

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Tecnologia de Alimentos

COMPORTAMENTO DIFERENCIAL DE *Listeria monocytogenes*
EM QUEIJOS MINAS FRESCAL ELABORADOS PELO MÉTODO
CONVENCIONAL E POR ACIDIFICAÇÃO DIRETA

MARIA CARLA MENDES NALDINI

Engenheira de Alimentos

ARNALDO YOSHITERU KUAYE

Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

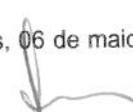
PARECER

Campinas – SP

2002

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Maria Carla Mendes Naldini**, aprovado pela Comissão Julgadora em 06 de maio de 2002.

Campinas, 06 de maio de 2002


Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)



Profa. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro)



Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
(Membro)

Prof. Dr. Mauro Faber de Freitas Leitão
(Membro)

2022-5247

Para meu pai, Antonio Carlos, por toda a confiança, orgulho e principalmente por todo amor que recebi durante todos os minutos da minha vida. Merecedor de minha admiração e respeito, será para sempre meu maior exemplo de inteligência, competência e dignidade.

Para minha mãe, Maria Aparecida, meu referencial de força, coragem e determinação. Pelo seu amor incondicional.

Para tia Maria Ignêz, pelo seu carinho, orações e toda sua preocupação.

Para meus irmãos Antonio Carlos e André, por poder contar com vocês sempre que é necessário.

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

Ao Prof. Dr Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela orientação, apoio e disponibilidade durante o desenvolvimento deste trabalho e amizade.

A Prof. Dra. Walkíria Hanada Viotto pela sugestão do tema abordado no trabalho e correção do mesmo, ajuda e orientação nos processamentos de queijo realizados.

A Dra. Maria Helena Castro Reis Passos pelo empenho na correção do trabalho, pela atenção na proposta de sugestões, pela amizade e conhecimentos compartilhados durante de trabalho no Laboratório de Higiene da UNICAMP.

Ao Dr. Mauro Faber F. Leitão pela atenção e simpatia em todos os momentos que seus valiosos conhecimentos foram necessários, pelas sugestões e correções deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP pela oportunidade de realização do programa de mestrado.

As pesquisadoras e técnicas do Laboratório de Higiene Dirce Yorika Kabuki e Maria Raquel Manhani pela colaboração e ensinamentos em todos os momentos da realização deste trabalho e principalmente, pela amizade.

A funcionária Jacinta R. O. Franco pela disponibilidade em ajudar, mas principalmente pelo carinho que sempre me dedicou.

Aos funcionários do Laboratório de Leite da UNICAMP, Giulianna e Nelson e em especial a Beth pela colaboração nos processamentos dos queijos e análises.

Aos funcionários da Biblioteca, da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria do Departamento de Tecnologia de Alimentos pela prontidão no atendimento.

A pesquisadora Izildinha Moreno do ITAL, pela explicação das análises de bacteriocinas.

A minha prima Elizabete Laino pela valiosa correção ortográfica e gramatical.

Aos amigos Berta, Lica, Sólon, Fabiana, Davi, Eduardo, João Carlos, Alessandra, Celina, Ana Lúcia, Priscila, Dinha, Vera, Li, Patty, Baby, Carmela, Tonhão, Selma, Dilica, Teco, Cristina Susana, Rica, Maria Paula e Gisele pela amizade nos momentos felizes (que foram e são muitos, graças a Deus!), mas principalmente pela força e carinho nos momentos tão tristes que passei. Sem vocês, as coisas seriam muito mais difíceis, acreditem.

A toda minha família pela compreensão, amor e pelo respeito às minhas decisões.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
RESUMO	XIII
SUMMARY	XIV
INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Queijo Minas Frescal	3
2.2. Queijo Minas Frescal e Saúde Pública	5
2.3. Microrganismos Presentes em Queijo Minas Frescal	9
2.3.1. Microrganismos Indicadores/Deteriorantes	9
2.3.2. Microrganismos Patogênicos	10
2.3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.4. Alternativas Tecnológicas para a Fabricação do Queijo Minas Frescal	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.2. Métodos	22
3.2.1. Determinação da Força de Coalho	22
3.2.2. Preparo do Inóculo	23
3.2.3. Processo de Fabricação do Queijo Minas Frescal	23
3.2.4. Análises Físico-Químicas do Leite Pasteurizado	25
3.2.4.1. Amostragem	25
3.2.4.2. Determinação da Acidez Titulável	25

3.2.4.3. Determinação do pH.....	25
3.2.4.4. Determinação do Teor de Gordura.....	27
3.2.5. Análises Físicos-Químicas do Queijo.....	27
3.2.5.1. Amostragem.....	27
3.2.5.2. Determinação do Teor de Gordura.....	27
3.2.5.3. Determinação do Teor de Umidade / Extrato Seco Total (EST).....	27
3.2.5.4. Determinação do Teor de Gordura no Extrato Seco.....	27
3.2.5.5. Determinação do Teor de Sal.....	28
3.2.5.6. Determinação do Teor de Nitrogênio.....	28
3.2.5.7. Determinação da Atividade de Água (Aa).....	28
3.2.5.8. Determinação do pH.....	28
3.2.6. Análises Microbiológicas.....	28
3.2.6.1. Amostragem.....	28
3.2.6.2. Determinação de Coliformes Totais, Coliformes Fecais, <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Salmonella</i>	29
3.2.6.3. Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3.2.6.4. Enumeração de <i>Listeria monocytogenes</i>	29
3.2.6.5. Enumeração de Bactérias Lácticas.....	30
3.3. Avaliação da Sensibilidade de <i>Listeria monocytogenes</i> às bacteriocinas produzidas por lactococos.....	30
3.4. Análise Estatística dos Resultados.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1. Avaliação das Características Físico-Químicas dos Queijos.....	32
4.2. Características Visuais.....	38
4.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica.....	39
4.4. Avaliação da Sensibilidade de <i>Listeria monocytogenes</i> às Bacteriocinas Produzidas por Lactococos.....	41
4.5. Avaliação do Comportamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em Queijos Produzidos por Acidificação Direta e pelo Método Convencional.....	42

4.5.1. Queijos Mantidos a 5°C	42
4.5.2. Queijos Mantidos a 10°C	47
5. CONCLUSÕES.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
7. APÊNDICES	70

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i> Composição dos queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional.....	32
<i>Tabela 2.</i> Valores médios de atividade de água em queijos armazenados à temperatura de 5°C.....	33
<i>Tabela 3.</i> Valores médios de atividade de água em queijos armazenados à temperatura de 5°C.....	34
<i>Tabela 4.</i> Valores médios de pH em queijos nos dias 1, 6, 12, 18 de armazenamento refrigerado a 5°C	36
<i>Tabela 5.</i> Valores médios de pH em queijos nos dias 1, 6, 12, 18 de armazenamento refrigerado a 10°C	37
<i>Tabela 6.</i> Resultados das análises microbiológicas do leite pasteurizado e dos queijos-controle	40

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Rotas de transmissão de <i>Listeria monocytogenes</i> ao homem.....	14
<i>Figura 2.</i> Diagrama de fluxo para obtenção de queijo Minas Frescal pelo método convencional e por acidificação direta.....	26
<i>Figura 3.</i> Valores médios de atividade de água para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 5°C	34
<i>Figura 4.</i> Valores médios de atividade de água para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 10°C	35
<i>Figura 5.</i> Valores médios de pH para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 5°C	36
<i>Figura 6.</i> Valores médios de pH para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 10°C	37
<i>Figura 7.</i> Características visuais dos queijos produzidos por acidificação direta e pelo método convencional após 15 dias de armazenamento a 5°C.....	39

<i>Figura 8.</i> Contagem de <i>L. monocytogenes</i> e Bactérias Lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional, armazenados a 5°C.....	43
<i>Figura 9.</i> Valores médios de contagem de <i>L. monocytogenes</i> em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C	44
<i>Figura 10.</i> Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C.....	45
<i>Figura 11.</i> Contagem de <i>L. monocytogenes</i> e bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional, armazenados a 10°C	49
<i>Figura 12.</i> Valores médios de contagem de <i>L. monocytogenes</i> em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 10°C	49
<i>Figura 13.</i> Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 10°C	50
<i>Figura 14.</i> Contagem de <i>L. monocytogenes</i> em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C	51
<i>Figura 15.</i> Valores médios de contagem de <i>L. monocytogenes</i> em queijos produzidos pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C	52

<i>Figura 16.</i> Valores médios de contagem de <i>L. monocytogenes</i> em queijos produzidos por acidificação direta e armazenados a 5°C10°C	52
<i>Figura 17.</i> Contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C	53
<i>Figura 18.</i> Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e armazenados a 5°C e 10°C	53
<i>Figura 19.</i> Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C	54

RESUMO

Atualmente, muitos laticínios vêm utilizando o processo de acidificação direta, com ácido láctico, substituindo o fermento láctico, na elaboração do queijo Minas Frescal, para melhorar a textura e sabor e aumentar o rendimento. Entretanto, o emprego exclusivo do processo de acidificação direta pode proporcionar queijos mais susceptíveis a proliferação de microrganismos contaminantes, incluindo *Listeria monocytogenes*, reconhecido como um perigoso patógeno associado a doenças de origem alimentar e, particularmente, envolvendo queijos com características semelhantes ao tipo Minas Frescal. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da utilização da acidificação direta no comportamento de *L. monocytogenes* artificialmente inoculada em comparação ao método convencional, com fermento láctico na elaboração do queijo Minas Frescal durante armazenamento refrigerado a 5°C e 10°C, por 25 dias. Os queijos foram inoculados artificialmente com *L. monocytogenes* (10^9 UFC/g). Foi utilizado o ágar Oxford Modificado (MOX) para a contagem de *L. monocytogenes* e o ágar de Man, Rogosa e Sharp para a contagem de bactérias lácticas em queijos depois de 1, 6, 12, 18 e 25 dias de armazenamento. Os resultados das contagens de *L. monocytogenes* para os primeiros dias de monitoramento apresentaram valores em torno de 10^4 - 10^5 UFC/g. O queijo produzido pelo processo convencional apresentou contagens de *L. monocytogenes* praticamente inalteradas durante todo período de armazenamento, sugerindo uma ação inibitória ao crescimento do patógeno no produto. Para o queijo elaborado por acidificação direta, os resultados das contagens de *L. monocytogenes* para armazenamento a 5°C e 10°C após os 25 dias de monitoramento foram semelhantes, observando-se um aumento expressivo da ordem de 2-3 ciclos logarítmicos, mas com velocidade de crescimento maior para os queijos armazenados a 10°C. Os resultados sugerem que a mudança na tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal, embora pareça ser uma boa solução para a melhoria das características sensoriais, não é tão adequada do ponto de vista de segurança alimentar, necessitando novos estudos que aliem os benefícios estruturais e sensoriais aos microbiológicos.

