

A lactoferrina ainda não é amplamente utilizada em alimentos, sendo necessários mais estudos sobre seu uso como conservante nesses produtos. A realização de estudos demonstrando os seus benefícios possibilitará uma produção em larga escala dessa proteína, a fim de baratear seu custo, podendo ser, assim, vantajoso o seu uso em alimentos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIDATA. **Tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal**. <http://agridata.mg.gov.br/pesquisas/tecnologia_queijo/patecfa_frescal.htm>. Acesso 15 nov 2002.

ALEGRO, J. H. A. **Desenvolvimento de queijo Minas frescal probiótico com *Lactobacillus Acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* isolados e em co-cultura**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578-580, 2000.

ALMSTÅHL, A.; WIKSTRÖM, M.; GROENINK, J. Lactoferrin, amylase and mucin MUC5B and their relation to the oral microflora in hyposalivation of different origins. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 16, p. 345-52, 2001.

ALVES, C. C. C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo Minas Frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta com ácido láctico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

ANDERSON, B. F. et al. Structure of human lactoferrin at 3.2-Å resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 84, p. 1769-1773. 1987.

ANDREWS, W. H. et al. Salmonella. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. p.357-380.

APPELMELK, B. J. et al. Lactoferrin is a lipid A-binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2628-2632, 1994.

ARAGON-ALEGRO, L. C. **Influência dos coliformes no comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas frescal**. 2008. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ARAÚJO, W. N. et al. Determinação do número de bolores e leveduras no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador-Bahia. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 2, n. 1, p. 10-14, 2001.

ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. H. Determinação da presença da enzima peroxidase no leite pasteurizado tipo C comercializado em Salvador-BA. **Arquivos da Escola de Medicina Veterinária da UFBA**, v.19, n.1, p. 128-137, 1998.

ARTIMONTE, A. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana da lactoferrina bovina e sua aplicação em filmes protéicos a base de soro de leite**. 2009. Dissertação

(Mestrado em Ciência e Tecnologia do Leite) - Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2009.

ASHENAFI, M. Proteolytic, lipolytic and fermentative properties of yeasts isolated from ayib, a traditional Ethiopian Cottage cheese. **Ethiopian Journal Science**, v.12, p.131-139, 1989.

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17th ed. Washington, DC: AOAC, 2003.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados no município de Piracicaba-SP. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 159-163, 1996

BAIRROS, J. V. et al. Análise de bolores e leveduras em queijos tipo minas, produzidos artesanalmente e comercializados em feiras livres na cidade de Pelotas/RS. 2007. In XVI Congresso de Iniciação Científica e IX Encontro de Pós-Graduação, 2007, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2007. s.p.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. A structural framework for understanding the multifunctional character of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 3-10, 2009.

BAKER, E. N.; BAKER, H. M. Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, p. 2531-2539, 2005.

BARCELLOS, T. G. **Pesquisa de *E. coli* em queijo minas frescal oriundos de feiras no Distrito Federal**. 2006. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

BARROS, P. C. O. G. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n. 122, p. 57-60. 2004.

BAUMAN, D. E. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1235–1243, 2006.

BELLAGUARDA, L. S. S. et al. O. Análise microbiológica de queijo tipo Minas Frescal comercializados em duas feiras-livres de Uberlândia, MG. **Revista Higiene Alimentar**, v.22, n.164, p. 36-40. 2008.

BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In: MILLERE, A. J.; SMITH, J. L.; SOMKUTI, G. A. (Eds.). **Foodborne Listeriosis**. New York: Society for Industrial Microbiology/Elsevier Science, 1990. p. 71-74.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada Nº 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, 10/01/2001, nº 7-E, p.1415-153, seção 1, pt.1. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=144&word=alimentos#>. Acesso em 08 abr 2010.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria Nº 352, de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, 08/09/1997, seção 1, página 19684.

BRASIL, Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, 11/03/1996, seção 1, página 3977.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Altera a Portaria nº 352 de 04/09/1997. **Diário Oficial da União**, 05/03/2004, seção 1, página 5.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002**. Diário Oficial da União, Brasília, 20/09/2002, seção 1.

BRYAN, F. L. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. **Journal Food Protect**, v.43, p.140-50, 1980.

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

CAMPOS, A. C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal**. 2000. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2000.

CARDOSO, R. R. **Influência da microbiota psicotrófica no rendimento de queijo Minas Frescal elaborado com leite estocado sob refrigeração**. 2005. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

CARVALHO, J. D. G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP**. 2003. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H.; KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. **Food Control**, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007

CASAGRANDE, H. R.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Fermentação da lactose no queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 43, n. 258, p.38, 1988.

CASTRO, V. C. et al. Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo Minas Frescal comercializado em Teresina – PI. In: Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa, PB, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of Listeriosis associated with homemade cheese- North Carolina. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 50, n. 26, p. 560-562, 2001.

CHAVES, J. B. P. **Noções de microbiológica e conservação de alimentos**. 2 ed. Viçosa: Universidade de Viçosa. 1993.

CHEN, L.; DANIEL, R. M.; COOLBEAR, T. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. **International Dairy Journal**, v. 13. p. 255-275. 2003.

CHUN-HUI, C.; CHUN-CHIN, K. Effect of lactoferrin on microbial quality and lipid oxidation of chinese sausages. **Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 325-334, 2005.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. In: VANDERZANT, C, SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 1992. p. 153-68.

DORNELLAS, J. R. F.. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise, e “shelf life” do queijo Minas Frescal**. 1997. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, 2 ed. Washington: Amer Society for Microbiology. 1997.

ELLISON, R. T.; GIEHL, T. J.; LAFORCE, F. M. Damage of the outer membrane of enteric Gram-negative bacteria by lactoferrin and transferring. **Infection and Immunity**, v. 56, p. 2774-2781, 1988.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Estatísticas do Leite**. 2007. Disponível em <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/>>. Acesso em 15 set 2009.

ESKIN, M. N. A. **Biochemistry of foods**. 2 ed. London: Academic Press, 1990.

FARBER, M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 395-405, 2003.

- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas.** Zaragoza: Acribia, 1994.
- FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo: Lemos. 2000.
- FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen, 2000.
- FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced Dairy Chemistry: Proteins.** 3 ed. New York: Kluwer Academic, 2003. v1.
- FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry.** Londres: Blackie Academic & Professional. 1998.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- FRANK, J. F.; CHRISTEN, G. L.; BULLERMAN, L. B. Tests for groups of microorganisms. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products.** Washington: APHA, 2005. p. 271-286.
- FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção.** São Paulo: Fonte Comunicações e Editora. 2005.
- GAROFALO, R. P.; GOLDMAN, A. S. Expression of functional immunomodulatory and anti-inflammatory factors in human milk. **Clinics in Perinatology**, v, 26, n. 2, p. 361-377, 1999.
- GEBRE-EGZIABHER, A.; HUMBERT, E. S.; BLANKENAGEL, G. Hydrolysis of milk proteins by microbial enzymes. **Journal of Food Protection**, v. 43, n.9, p.709-712, 1980.
- HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. S. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** Washington: APHA, 2001. p.201-207.
- HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods - a review. **Journal Food Protect**, v. 52, p. 267-82, 1989.
- HARRIGAN, W. F. **Laboratory Methods in Food Microbiology.** 3 ed. California: Academic Press, 1998.
- HAUG, A.; HOSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition – a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 6, p. 25-40, 2007.
- HOFFMAN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo "Minas Frescal", vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 96, p. 69-76, 2002.

HOFFMANN, F. L. et al. Microbiologia de sorvetes elaborados por sorveteria artesanal situada no município de São José do Rio Preto–SP. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p. 346.

ICMSF - INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Listeria monocytogenes*. In: **Microorganisms in foods 5: microbiological specification of food pathogens**. London: Blackie Academic and Professional, 1996. p.141-182.