SUMMARY

Currently, many cheese factories have been substituting the bacteria starter for lactic acid to improve the yield and texture of the finished products. However, the use of the direct acidification process can produce cheese products more susceptible to spoilage by contaminating microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, recognized as a potentially dangerous food-borne pathogen. Since 1985, some cases of listeriosis involving cheese contamination and the recognition of the hazard caused by this microorganism has led to a tightening of hygiene control in cheese factories. Because this, the objective of this work was to evaluate the behaviour of *L. monocytogenes* Scott A in Minas Frescal cheese manufactured by the traditional procedure with the addition of mesophilic starter as compared to the direct acidification with lactic acid at 5°C and 10°C during 25 days. The cheeses were artificially inoculated with *L. monocytogenes* culture 10^9 cfu/ml. Modified Oxford agar (MOX) was used for *L. monocytogenes* counts and de Man, Rogosa, Sharpe agar (M.R.S.) was used for mesophilic starter counts in the cheeses after 1, 6, 12, 18, and 25 days of incubation. The initial counts of *L. monocytogenes* obtained for the finished cheeses artificially inoculated were about $10^4 - 10^5$ cfu/g. Using the traditional method, with mesophilic starter, the counts in cheese samples along the storage remained almost unchanged, whereas, the direct acidified cheeses with lactic acid presented an increase in the counts up to 10^8 cfu/g, that represents 2-3 log cycles. The profiles of the counts of lactic bacteria, during the storage of cheeses, associated with those of *L. monocytogenes* show a strong negative influence of the competitive starter culture over *L. monocytogenes* survivor. This fact allow us to believe that the addition of starter culture is an efficient way to control *L. monocytogenes* growth in these products. Despite the improvement of sensorial (flavour, texture and color) characteristics of cheeses obtained by direct acidification with lactic acid, it would be suggested that this technological procedure would not be recommended from a sanitary viewpoint. New studies would be necessary allying sensorial benefits with the microbiological ones.

1. INTRODUÇÃO:

O queijo Minas Frescal é um produto de grande aceitação no mercado, de elaboração simples e alto rendimento de fabricação, sendo fabricado em larga escala pela indústria de laticínios.

Devido ao seu alto teor de umidade, é um produto bastante perecível, sendo susceptível aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as suas características de qualidade, rendimento e durabilidade, e que apresenta uma vida de prateleira curta, mesmo sob condições adequadas de refrigeração (Furtado *et al.*, 1980a). Devido a estes fatores, algumas modificações no processamento do queijo Minas Frescal foram estudadas e implantadas com o intuito de aumentar a vida de prateleira, como a substituição da adição de cultura láctica pelo ácido láctico industrial, sendo esta operação conhecida como acidificação direta. Um estudo detalhado sobre o tema foi realizado por Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978). Os resultados obtidos demonstraram as desvantagens do uso de fermento em decorrência do maior grau de acidificação e proteólise provocada pelas bactérias lácticas que o constituem. Além de um produto com menores alterações durante a vida de prateleira, o uso de ácido láctico proporcionou a diminuição da acidez e aumento do rendimento de fabricação e dos valores de pH. Outros estudos foram realizados objetivando o aumento do rendimento, diminuição do custo de fabricação e melhorias de parâmetros de qualidade, através do acompanhamento das alterações físico-químicas e organolépticas (Furtado *et al.*, 1980b; Wolfschoon-Pombo *et al.*, 1984; Boghossian, 1995; Saboya, 1997). No entanto, a supressão do uso de culturas lácticas, pode levar a uma maior tendência à proliferação de bactérias patogênicas e deteriorantes. Relatos de alguns estudos realizados visando o controle microbiológico desses produtos indicam tal hipótese (Dornellas, 1997; Lourenço-Neto, 1998; Campos, 2000), porém em nenhum destes trabalhos a avaliação das bactérias patogênicas era o foco principal das pesquisas.

Os queijos, devido à sua composição, constituem-se em excelentes substratos para microrganismos, inclusive para *Listeria monocytogenes*, bactéria

que se encontra amplamente disseminada na natureza, que possui capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e de sobrevivência durante longos períodos sob condições adversas.

Os produtos lácteos já foram incriminados em vários surtos nas últimas décadas, envolvendo produtos como leite pasteurizado, queijo macio tipo Mexicano e queijo mole tipo "Vacherin Mont d'Or". Outros alimentos como saladas, camarão, patê, salame, marisco (Farber & Peterkin, 1991) e alimento à base de língua de porco cozido (Dever *et al.*, 1993) já foram associados a surtos de listeriose.

Segundo dados do "Center for Disease Control and Prevention" (Center for Disease Control and Prevention, 2001), há aproximadamente 2500 casos/ano de listeriose nos Estados Unidos, com estimativa de 500 casos fatais (a cada ano). Em 2000, um surto devido ao consumo de carne de peru contaminada resultou em 29 casos, dentre os quais 4 mortes e 3 abortos em 10 estados dos Estados Unidos. No Brasil, embora a Resolução-RDC 12, de 02 de janeiro de 2001, determine a ausência de *Listeria monocytogenes* para queijos, várias pesquisas (Destro *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 1998, Vieira, 2000) têm demonstrado a presença deste microrganismo em diversos produtos comerciais.

A relevância dos fatos apresentados acima, aliados ao aumento de produção de queijo Minas Frescal e, à falta de estudos sobre o assunto, despertaram o interesse da pesquisa sobre o comportamento dos microrganismos patogênicos e em particular de *Listeria monocytogenes*, em queijos fabricados com o ácido láctico, método este utilizado em boa parte dos laticínios nos últimos anos. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o comportamento de *Listeria monocytogenes* inoculada artificialmente em queijos produzidos por acidificação direta, com o emprego de ácido láctico industrial em comparação ao chamado método convencional ou tradicional, com o uso de bactéria lácticas, durante armazenamento refrigerado a 5°C e à temperatura de abuso de 10°C por 25 dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

2.1. Queijo Minas Frescal

O queijo é um alimento de alto valor nutritivo, de sabor agradável, existente em grande número de variedades e produzido em larga escala mundial.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos (Brasil, 1996) “Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro de leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem a agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes”.

A produção de queijos representa uma das mais importantes atividades da indústria de laticínios. No Brasil, os tipos de queijo de maior consumo são o Mussarela, o Prato e o Minas Frescal, cuja produção ocorre principalmente, em indústrias de pequeno e médio porte nas regiões Sul e Sudeste. A intensa produção deve-se, em parte, ao maior rendimento obtido na elaboração desses queijos e ao seu processamento simples que requer um breve período de maturação (ou nenhuma maturação, no caso do Minas Frescal), o que possibilita um retorno rápido de investimento e conseqüentemente custos menores ao consumidor (Oliveira *et al.*, 1998).

Analisando-se o mercado de produtos lácteos no Brasil, observa-se que o queijo Minas Frescal ocupa papel de grande destaque, sendo largamente difundido, de grande popularidade e consumido praticamente em todo o país (Isepon & Oliveira, 1995).

Embora muito semelhante ao “Queso Blanco”, fabricado em outros países da América Latina, o queijo Minas Frescal pode ser considerado o único queijo genuinamente nacional, tendo sua origem no Estado de Minas Gerais (Van Dender & Schneider, 1988).

Segundo Furtado (1990), a produção do queijo Minas Frescal sofreu uma reversão de tendências a partir de 1980, quando então o Minas Padrão (queijo tipo “Minas” prensado e maturado por aproximadamente 20 dias) era fabricado em quantidade duas vezes superior ao Minas Frescal. Essa tendência pode ser explicada pela preferência das empresas em produzir o Minas Frescal, que é um queijo de maior rendimento (6,0 – 6,5 litros de leite / kg em média) e que não requer maiores investimentos em estocagem e conservação, necessitando de menor capital de giro e permitindo a colocação do queijo, no mercado a preços mais acessíveis a uma maior faixa da população.

O processo básico de fabricação do queijo Minas Frescal pode ser descrito pelas seguintes etapas: pasteurização do leite, coagulação, corte da massa, dessoragem, enformagem, salga, embalagem e refrigeração (Sghedoni *et al.*, 1979).

A produção de Minas Frescal em 1991 era de 17.950 toneladas e em 1998 esse número alcançou a marca de 26.400 toneladas (Leite Brasil, 2001). Esses dados referem-se a estabelecimentos sob inspeção federal, mas imagina-se que no mercado informal e clandestino, a produção de queijo Minas Frescal seja muito superior às relatadas.

Várias diferenças nos processos de elaboração de queijo Minas Frescal podem ser encontradas, como por exemplo a adição de ácido láctico industrial ou o emprego tradicional de fermento, variações na temperatura de coagulação e até mesmo a utilização de prensagem. Assim, o Minas Frescal tornou-se um queijo bastante irregular em termos de padrão de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento, chegando inclusive a ser fabricado pelo processo de ultrafiltração. Além dessas possibilidades de modificações, existem algumas outras não mencionadas na literatura, porém usadas em pesquisas, bem como na prática em laticínios de pequeno e médio porte. Dentre elas destacam-se o uso de aquecimento do leite para aumentar o rendimento, o uso de salga na massa (em forma de salmoura), a substituição parcial do fermento por ácido láctico, o uso de fermentos lácticos termofílicos, etc (Van Dender & Moreno, 1992).

O queijo Minas Frescal comumente apresenta coloração interna esbranquiçada, consistência mole, textura fechada, com algumas olhaduras irregulares e sabor variando de levemente ácido a suave. O peso varia de 0,3-5kg, sendo comercializado geralmente em formas de menor peso. A composição média esperada do queijo Minas Frescal é de 55-58% de umidade, 17-19% de gordura, 1,4-1,6% de sal e pH de 5,0-5,3 (Furtado & Lourenço Neto, 1994; citado por Saboya, 1998; Brasil, 1997b). No caso de queijos fabricados com ácido láctico em substituição ao fermento, o pH se situa na faixa de 6,1-6,3 e a umidade pode variar de 60-63% (Wolfschoon-Pombo *et al*, 1978; Furtado, 1980b).

Geralmente o queijo Minas Frescal é comercializado em embalagens plásticas comuns, amarradas ou fechadas com fechos metálicos, porém sem o emprego de vácuo. No interior destas embalagens forma-se geralmente um depósito de soro exsudado dos queijos, que ocorre principalmente devido ao alto teor de umidade presente, e que, além de depreciar o produto, pode favorecer o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, propiciando freqüentemente o aparecimento de sabores e odores desagradáveis. Por estas razões, o queijo Minas Frescal apresenta vida de prateleira muito curta, em torno de 10 dias, mesmo sob condições de refrigeração, ou seja, sob temperaturas de 0-5°C (Oliveira, 1986).

No processamento deste tipo de queijo há várias etapas de fabricação consideradas como pontos críticos de contaminação que podem conduzir a alterações no produto final. Estas alterações influenciam a umidade final, o sabor do queijo, o rendimento e a durabilidade, afetando diretamente as características sensoriais e, conseqüentemente, a aceitabilidade pelo consumidor (Furtado & Lourenço Neto, 1994; citado por Saboya, 1998).

2.2. Queijo Minas Frescal e Saúde Pública

O queijo Minas Frescal vem assumindo considerável importância no aspecto de Saúde Pública, pois tem sido considerado um problema emergente da Vigilância Sanitária, exigindo maior atenção por parte dos órgãos oficiais,

principalmente no que concerne ao controle higiênico-sanitário do produto (Pinto *et al.*, 1996).

Segundo Escartín *et al.* (1983), a qualidade comercial e sanitária de queijos frescos baseia-se em três fatores: o conteúdo microbiano da matéria-prima (quase sempre muito rica em quantidade e qualidade), a técnica e as condições higiênicas de fabricação e os níveis de refrigeração e higiene na etapa de comercialização.

O queijo tipo Minas originou-se de fabricação caseira no Estado de Minas Gerais, com tecnologia artesanal desenvolvida principalmente na região da cidade do Serro e da Serra da Canastra, a partir do leite cru, constituindo uma tradição secular (Pinheiro *et al.*, 1992).

Esta tradição de produção do queijo Minas Frescal utilizando leite cru ainda ocorre nos dias atuais, apesar de contrariar o que define o artigo 600, 2º parágrafo, do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal: “só é permitida a fabricação de queijos frescos e moles a partir do leite pasteurizado” (Brasil, 1962).

O leite cru constitui importante via de transmissão de inúmeros agentes etiológicos, como: *Mycobacterium* sp, *Brucella* sp, *Coxiella burnetti*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Escherichia coli*. A elevada ocorrência de casos de mastites no rebanho leiteiro, ao lado das deficiências na higiene da ordenha, são as principais causas da produção de leite e, conseqüentemente, da de queijos frescos com elevados teores de patógenos (Germano & Germano, 1995).

Contribuem também para a má qualidade desses produtos, os processos improvisados de fabricação, geralmente em instalações deficientes e sem higiene, o armazenamento, transporte e exposição a altas temperaturas, desde a produção até a comercialização. No comércio varejista, a contaminação pode ocorrer por manipulação, durante o retalho do produto e embalagem, ou no armazenamento em depósitos ou balcões não refrigerados (Pinto *et al.*, 1996).

Em relação aos resíduos químicos, o grau de contaminação de queijos depende da concentração dessas substâncias no leite, sejam elas de origem intrínseca ou extrínseca. Na atualidade, o problema principal é representado pelos antibióticos, administrados aos animais portadores de infecções, sobretudo aqueles com mastites ou adicionados diretamente no leite como impediante do crescimento bacteriano. Deve-se destacar que os antibióticos causam inibição da microbiota lática responsável pelos processos de fermentação normal do queijo, favorecendo o desenvolvimento de coliformes, leveduras, mofos, parasitas e microrganismos putrefativos que provocam deterioração do produto; como resultado, verifica-se a má dessoragem da coalhada e a produção de gás por fermentação indesejável. De maior gravidade são os efeitos diretos dos antibióticos sobre a saúde dos consumidores, quando ingeridos através dos alimentos: reações alérgicas pela penicilina, lesões da medula óssea pelo cloranfenicol, distúrbios ósseos e dentários em crianças pela ação das tetraciclina, e, ainda, o risco do desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes (Fagundes & Molin, 1988).

A contaminação do queijo Minas Frescal por microrganismos patogênicos pode ocorrer durante o processo de fabricação, com o leite pasteurizado sendo acrescido de fermentos não ativos ou na manufatura, transporte e armazenamento em temperaturas inadequadas e, principalmente, pela manipulação (Dias *et al.*, 1995).

Os alimentos podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem, ou como substrato para microrganismos que poderão elaborar substâncias nocivas que trarão prejuízos quando ingeridas. Portanto, quando discute-se sobre doenças que podem ser transmitidas por alimentos, observamos a importância dos microrganismos neles presentes (Gonçalves, 1998).

Bryan (1992) utiliza o termo doenças de origem alimentar e as classifica como síndromes causadas pela ingestão de alimentos onde estariam presentes agentes tóxicos ou infecciosos, ou seja, seriam as intoxicações ou infecções, respectivamente. O mesmo autor cita que as intoxicações seriam causadas pela

ingestão de qualquer substância tóxica, seja ela encontrada em tecido animal ou vegetal, toxinas elaboradas por microrganismos, etc. As infecções seriam de origem bacteriana e esses microrganismos alcançariam o trato intestinal elaborando enterotoxinas. As infecções também seriam causadas por microrganismos que invadiriam a mucosa intestinal, onde se multiplicariam e passariam para outros órgãos.

Sabioni (1988) identificou a ingestão de queijo Minas Frescal contaminado com *Staphylococcus aureus* como causa de surto de intoxicação alimentar em quatro pessoas de uma família, das quais duas tiveram internação hospitalar. Além do *Staphylococcus aureus*, o número de coliformes fecais excedia os padrões, confirmando o alto nível de contaminação do queijo consumido.

Sabioni *et al.* (1994) verificou a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* a partir do consumo de queijo Minas produzido com leite não pasteurizado, fabricado na fazenda e comercializado pelo próprio fabricante sem qualquer refrigeração. O surto atingiu 11 pessoas, das quais três foram hospitalizadas. A análise do queijo revelou contagem da ordem de 10^8 UFC/g, confirmando o *Staphylococcus aureus* como agente causador.

Dias *et al.* (1995) analisaram 21 surtos notificados pelo Serviço de Vigilância Sanitária de diferentes cidades mineiras (entre 1992 e 1994), provocados principalmente por queijo Minas Frescal. Das 239 pessoas expostas, 218 (91,3%) apresentaram sintomatologia característica de intoxicação estafilocócica e 49 (20,5%) foram hospitalizadas. O principal agente etiológico envolvido foi o *Staphylococcus aureus*, presente em 85,7% das amostras com contagens entre 10^5 a 10^9 UFC/g.

Silva & Castro (1995) analisaram um surto provocado por queijo tipo "Minas" ocorrido na cidade de Contagem-Minas Gerais, em que 15 pessoas foram expostas ao produto e apenas uma não adoeceu, revelando uma taxa de ataque de 93,3%. A análise do produto revelou a presença de coliformes fecais ($> 1,1 \times 10^5$ NMP/g), *Staphylococcus aureus* (10^5 NMP/g) e a presença de *Salmonella* do grupo D. Diante das pesquisas realizadas e pelo período de incubação, conclui-se

que tinha ocorrido infecção por *Salmonella* do grupo D associada a uma intoxicação por enterotoxinas estafilocócicas.

2.3. Microrganismos Presentes em Queijo Minas Frescal

A contaminação de queijos por microrganismos constitui problema de grande relevância para as indústrias, pois pode acarretar alterações organolépticas e estruturais no produto, além do risco de doenças transmitidas por alimentos.

2.3.1. Microrganismos Indicadores/Deteriorantes

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 em um alimento, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (Landgraf, 1996).

As bactérias do grupo coliformes são consideradas como os principais agentes contaminantes associados à deterioração de queijos, causando estufamento precoce dos produtos (Oliveira *et al.*, 1998). Deve-se destacar que, a presença desses microrganismos, principalmente os de origem fecal, indica as condições de higiene em que os queijos são processados, já que estes microrganismos, comumente encontrados em leite cru, são destruídos pelo calor da pasteurização (Lück, 1987).

Silva (1980), examinando a qualidade microbiológica de 60 amostras de queijo Minas Frescal no Rio de Janeiro – RJ, constatou que 78,33% dos queijos apresentaram contagens de *Escherichia coli* superior a 10^2 /g (NMP).

Carvalho *et al.* (1981) em Lavras – MG, constataram que das 144 amostras de queijo Minas Frescal analisadas, 63,9% apresentaram coliformes fecais com populações acima de 10^2 /g (NMP).

Nascimento *et al.* (1995) analisaram 51 amostras de queijos tipo Minas Frescal e obtiveram 46 amostras (90,2%) fora dos padrões para coliformes fecais.

Oliveira *et al.* (1998) analisaram 32 amostras de queijos Minas Frescal e registraram que os níveis de coliformes totais estavam acima de 10^3 /g em 15 amostras (46,9%). Para coliformes fecais, foram encontradas 3 amostras (9,4%) de queijos Minas Frescal com população acima do limite de tolerância adotado no Brasil (10^2 /g), segundo a Portaria nº 01/87 do Ministério da Saúde, tomada como especificação legal pelos autores.

Dias *et al.* (1995), analisando dados sobre surtos ocorridos em Minas Gerais, entre 1992 e 1994 observaram que 61,9 % das amostras apresentaram coliformes de origem fecal com valores entre 10^3 e 10^5 NMP/g.

Pereira *et al.* (1999), em Belo Horizonte – MG, analisaram 20 amostras de queijo Minas Frescal com e sem registros do Serviço de Inspeção Federal (SIF) quanto à contagem de coliformes fecais. Segundo os autores, 90% das amostras apresentaram elevada contagem de coliformes fecais, superior ao valor permitido pela legislação (Portaria nº 01/87 do Ministério da Saúde).

Outros microrganismos comuns em deterioração de queijos são os microrganismos esporulados anaeróbios do gênero *Clostridium*, que provocam o estufamento tardio. O estufamento tardio pode ser causado por *Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes* e, sobretudo, pelo *Clostridium tyrobutyricum*, que aparece geralmente após duas semanas de fabricação, devido à degradação do lactato e à produção de CO_2 , H_2 , ácidos butírico e acético, os quais se expandem no interior do queijo provocando o abaulamento do produto, o aparecimento de trincas e alterações do sabor (Moraes & Hajdenwurcel, 1982, citado por Pinto, 1996).

2.3.2. Microrganismos Patogênicos

São os microrganismos que, presentes em alimentos, podem ser responsáveis por “doenças microbianas de origem alimentar” ou “toxinfecções

alimentares” (Franco & Landgraft, 1996). Vários estudos realizados em queijos Minas Frescal têm permitido o isolamento de inúmeros patógenos de importância em Saúde Pública, destacando-se o *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, diversos sorogrupos de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, entre outros.

Silva (1980) examinando a qualidade microbiológica de 60 amostras de queijos Minas Frescal na cidades do Rio de Janeiro, constatou que 38,33% dessas amostras apresentavam contaminação por *Staphylococcus aureus* superior a 10^3 UFC/g.

Em Belo Horizonte-MG, Mandil *et al.* (1982) analisaram 99 amostras de queijo tipo “Minas” quanto à presença de *Staphylococcus aureus* e observaram que 65 das amostras (65,7%) estavam contaminadas, em níveis variando de 10^1 a $>10^5$ /g.