IPHAN - INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. **Queijo artesanal de Minas vira patrimônio cultural**. 16 maio 2008. <http://portal.iphan.gov.br/portal/montarDetalheConteudo.do?id=13927&sigla=Noticia&retorno=detalheNoticia>. Acesso em 7 abr 2010.

ISEPON, J. S.; SANTOS, P. A.; SILVA, M. A. P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira – SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 89-104, 2003.

JAY, J. M. Listerioses de origem animal. In:___ **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 25, p. 517-542.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publication, 2000.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional dairy. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical & processing aspects**. Lancaster: Techno. Publishing Co., Inc. p.355-378, 1998.

JENSSEN, H.; HANCOCK, R. E. W. Antimicrobial properties of lactoferrin. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 19-29, 2009.

KENJIN, N. Potent antimicrobial effects of the glycosylated lactoferrin. **Food Preservation Science**, v. 28, n. 5, p. 243-246, 2002.

KOMATSU, R. S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas Frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010

KORNACKI, J. L.; JOHNSON, J. L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. p. 69-82.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3 ed. Westport: AVI, 1997.

LANCETTE, G.A.; TATINI, S. R. *Staphylococcus aureus*. In: VANDERZANT, C, SPLITTSTOESSER, D.F. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 1992. p.533-543.

LINNAN, M. J. et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 823-828, 1988.

- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Qualidade microbiológica do leite não inspecionado comercializado em Cuiabá-MT. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 20, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador, 1999. p. 367.
- LÖNNERDAAL, B.; IYER, S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. **Annual Review of Nutrition**, v. 15, p. 93-110, 1995.
- LOVETT, J.; TWEDT, R. M. Bacteria associated with foodborne diseases *Listeria*. **Food Technology**, v. 42, n. 2, p. 188-191, 1988.
- MACLAREN, D. M.; DE GRAAFF, J.; NUIJENS, J. H. Lactoferrin is a lipid A binding protein. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2628-2632, 1994.
- MARSHALL, K. Therapeutic applications of whey protein. **Alternative Medicine Review**, v. 9, n. 2, p. 136-156, 2004.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 4 ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- MORTON, R. D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. 4 ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 2001. cap.7, p. 63-67.
- MURDOCK, C. A. et al. The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 255-261, 2007.
- NABET, P.; LINDEN, G. **Constituants bioactifs in lait, nutrition et santé**. Paris: Tec. & Doc. 2001. p. 169-187.
- NAKAMURA, K. Potent antimicrobial effects of the glycosylated lactoferrin. **Food Preservation Science**, v. 28, n. 5, p. 243-246, 2002.
- NALDINI, M. C. M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. 2002. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- NASCIMENTO, M. S. **Caracterização da atividade antimicrobiana e tecnológica de três culturas bacteriocinogênicas e avaliação de sua eficiência no controle de *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* em queijo Minas Frescal**. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia – GO**. 1993. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1993.
- OLIVEIRA, C. A. F.; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em

algumas fábricas de laticínios do estado de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 31-34, 1998.

ORNELA, E. A. et al. Perfil microbiológico de amostras de queijo Minas artesanal produzidos na Serra da Canastra-MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005, Santos. **Anais...** Santos: Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 2005. p.15581-15581.

PAGOTTO, F. et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples. In: HEALTH CANADA. Food & nutrition. Research programs & analytical methods. Analytical methods. Microbiological methods. **Compendium of analytical methods**, v.2, MFHPB-30, 2001. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume2/mfhp30-01_e.html. Acesso em 04 mar 2010.

PASSOS, A. D. et al. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina-PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 48-54, 2009.

PEREIRA, M. L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999.

PEREIRA, M. L. et al. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista Saúde Pública**, v. 28, p. 406-409, 1994.

PERESI, J. T .M. et al. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.15, p.63-70, 2001.