Carvalho *et al.* (1981), após analisarem 144 amostras de queijo Minas Frescal, revelaram que 20,3% das amostras estavam contaminadas com *Staphylococcus aureus* numa faixa de $5,0 \times 10^5$ a $1,0 \times 10^7$ UFC/g.

Furlanetto *et al.* (1983), citado por Nascimento (1995), pesquisaram a qualidade microbiológica de 30 amostras de queijo Minas Frescal provenientes de supermercados da cidade de São Paulo quanto à presença de *Staphylococcus aureus*. Os resultados indicaram que 36,7% das amostras estavam contaminadas com o microrganismo em níveis de $1,5 \times 10^2$ a $1,2 \times 10^5$ UFC/g.

Nascimento *et al.* (1995), analisando 51 amostras de queijo Minas Frescal quanto a contagem de *Staphylococcus aureus*, observaram que 46 amostras ou 90,2% apresentavam-se fora dos padrões vigentes e que 62,75% dessas amostras apresentavam contagens entre 10^5 e 10^7 UFC/g.

Oliveira (1993), investigando a presença de bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados, observou a presença em 6% das amostras de queijo Minas Frescal.

Cerqueira *et al.*, (1995) analisando 30 amostras de queijo Minas Frescal fabricados e comercializados em Belo Horizonte quanto à presença de *Listeria sp*, obtiveram como resultado 3 amostras positivas para esse microrganismo.

Em trabalho coordenado por Almeida Filho & Nader Filho (2000), 80 amostras de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente e comercializado na cidade de Poços de Caldas-MG, foram investigadas quanto à presença e quantidade de *Staphylococcus aureus*. Os resultados obtidos evidenciaram a presença desse microrganismo em 40 (50%) amostras, cujas contagens revelaram valores médios de $10^5/g$. Segundo os autores, os resultados são extremamente preocupantes, pois além de se situarem acima do limite máximo de $10^3/g$, estabelecido pelo Ministério da Saúde, os valores mostraram-se muito próximos dos requeridos para a produção de enterotoxinas em quantidades suficientes para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Entre janeiro e junho de 2000, foram analisados quanto à qualidade microbiológica, 70 amostras de queijo Minas Frescal de diversas marcas comerciais provenientes de 15 municípios do estado de Goiás. Quarenta e três amostras (61,43%) foram consideradas fora dos padrões legais vigentes. Dentre essas, 26 (37,14%) foram classificadas como “produto impróprio para o consumo” e 5 (7,14%) como “produto em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias” devido às contagens de *Staphylococcus coagulase positiva* (Vieira *et al.*, 2001).

2.3.2.1. *Listeria monocytogenes*

Apesar de constar na 9ª edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, que o gênero *Listeria* é constituído por oito espécies: *L.monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L.innocua*, *L. denitrificans*, *L.seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi* (Holt *et al.*, 1994), o mesmo tem sofrido constantes alterações taxonômicas. A espécie *L. denitrificans* foi reclassificada como *Jonesia denitrificans* e, recentemente, as espécies *L. grayi* e *L. murrayi* foram agrupadas em uma única espécie, *Listeria grayi*. A espécie *L. ivanovii*, por sua vez, foi

subdividida em duas espécies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* e *L. ivanovii* subsp. *londoniensis*.

As espécies de *Listeria* são caracterizadas como bastonetes curtos, com dimensões de 0,4 a 0,5 μm de diâmetro por 0,5 a 2,0 μm de comprimento, com extremidades arredondadas, podendo ocorrer isoladas, em cadeias curtas. São microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-positivos, móveis (locomoção através de flagelos peritríquios, quando cultivados a 20-25°C), não esporulados e não capsulados.

Dentre as espécies conhecidas até o momento, apenas a *L. monocytogenes* e a *L. ivanovii* são consideradas patogênicas ao homem e aos animais quando presentes em alimentos. *Listeria monocytogenes* se destaca por atingir tanto os homens quanto os animais, sendo considerada um problema de saúde pública, enquanto a *Listeria ivanovii* é patogênica somente para os animais (Seeliger & Jones, 1986).

Listeria monocytogenes pode crescer em uma faixa de pH de 5,0 a 9,6, mas podem ocorrer extrapolações desses valores quando outros fatores são envolvidos (Donnelly *et al.*, 1992). É tolerante ao sal pois constatou-se a sua sobrevivência em concentrações de 10,5% e 13% quando incubada a 37°C por 15 e 10 dias, respectivamente. Em concentrações de 20%-30% de NaCl, o tempo de sobrevivência foi reduzido para cinco dias, mas se a temperatura é reduzida para 4°C, a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5% e 30,5% de NaCl (Lovett & Twedt, 1988).

A atividade de água ótima para crescimento de *Listeria monocytogenes* é próxima a 0,97, podendo porém, se multiplicar em atividade de água considerada baixa para a multiplicação de patógenos-0,92. Há relatos de sobrevivência de *Listeria monocytogenes* a 4°C por, pelo menos, 132 dias em caldo tripticase soja contendo NaCl na concentração de 25,5%, com atividade de água de 0,83% (Ryser & Marth, 1991).

A capacidade de proliferação da *Listeria monocytogenes* à baixas temperaturas ocasiona sérios problemas às indústrias de alimentos, e particularmente aos laticínios. Pode crescer à temperatura de refrigeração (Doyle, 1988), com proliferação entre $-0,4$ a 50°C (Farber & Peterkin, 1991) sendo crescimento ótimo da *L. monocytogenes* entre $30-37^{\circ}\text{C}$ (Seelinger & Jones, 1986).

Listeria monocytogenes é um microrganismo amplamente difundido na natureza e pode ser isolado de diversas fontes como vegetação, solo, silagem, esgoto, lodo, leite de animais sadios e com mastites, fezes de humanos e água (Farber *et al.*, 1987; Comi *et al.*, 1987). Outras fontes de transmissão do microrganismo ao homem são produtos de laticínios, carnes e frutos do mar (Ryser & Marth, 1991).

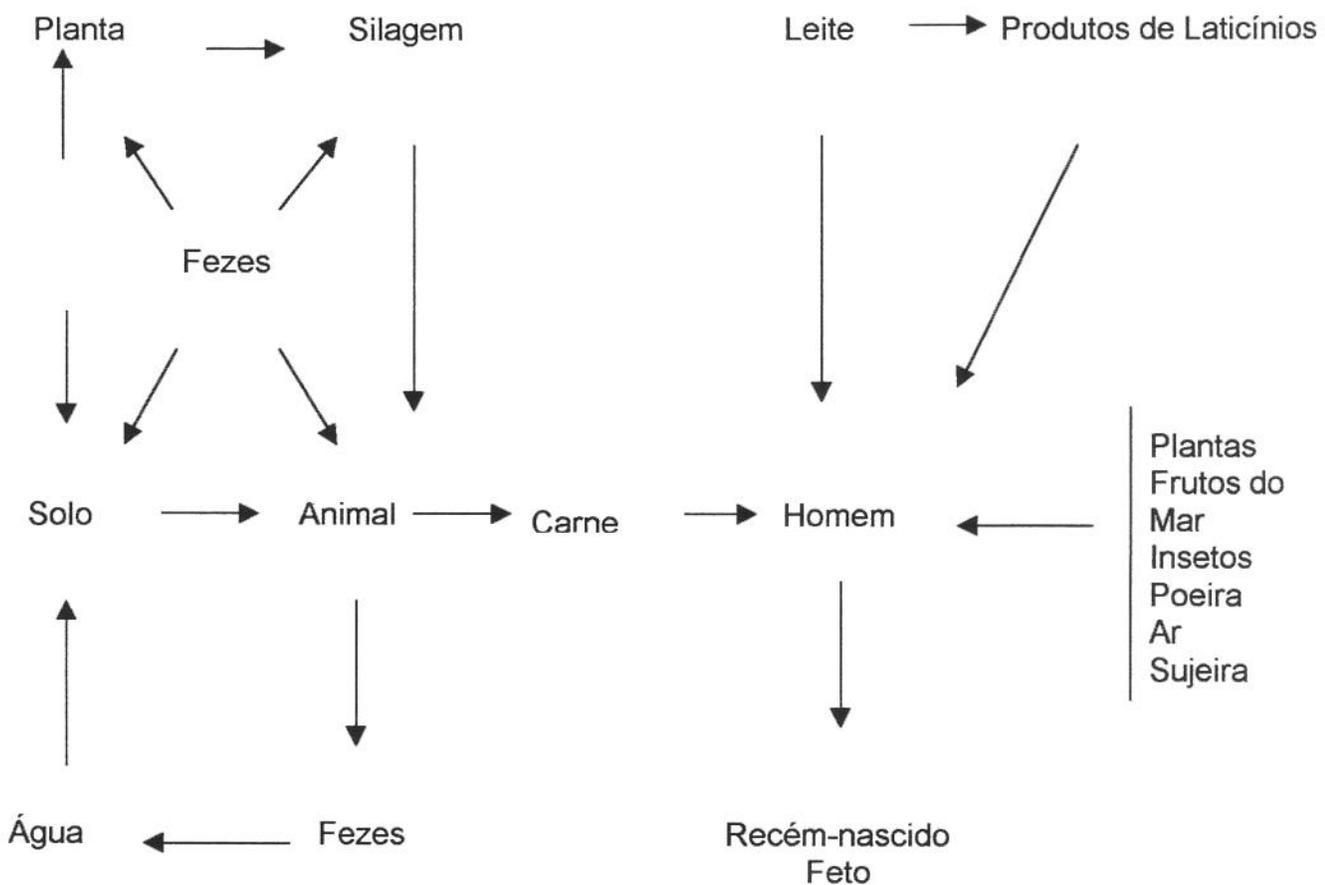


Figura 1. Rotas de transmissão de *Listeria monocytogenes* ao homem.
Fonte: Ryser & Marth (1991)

Há tempos que *Listeria monocytogenes* é conhecida como um patógeno humano, mas só recentemente foi reconhecida como um patógeno veiculado por alimentos (Farber *et al.*, 1987). Segundo Rocourt & Cossart (1997), foi durante a década passada que a listeriose emergiu como uma das principais doenças de origem alimentar, em decorrência de vários fatores: a) progresso da medicina e conseqüente transição demográfica, determinante do aumento da população imunocomprometida e idosa, b) mudanças na produção primária de alimentos, tais como a produção de matéria-prima em grande escala, modificações na tecnologia de processamento de alimentos, expansão da indústria agroalimentar e desenvolvimento de sistemas de armazenamento refrigerado, c) mudanças nos hábitos alimentares, com aumento da demanda por alimentos refrigerados ou congelados prontos para o consumo, e mudanças nas práticas de manipulação e preparo de alimentos.

Trata-se de um microrganismo oportunista que afeta preferencialmente indivíduos com sistema imunológico comprometido, mulheres grávidas, recém-nascidos, crianças com menos de 1 ano, idosos e pacientes vítimas de câncer. É um patógeno invasivo que coloniza inicialmente a mucosa do trato intestinal e a partir daí a célula bacteriana é fagocitada por macrófagos. Após a lise da membrana fagocítica, a bactéria é liberada no citoplasma da célula do hospedeiro, onde se multiplica rapidamente. Ocorre também a polimerização de filamentos de actina da célula do hospedeiro, formando longas caudas em uma das extremidades da célula bacteriana. Esses filamentos causam o deslocamento da bactéria no citoplasma, invadindo as células adjacentes, dando início a um novo ciclo de infecção (Silva & Tibana, 1995; Franco & Landgraf, 1996).

Seeliger & Finger (1976) identificaram nove diferentes manifestações de listeriose: 1) listeriose durante a gestação; 2) listeriose em recém-nascidos (granulomatose infantiséptica); 3) meningite, meningoencefalite e encefalite; 4) forma cutânea; 5) septicemia com faringite e mononucleose; 6) forma oculoglandular; 7) forma cervicoglandular; 8) granulomatose séptica e forma tifóide; 9) outras formas. Os primeiros sintomas de listeriose são meningite, aborto

e septicemia em recém nascidos. Sem intervenção médica adequada, a principal causa mortis é a meningite (Silliker, 1986).

A dose infectante capaz de causar listeriose em pessoas sadias ou que fazem parte do grupo de risco ainda é desconhecida. Essa dose depende de vários fatores, incluindo a susceptibilidade do indivíduo e virulência da cepa. Entretanto, baseado em dados provenientes da análise de alimentos envolvidos em surtos e casos de listeriose, uma dose superior a 100 UFC/g geralmente é aceita como capaz de provocar a doença, não excluindo a possibilidade de que doses inferiores também possam ser infectantes (Farber & Perkin, 1991; ICMSF, 1996; Rocourt & Cossant, 1997).

A partir dos anos 80, surtos de listeriose vêm sendo relatados com maior freqüência, sendo vários deles relacionados a leite e produtos lácteos.

Em 1983, um surto de listeriose ocorrido em Massachusetts - EUA foi associado a leite pasteurizado. Quarenta e nove pessoas foram envolvidas, com taxa de 29% de mortalidade (Fleming *et al.*, 1985).

Na primavera de 1985, queijo macio tipo Mexicano produzido por uma empresa da Califórnia - EUA foi responsável por 181 casos envolvendo mães e recém-nascidos (ocasionando 65 mortes) e mais 133 casos em outras pessoas da população com uma taxa total de mortalidade de 33,4% (Center for Disease Control and Prevention, 1985).

Entre 1983 a 1987, outro surto envolvendo queijo mole Vacherin Mont d'Or foi relatado na Suíça com 122 pessoas acometidas por listeriose (Bille, 1990).

Apesar de vários relatos envolvendo *Listeria monocytogenes* em queijos, ainda há poucos estudos quanto à incidência deste microrganismo no Brasil.

Destro *et al.* (1991), analisaram 20 amostras de queijo Minas Frescal (entre outros produtos) e encontraram positividade para *Listeria monocytogenes* em 02 (10%) das amostras.

Casarotti *et al.* (1994), analisaram 20 amostras de queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba – SP e não detectaram a presença de *Listeria*

monocytogenes. Porém o método utilizado pelos autores para detecção foi o sugerido pelo “Food and Drug Administration” (FDA) , que parece não ser o método mais recomendável para produtos em que a bactéria encontra-se em baixo número ou na forma injuriada.

Silva *et al.* (1988) analisaram 103 amostras de diferentes tipos de queijos comercializados na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, e registraram um total de 11 amostras positivas para *Listeria monocytogenes* (10,68%), sendo 07 amostras de Minas Frescal produzido artesanalmente, 01 amostra de Minas Frescal e Ricota produzidos industrialmente e 03 amostras de queijos maturados (Gorgonzola, Brie e Roquefort).

Vieira (2000) analisou 20 amostras de queijo Minas Frescal adquiridas de diversos pontos comerciais na cidade de Campinas –SP, sendo 10 delas provenientes de feira-livre e 10 de supermercado. Dessas amostras 5 (25%) estavam contaminadas com *Listeria monocytogenes*, 8 (40%) com *Listeria innocua*, 4 (20%) com *Listeria welshimeri* e 1 (5%) com *Listeria seeligeri*.

2.4. Alternativas Tecnológicas para a Fabricação do Queijo Minas Frescal

Alguns estudos têm sido realizados com o intuito de promover melhorias na tecnologia tradicional de fabricação do queijo tipo Minas Frescal, como o aumento da vida de prateleira, rendimento e uma maior padronização do produto.

Entre os fatores que determinam diferenças entre as variedades de queijos, incluem-se os microrganismos existentes no leite ou inoculados. Eles contribuem para as transformações que ocorrem nos componentes do leite, necessárias para se obter uma massa com as características de consistência, textura, sabor e aroma adequados (Bonassi, 1979).

Segundo Vieira (1981), as bactérias lácticas são de grande importância nas indústrias de laticínios, pelas seguintes razões:

- A formação do ácido láctico (através da fermentação da lactose) promove uma proteção aos alimentos devido à inibição das bactérias que causam a putrefação, sendo o ácido láctico considerado um agente de conservação.
- A produção de uma certa quantidade de ácido láctico, durante a fabricação do queijo, evita o crescimento de bactérias patogênicas e produção de toxina na coalhada e no soro.
- O ácido láctico facilita certas condições físico-químicas em diversos produtos na indústria de laticínios, dessoragem da massa do queijo e a união dos grãos na fabricação de manteiga.
- Produção de enzimas que intervêm na degradação das proteínas, principalmente da caseína, durante a maturação dos queijos.
- Produção de substâncias inibidoras, responsáveis pela seleção das espécies.

Segundo Vedamuthu & Reinbold (1967), a cultura láctica é o ingrediente mais importante na fabricação dos queijos. Esta cultura é apropriadamente chamada “starter”, porque ela inicia a maioria das reações e mudanças que tomam parte na fabricação do queijo, permanecendo no período da cura. Essas bactérias apresentam duas funções importantes: a) produção rápida e uniforme de acidez durante a fabricação e b) desenvolvimento de “flavour”.

Antes da importância do fermento láctico ser reconhecido, já se fazia uso dos mesmos na preservação de produtos lácteos. Durante seu crescimento em produtos fermentados, as culturas lácticas incluindo os lactococci (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*), os lactobacilli (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*), os leuconostocs (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*) e *Streptococcus thermophilus* produzem metabólitos inibidores. Esses inibidores incluem um amplo espectro de antagonistas, ácidos orgânicos, diacetil e peróxido de hidrogênio. Algumas “culturas starters” são produtoras de bacteriocinas ou proteínas bactericidas (Barefoot & Nettles, 1993).

A ação das bacteriocinas pode ocorrer de diferentes formas, dependendo mais dos fatores relacionados à espécie bacteriana. Podem assim, promover um efeito letal bactericida, sem lise celular ou com lise celular (bacteriolítico) ou ainda inibir a multiplicação microbiana, com efeito bacteriostático (Carminati, *et al.*, 1989).

Na técnica tradicional de obtenção do queijo Minas Frescal faz-se uso do leite pasteurizado e adição de culturas mesófilas (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) (Bonassi, 1979).

Apesar dos benefícios citados acima, alguns pesquisadores têm estudado a substituição do fermento láctico pelo uso do ácido láctico industrial no processo de fabricação do queijo Minas Frescal.

O ponto inicial para essas investigações partiu do questionamento de que sendo o queijo Minas Frescal um produto de consumo imediato, sem a necessidade da etapa de maturação, qual seria então a real finalidade da adição do fermento láctico, já que esse promove um acidificação e proteólise excessivas no produto, provocadas pela ação das bactérias lácticas sobre a lactose e proteínas do queijo (Furtado *et al.*, 1980a).

No estudo comparativo realizado por Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978), em que foram processadas oito bateladas de queijo Minas Frescal utilizando-se fermento láctico e ácido láctico industrial (em processos distintos), observou-se que, após seis dias de refrigeração, os queijos fabricados com fermento láctico apresentavam-se com cor amarelada, massa amolecida e sabor muito ácido, diferindo dos processamentos utilizando-se ácido láctico, em que o produto mostrou-se com corpo mais firme, sabor menos ácido e cor esbranquiçada, sendo que essas são algumas das características (cor, sabor e textura) que determinam a durabilidade do queijo.

O fermento láctico geralmente empregado no processo de obtenção do queijo Minas Frescal constitui-se de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, que são bactérias responsáveis pela fermentação da lactose, com produção de ácido láctico. O ácido láctico, devido ao seu acúmulo no produto,

promove o abaixamento do pH e aparecimento de flavor característico do queijo. Além disso, os microrganismos liberam proteases no meio que agem sobre a caseína e suas frações, elevando o teor de proteínas solúveis no queijo e provocando modificações na sua textura (Wolfschoon-Pombo *et al.* 1978).

O rendimento do queijo Minas Frescal devido ao processo de fabricação utilizado também é influenciado, como é citado em trabalhos de Campos *et al.* (1971), Furtado *et al.* (1980b) e Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978), em que queijos Minas Frescal produzidos com ácido láctico apresentam maior rendimento (litros leite/ kg de queijo) do que os que empregaram fermento láctico tradicional. O aumento do rendimento se deve, principalmente, ao aumento de umidade dos queijos, sendo no Frescal tradicional em torno de 59,10%, no Frescal com ácido láctico 61,10% e no Frescal sem fermento e ácido 62,76% (Furtado *et al.*, 1980b).

A diferença do rendimento pode ser explicada pela acidificação progressiva do queijo fabricado com culturas lácticas, causando assim o abaixamento do pH e maior perda de soro retido na coalhada. A caseína do leite ao coagular em complexo com o cálcio e fósforo forma o paracaseinato de cálcio, e, a permeabilidade do cálcio está ligada à presença de ácido. Com a coalhada mais ácida, a drenagem do soro é favorecida pela dissolução de sua armadura cálcica, pois a contínua produção de ácido láctico pela ação das culturas lácticas, faz com que esse ácido reaja com o cálcio do paracaseinato, solubilizando-o sob a forma de lactato de sódio, desmineralizando assim a coalhada. Esse gel láctico deixa escorrer espontaneamente uma certa quantidade de soro, que trata-se essencialmente de uma diminuição do grau de hidratação das micelas. (Wolfschoon-Pombo *et al.*, 1978)

Outra questão levantada por Campos *et al.* (1971), foi que queijos Minas Frescal produzidos com ácido láctico industrial, quando comparados aos queijos produzidos pelo método convencional, apresentam uma melhor padronização da produção possibilitando assim maior reprodutibilidade dos resultados nos ensaios laboratoriais.