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

PICARD, C.; PLARD, I.; COLLIN, J. C. Application of the inhibition ELISA method to the study of proteolysis caused by heat-resistant *Pseudomonas* proteinases specific towards kappa-casein in heated milk. **Milchwissenschaft**, v. 51, n. 8, p. 438-442, 1996.

QUINTANA, R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos Minas Frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos-GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3, p. 205-211, 2007.

RICHARDSON, G. H. **Standard methods for examination of dairy products**. Washington: APHA. 1985.

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

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, A. J. O potencial da lactoferrina na prevenção do cancro de mama. **Leite I+D+T**, v. 5, p. 2-3, 2007.

SABIONI, J. G.; HIROOKA, E. Y.; SOUZA, M. L. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**. v. 22, n. 5, p. 458-461, 1988.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANAA, M.; COROLLER, L.; CERF, O. Risk assessment of listeriosis linked to the consumption of two soft cheeses made from raw milk: Camembert of Normandy and Brie of Meaux. **Journal Risk Analysis**, v. 24, n. 2, p. 389-399, 2004.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2007.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SAPATA, F. F. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes totais, coliformes a 45 °C e *Escherichia coli*, em queijo Minas Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 165, p. 75-81, 2008.

SEELIGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P .H. A.; MAIR, N. S. SHAPE, M. E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Willians and Wilkins. 1996, v. 2, p. 1235-1245.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v. 17, p. 397-409, 2004.

SHAH, N. P. Effects of milk-derived bioactives: an overview. **British Journal of Nutrition**, v. 84, suppl. 1, p. S3-S10, 2000.

SHAH, N. P. Psychrotrophs in milk: a review. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 432-437, 1994.

SILVA, I. M. M. et al. Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Fresh cheese processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 81, p. 241-248, 2003.

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

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Varela, 2007.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Brasília: EMBRAPA – SPI; Rio de Janeiro: Embrapa – CTAA. 1995.

SOUZA, C. H. B. **Influência de uma cultura starter termofílica sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as características de queijo Minas**

Frescal probiótico. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2006.

STATSOFT, INC. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. 2000.

SWANSON, K. M. J.; PETERSON, E. H.; JOHNSON, M. J. Colony count methods. In: VANDERZANT, C, SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: APHA, 1992. p. 75-95.

TANIWAKI, M. H.; IAMANAKA, B. T.; BANHE, A. A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **Journal of food Micrology**, v. 2, p. 291-302, 1999.

TEMPEL, T. V. D.; JAKOBSEN, M. Yeast associated with Danablu. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 25-31, 1998.

TENOVOU, J. O. **Human saliva: clinical chemistry and microbiology**. Boca Raton: CRC Press. 1989.

TRANTER, H. S. Foodborne illness: foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, v. 336, p. 1044-1046, 1990.

TZANETAKIS, E. L.; TZANETAKIS, N. Microbiological of white brined cheese made from raw goat milk. **Food Microbiology**, v. 9, p.13-19, 1992.

VALLE, J. L. E. Riscos na produção de queijos e princípios da lavagem e desinfecção de equipamentos. **Revista Leite e Derivados**, v. 21, p. 67-68, 1995.

VÁZQUEZ-BELDA, B. et al. Incidência de hongos toxigênicos en queserías de la zona de Arzua (La Coruña España). **Food Science and Technology International**, v.1, p.91-95, 1995.

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

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed. Boca Raton: CRC Press. 2006.

WARD, P. P.; URIBE-LUNA, S.; CONNEELEY; O. M. Lactoferrin in host defense. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 80, p. 95-102, 2002.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of Cheddar cheese. **Food Microbiology**, v. 16, p. 63-73, 1999.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. et al. Alterações no queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 39, n. 233, p. 3-9, 1984.

WOLFSCHOON-POMBO, A. L.; LIMA, A. Extensão e profundidade da proteólise em queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 44, n. 261-266, p. 50-52, 1989.

YAMAUCHI, K. et al. Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin derived lactoferrin peptide fragment. **Infection and Immunity**, v.61, p. 719-728, 1993.

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of IDF**, v.345, p.15- 18, 2000.