Dornellas (1997) realizou análises microbiológicas em queijos produzidos pelo método tradicional e por acidificação direta, após três e trinta dias de produção. Segundo o autor, embora tenha havido crescimento microbiano durante o armazenamento, observou-se sempre contagem maior para os queijos produzidos por acidificação direta, evidenciando que, ocorrendo uma contaminação, a mesma se desenvolve mais facilmente no queijo sem fermento láctico, pois a flora do fermento funciona como um inibidor da flora contaminante.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

Para o processamento do queijo Minas Frescal, foram utilizados os seguintes produtos:

- Leite cru acondicionado em latões, proveniente da Cooperativa de Laticínios de Campinas;
- Coalho Chy-Max® 1:20000 obtido por fermentação (Laboratório Pfizer), contendo 100% quimosina tipo A;
- Ácido láctico industrial 85%, marca Synth;
- Fermento Ezal® , mesofílico homofermentativo, composto de cepas mistas de *Lactococcus lactis ssp. lactis* e *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (Rhodia);
- Cloreto de cálcio 50%, marca Synth;
- Cloreto de sódio (marca Lebre);
- Embalagens plásticas;

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação da força de coalho

Para a determinação da força de coalho, utilizou-se a metodologia descrita por Wolfschoon-Pombo (1980). Dez ml do coalho líquido CHY-MAX® foram diluídos em 100 ml de água destilada a 35°C e mantidos sob agitação constante em banho-maria regulado para a temperatura do teste. No momento em que foi verificada a presença de grumos finos, finalizou-se a cronometragem. O tempo decorrido entre a adição do coalho e a floculação inicial foi aplicado à fórmula, para cálculo da força de coalho:

$$FC = \frac{V \times 2400}{C \times t} \text{ , onde}$$

FC = Força de Coalho;

V = Volume de leite;

C = mg de coalho em 10 ml de solução previamente preparada;

t = Tempo (em minutos) entre a adição do coalho e a floculação inicial.

3.2.2. Preparo do inóculo

Para a inoculação do queijo foi utilizada *Listeria monocytogenes* Scott A. A cultura estoque foi mantida a 4°C em tubo com ágar tripticase soja (Oxoid) inclinado contendo 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSA-YE), a qual foi repicada mensalmente a fim de se manter a viabilidade das células. A ativação da cultura foi realizada mediante duas transferências consecutivas para caldo tripticase soja (Oxoid) adicionado de 0,6% de extrato de levedura (Difco) (TSB-YE) e incubação a 35°C durante 24 horas. Após o período de incubação, efetuou-se a contagem através de inoculação superficial em placas contendo ágar TSA-YE. Volume de 1 ml da cultura foi transferido para 100 ml de água peptonada estéril e a suspensão assim preparada foi utilizada para inocular a massa do queijo.

3.2.3. Processo de fabricação do queijo Minas Frescal

O leite cru foi filtrado em peneiras para remoção de eventuais sujidades físicas, sofreu padronização do teor de gordura para 3,2% e foi pasteurizado a 72°C por 15 segundos na usina piloto de laticínios do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA). Em seguida, o leite foi resfriado a 5°C e acondicionado em latões de 50 litros e armazenado em câmara fria à temperatura de 5°C. Fez-se uso de 50 litros de leite para cada tratamento: I) queijos elaborados com ácido láctico

de 50 litros de leite para cada tratamento: I) queijos elaborados com ácido láctico (acidificação direta) e II) queijos elaborados com fermento láctico (convencional). Os ensaios comparativos foram realizados em 3 oportunidades e os queijos foram processados utilizando-se 100 litros de leite (*Figura 2*).

O leite pasteurizado e resfriado (50l) foi reaquecido a 35°C, em tanque encamisado, pesado e transferido para o tanque de fabricação. Foram adicionados 25 ml (0,05%) de cloreto de cálcio 50%.

No queijo produzido por acidificação direta, fez-se uso de ácido láctico industrial na proporção de 0,025%(v/v), previamente diluído em água destilada a 2,5% para prevenir a precipitação das proteínas (Furtado *et al.*, 1980b). No queijo elaborado pelo método convencional, foi adicionado ao leite 1% (v/v) de fermento láctico mesófilo. Nos dois métodos utilizados, o coalho CHY-MAX® foi adicionado na proporção suficiente para coagular o leite em aproximadamente 50 minutos, sendo esta quantidade variável em função da força do coalho determinada previamente.

Após o tempo de repouso para a formação da coalhada (aproximadamente 50 minutos), realizou-se o corte da massa em tamanho padronizado para o queijo Minas Frescal (cubos de 1,5 cm x 1,5 cm), mantendo-se, então, a massa em repouso por três minutos. Em seguida, procedeu-se a agitação manual da coalhada por 25 minutos. A salga foi realizada na massa, antes da enformagem. O sal foi diluído em água na proporção de 2% do peso do leite. Promoveu-se a remoção de aproximadamente 20 litros de soro, para padronização da quantidade de massa + soro a ser inoculada. Uma quantidade da massa (\cong 3Kg) foi enformada antes da inoculação de *Listeria monocytogenes* sendo utilizada como controle, finalizando-se o processamento na planta de leite do DTA. A quantidade restante (massa + soro) do queijo foi transferida para o laboratório de Higiene de Alimentos (DTA) onde foi realizada a inoculação de *Listeria monocytogenes* na proporção de 10^9 UFC de *L. monocytogenes* em aproximadamente 20 Kg de massa. Procedeu-se a enformagem da massa em formas de 500 gramas. Os queijos foram submetidos a três viragens: 1ª após término da enformagem, 2ª

após 15 minutos de repouso e 3^a após 30 minutos e mantidas à temperatura de 5°C, completando o processo de dessoragem até o dia seguinte. Os queijos foram divididos em 5 partes de mesmo tamanho e acondicionados em embalagens plásticas. Cada uma destas cinco unidades amostrais foi retirada para as análises microbiológicas nos dias pré-estabelecidos. Os queijos permaneceram em incubadoras reguladas para 5°C e 10°C por 25 dias.

3.2.4. Análises físico-químicas do leite pasteurizado

As análises físico-químicas foram efetuadas no leite pasteurizado em cada dia de experimento. As determinações foram feitas em triplicata.

3.2.4.1. Amostragem

Fez-se a homogeneização do leite no latão onde o produto encontrava-se acondicionado, com utensílio próprio para este fim, e retirou-se quantidade suficiente para as análises realizadas.

3.2.4.2 Determinação da Acidez Titulável

A acidez das amostras de leite foi determinada utilizando-se o método de titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic) em presença de indicador de fenolftaleína, como descrito na seção 33.2.06 da A.O.A.C. (1995).

3.2.4.3. Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada utilizando-se potenciômetro marca Tecnal.

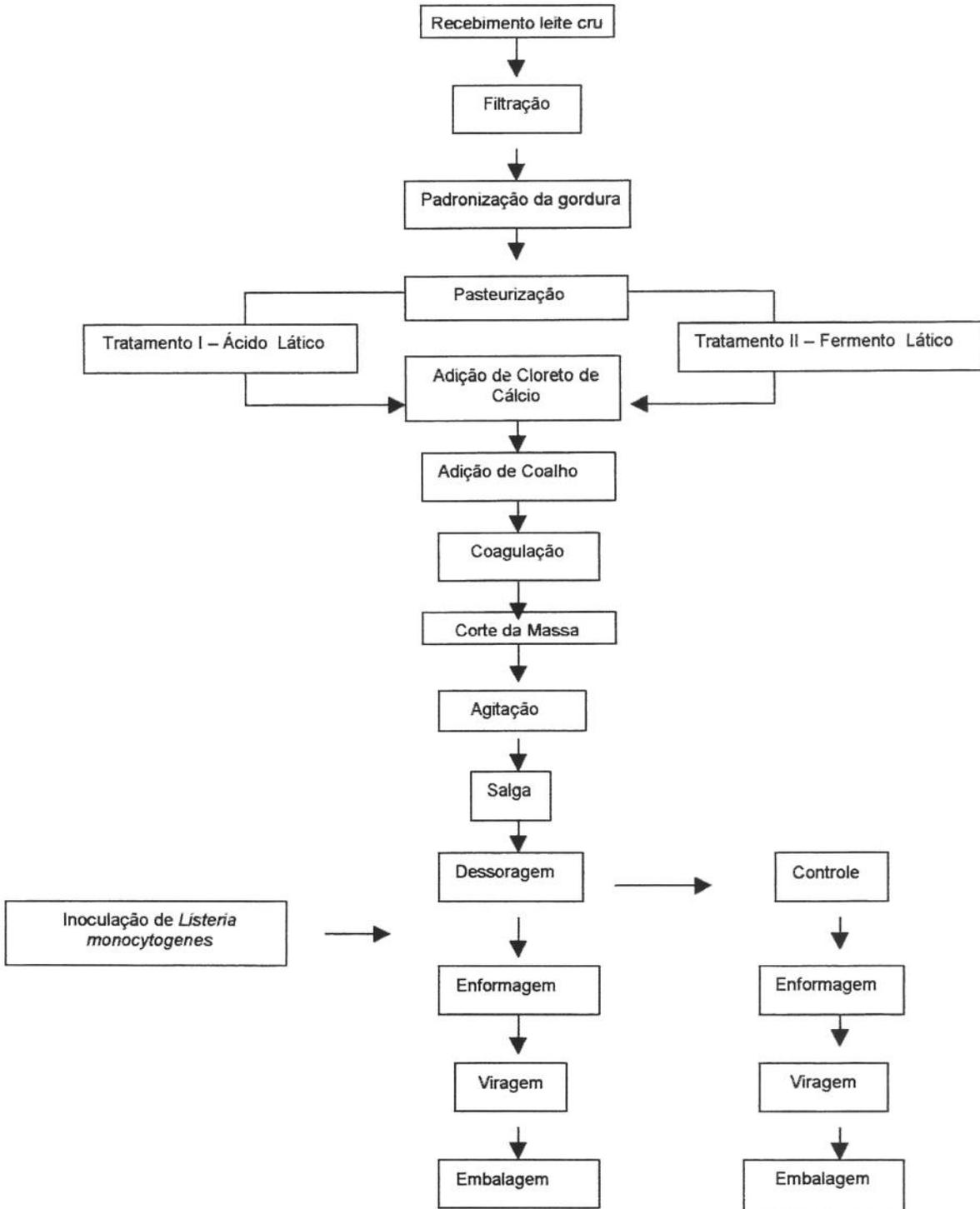


Figura 2. Diagrama de fluxo para obtenção de queijo Minas Frescal pelo método convencional e por acidificação direta.

3.2.4.4. Determinação do teor de gordura

O teor de gordura das amostras foi determinado pelo método de Gerber, descrito por ATHERTON (1981). Utilizou-se centrífuga do tipo Gerber, marca FANEM.

3.2.5. Análises físico-químicas do queijo

3.2.5.1. Amostragem

A amostragem dos queijos foi realizada em várias partes dos queijos utilizando-se sonda cilíndrica. As amostras foram então maceradas para promover a homogeneização das mesmas.

3.2.5.2. Determinação do teor de gordura

O teor de gordura foi determinado pelo método volumétrico de Gerber conforme KOSIKOWSKI (1977), em triplicata.

3.2.5.3. Determinação do teor de Umidade / Extrato Seco Total (EST)

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C, até peso constante, como descrito na seção 33.2.09/ A da A.O.A.C. (1995). O teste foi realizado em triplicata.

3.2.5.4. Determinação do teor de gordura no extrato seco

A gordura no extrato seco (GES) foi calculada pela fórmula:

$$\%GES = \frac{\%de\ gordura}{EST\ (Extrato\ Seco\ Total)} \times 100$$

3.2.5.5. Determinação do teor de sal

O teor de sal foi determinado pelo método de Volhard (modificado por D.M. Barbano), em duplicata, como descrito na seção 971.19 da A.O.A.C. (1995).

3.2.5.6. Determinação do teor de Nitrogênio

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método de macro Kjeldahl, segundo a seção 33.2.11 da A.O.A.C. (1995), e o teor de proteína total foi determinado multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio pelo fator de conversão (Nx6,38). O teste foi realizado em triplicata.

3.2.5.7. Determinação da Atividade de Água (Aa)

A determinação da atividade de água foi efetuada no aparelho Aqua Lab, modelo CX-2, do fabricante Decagon Devices, Inc.

3.2.5.8. Determinação do pH

A determinação do pH foi efetuada utilizando-se potenciômetro marca Tecnal. A medida era realizada diretamente nas amostras de queijo trituradas.

3.2.6. Análises microbiológicas

3.2.6.1. Amostragem

A retirada das amostras foi realizada após 1, 6, 12, 18 e 25 dias de armazenamento. Cada unidade amostral (1/5 de queijo) foi retirada da embalagem, fazendo-se a desinfecção da área externa da embalagem com etanol

a 70% para remover os contaminantes presentes. Em seguida, porções de 25g de queijo foram maceradas em homogeneizador de pistões (mod. 400, stomacher) com 225ml de citrato de sódio a 2%. No preparo das diluições decimais sucessivas, utilizou-se água peptonada salina como diluente.

3.2.6.2. Determinação de Coliformes Totais, Coliformes Fecais, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*

As análises foram realizadas seguindo-se as metodologias do Compêndio de Métodos para Exames Microbiológicos de Alimentos da American Public Health Association (Vanderzant & Splittstoesser, 1992). Foram realizadas análises no leite pasteurizado (apenas coliformes totais e fecais), e no queijo controle fresco (até 3 dias após fabricação).

3.2.6.3. Detecção de *Listeria monocytogenes*

A detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal não inoculados foi realizada utilizando-se o método recomendado pela Health Protection Branch do Canadá (WARBURTON *et al.*, 1991).

3.2.6.4. Enumeração de *Listeria monocytogenes*

Foi realizada através da técnica de semeadura direta em superfície, usando meio seletivo Oxford modificado – MOX e incubação a 35°C durante 24/48 horas. As contagens foram realizadas no queijo inoculado com 1, 6, 12, 18 e 25 dias de armazenamento refrigerado (5°C e 10°C). Para confirmação das colônias típicas foram realizados os testes de motilidade em ágar semi-sólido (SIM) e catalase utilizando-se o método recomendado pelo U. S. Food & Drug Administration

(Lovett & Hitchins, 1984) e análise de β -hemólise em ágar sangue de cavalo usando a metodologia do Health Products and Food Branch (Pagotto *et al.* 2001).

3.2.6.5. Enumeração de Bactérias Lácticas

Foi utilizada a técnica de semeadura em profundidade (“pour-plate”) usando meio ágar de Man, Rogosa e Sharpe e incubação a 30°C por 48/72 horas. A frequência das análises seguiu a mesma que para a enumeração de *Listeria monocytogenes*. Para confirmação das colônias típicas foram realizados os testes de catalase e Gram. Utilizou-se a metodologia recomendada pelo Compêndio de Métodos para Exames Microbiológicos de Alimentos da American Public Health Association (Vanderzant & Splittstoesser, 1992).

3.3. Avaliação da Sensibilidade de *Listeria monocytogenes* às bacteriocinas produzidas por lactococos

Avaliou-se a sensibilidade da cepa de *Listeria monocytogenes* Scott A utilizada na inoculação artificial dos queijos Minas Frescal do presente estudo frente às bacteriocinas produzidas pelo fermento mesofílico homofermentativo composto de cepas mistas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. As possíveis culturas produtoras de bacteriocinas na fase exponencial de crescimento, em caldo de Man, Rogosa e Sharp, foram centrifugadas a 6800 g durante 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram neutralizados a pH 6,5 com solução estéril de NaOH 10N e esterilizados por filtração em membranas Millex-GV de 0,22 μ m (Millipore S.A., St Quentin-en-Yvelines). As atividades das bacteriocinas foram avaliadas pelo método de diluição crítica de Mayr-Harting *et al.* (1972). Os sobrenadantes ativos das culturas produtoras (bactérias lácticas) foram diluídos sucessivamente na proporção de 1:2 em solução-tampão fosfato e sódio 10 mM a pH 7,0, utilizando-se placas de microtitulação (Microwel Plate 96F). A seguir, alíquotas de 10 μ l de cada diluição

foram depositadas sobre ágar tripticase soja suplementado de 0,6% extrato de levedura (TSA-YE), contido em placas de Petri e previamente inoculado com a cultura indicadora, no caso *Listeria monocytogenes*. A seguir, as placas foram incubadas a 30°C durante 24 a 48 horas. Após esse tempo, os meios foram analisados quanto à formação de halos de inibição. O título da bacteriocina é expresso em unidade arbitrária de bacteriocina por mililitro (UA/ml) e foi definido como sendo a recíproca da maior diluição que apresentou halo de inibição multiplicada por 100, para a obtenção da preparação original. As placas de Petri contendo a cultura indicadora (*Listeria monocytogenes*) foram preparadas a partir de cultivos ativos em fase estacionária de crescimento, diluídos na proporção de 1/10 em solução aquosa de peptona 0,1%. Uma alíquota de 500µl das diluições foram inoculadas em 4,5 ml de ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura semi-sólido (0,75% de ágar) a 45°C e, após agitação suave, a mistura foi vertida sobre as placas de Petri contendo 15 ml de ágar tripticase de soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura. Após secagem em câmara de fluxo horizontal durante 60 minutos, os meios foram incubados a 30°C durante 2 horas antes de sua utilização.

3.4 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), usado para testar as diferenças entre os tratamentos, entre tempos e a interação tempo por tratamento. Foi utilizado o teste de Duncan, de comparações múltiplas de médias. Em todos os testes foi considerado um nível de 5% de significância. A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa STATÍSTICA 5.0 (StatSoft, Inc.).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação das características físico-química dos queijos

Os resultados das análises físico-químicas realizados em queijos produzidos por acidificação direta e pelo método convencional são mostrados nas Tabelas 1 a 6.

A Tabela 1 apresenta a composição dos queijos produzidos pelos dois métodos empregados. Os queijos apresentaram composição similar entre si e em relação às encontradas em outros trabalhos (Wolfschoon-Pombo *et al.*, 1978; Dornellas, 1997; Lourenço Neto, 1998), excetuando-se as taxas de umidade, que apresentaram valores maiores para os queijos produzidos com fermento láctico. Os diferentes tratamentos utilizados para fabricação dos queijos não resultou em diferenças significativas ($p < 0,05$) na composição físico-química dos queijos.

Tabela 1. Composição dos queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional^(*).

Parâmetro (%)	Acidificação Direta	Convencional
Umidade	64,13	65,82
Gordura	20,26	21,16
Gordura em Base Seca	56,48	61,90
Extrato Seco Total	35,87	34,18
Extrato Seco Desengordurado	15,61	13,02
Proteína	15,41	15,86
Sal	1,22	1,23
Sal / Umidade	1,90	1,87

^(*) Valor médio dos ensaios comparativos realizados em 3 oportunidades.

Observando-se os dados de Aa nas Tabelas 2 e 3 e a análise estatística dos resultados nas Figuras 3 e 4, nota-se que as amostras não diferem significativamente entre si (tanto para produtos mantidos a 5°C quanto a 10°C), entre os dois diferentes tratamentos e entre os tempos de armazenamento do mesmo tratamento, excetuando-se no 18^o dia (Tabela 2), em que o queijo fabricado por acidificação direta e armazenado a 5°C, diferiu significativamente ($p < 0,05$) das outras amostras do mesmo queijo. Skovgaard (1987) estimou que *Listeria monocytogenes* não se reproduz a $Aa < 0,93$, valor confirmado por outros autores. Portanto, o valor de Aa dos queijos analisados mostrou-se acima da Aa mínima requerida para crescimento de *Listeria monocytogenes*.

Tabela 2. Valores médios ^(*) de atividade de água em queijos armazenados à temperatura de 5°C.

Método	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	6	12	18
Acidificação direta	0,984	0,981	0,981	0,979
Convencional	0,984	0,981	0,981	0,983

^(*) Valor médio dos ensaios comparativos realizados em 3 oportunidades.

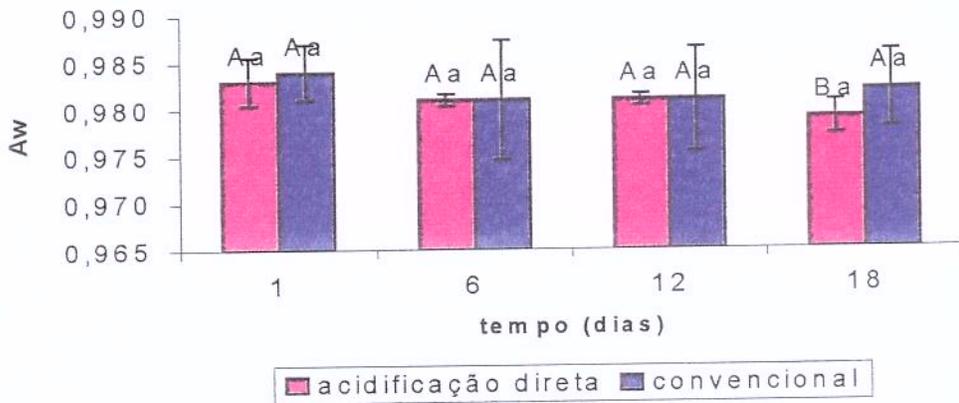


Figura 3: Valores médios de atividade de água para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 5°C.

*Valores médios com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Valores médios de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam os desvios padrão.

Tabela 3. Valores médios (*) de atividade de água em queijos armazenados à temperatura de 10°C.

Métodos	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	6	12	18
Acidificação direta	0,984	0,980	0,981	0,980
Convencional	0,985	0,982	0,981	0,981

(*) Valor médio dos ensaios comparativos realizados em 3 oportunidades.

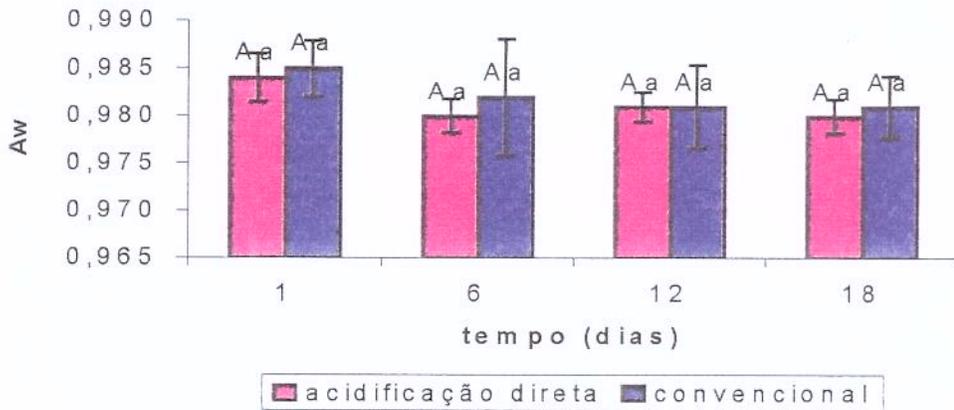


Figura 4: Valores médios de atividade de água para queijos Minas Frescal produzidos pelo método da acidificação direta e convencional e armazenados a 10°C.

*Valores médios com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Valores médios de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam os desvios padrão.

Os valores de pH obtidos para queijos produzidos por acidificação direta e convencional podem ser observados nas *Tabelas 4 e 5* e nas *Figuras 5 e 6*. Nota-se que, desde o 1^o dia, os valores de pH para os queijos obtidos por acidificação direta foram maiores, mantendo-se essa diferença significativa ($p < 0,05$) até o 18^o dia de monitoramento, com abaixamento progressivo dos valores nos dois processos quando mantidos a 5°C. Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978) obtiveram valores semelhantes para a determinação de pH.

Tabela 4. Valores médios (*) de pH em queijos nos dias 1, 6 12 e 18 de armazenamento refrigerado a 5°C.

Método	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	6	12	18
Acidificação direta	6,45	5,85	5,57	5,42
Convencional	5,31	4,84	4,74	4,58

(*) Valor médio dos ensaios comparativos realizados em 3 oportunidades.

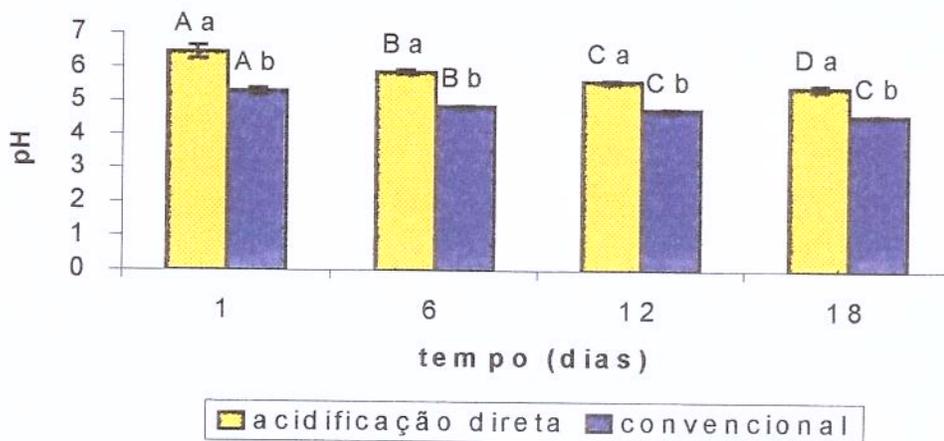


Figura 5: Valores médios de pH para queijos Minas Frescal produzidos com a adição de ácido láctico industrial e fermento láctico mesófilo e armazenados a 5°C.

*Valores médios com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Valores médios de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam os desvios padrão.

Tabela 5. Valores médios (*) de pH em queijos nos dias 1, 6, 12 e 18 de armazenamento à temperatura de 10°C.

Método	Tempo de armazenamento (dias)			
	1	6	12	18
Acidificação direta	6,39	5,46	5,30	5,13
Convencional	5,31	4,82	4,7	4,65

(*) Valor médio dos ensaios comparativos realizados em 3 oportunidades.

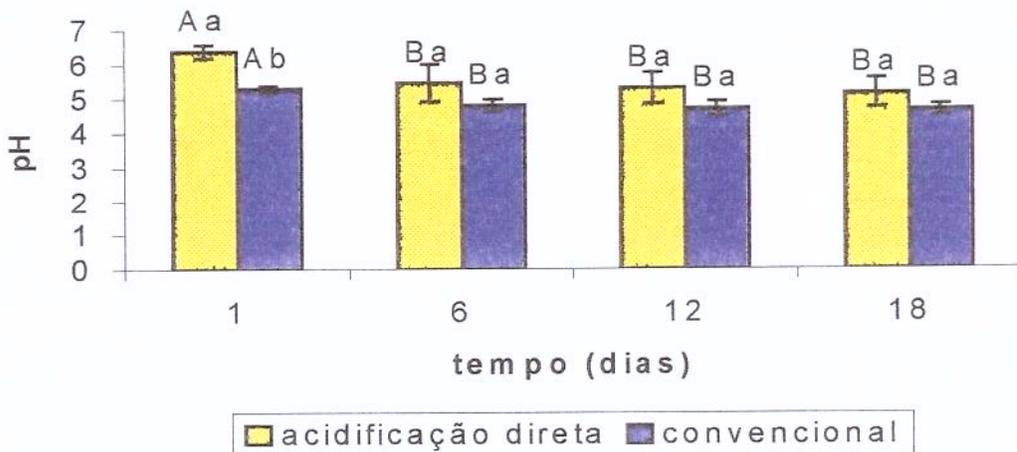


Figura 6: Valores médios de pH para queijos Minas Frescal produzidos com a adição de ácido láctico industrial e fermento láctico mesófilo e armazenados a 10°C.

*Valores médios com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Valores médios de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam os desvios padrão.

4.2. Características Visuais

As características visuais dos queijos após 15 dias de refrigeração a 5°C podem ser observadas na *Figura 7*. Nota-se no queijo produzido pelo método convencional que a forma física original foi totalmente alterada, tornando-se um misto de massa disforme e soro, com amolecimento e grande mudança na textura. Quanto ao queijo produzido por acidificação direta, vê-se que a estrutura física do produto continua inalterada, com exsudado de soro de cor característica e ausência de grandes modificações na textura do produto.

A produção de ácido láctico a partir da decomposição da lactose pode provocar reações bioquímicas favoráveis ou desfavoráveis na fabricação de queijos. No caso específico do tipo Minas Frescal, devido ao seu elevado teor de umidade e de lactose, a velocidade e a intensidade da produção de ácido láctico são facilitadas, provocando conseqüências negativas como uma grande alteração de sabor do produto. A degradação de proteínas resultante da atividade enzimática do coalho, da flora natural do leite e principalmente do fermento láctico, provoca o amolecimento, amarelamento da casca e sabor e aroma mais pronunciados.

Essas características foram objeto de estudos de alguns autores, como Dornellas (1997), observando os níveis de nitrogênio solúvel em ácido tricloroacético 12% e de nitrogênio solúvel a pH 4,6, os quais indicam os índices de extensão e profundidade de proteólise, notou que os valores apresentaram-se mais altos quando o agente coagulante (coalho bovino ou obtido por fermentação) estava associado com o uso do fermento láctico, ocasionando a perda da integridade física nesses queijos após 16 dias; no entanto, valores expressivamente menores foram encontrados em queijos produzidos por acidificação direta. Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978) também obtiveram resultados semelhantes, com os queijos adicionados de fermento láctico apresentando-se mais ácidos e com a massa mais amolecida e ligeiramente mais amarelada internamente após 6 dias de conservação a 5°C.



Figura 7. Características visuais dos queijos produzidos por acidificação direta e pelo método convencional após 15 dias de armazenamento a 5°C.

4.3. Avaliação da Qualidade Microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas do leite pasteurizado após tratamento térmico e dos queijos-controle produzidos pelo método de acidificação direta e convencional para os três processamentos realizados estão apresentados na *Tabela 6*.

Tabela 6. Resultados das análises microbiológicas do leite pasteurizado e dos queijos-controle (dois dias após a embalagem).

	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes Fecais (NMP/g)	Salmonela	S. aureus (UFC/g)	Listeria monocytogene
Leite 1	11/ml	<3	Ausência em 25ml	---	Ausência em 25ml
Leite 2	9/ml	<3	Ausência em 25ml	---	Ausência em 25ml
Leite 3	11/ml	<3	Ausência em 25ml	---	Ausência em 25ml
Queijo 1 Ac. direta	≥2400	20	Ausência em 25g	3,9 x 10 ²	Ausência em 25g
Queijo 2 Ac. direta	1100	<3	Ausência em 25g	4,2 x 10 ²	Ausência em 25g
Queijo 3 Ac. direta	≥2400	<3	Ausência em 25g	4,5 x 10 ²	Ausência em 25g
Queijo 1 Convencional	≥2400	1,1	Ausência em 25g	3,1 x 10 ²	Ausência em 25g
Queijo 2 Convencional	1100	<3	Ausência em 25g	3,7 x 10 ²	Ausência em 25g
Queijo 3 Convencional	1100	<3	Ausência em 25g	3,0 x 10 ²	Ausência em 25g

Avaliando-se os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de leite e queijo, e considerando os mais recentes padrões microbiológicos estabelecidos pelos órgãos oficiais - Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), observa-se que os produtos se enquadram dentro dos padrões legais. No entanto, se fosse considerada a legislação vigente

na época em que foi realizada a maior parte dos experimentos - Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 (Brasil, 1997a), com relação à contagem de coliformes totais, as amostras de queijos estariam fora dos padrões. A contaminação dos queijos por coliformes totais no presente estudo provavelmente ocorreu pós-pasteurização, durante as etapas de armazenamento do leite pasteurizado, processamento e/ou proveniente de latões, utensílios, equipamentos e manipulação, apesar dos cuidados higiênicos seguidos durante todas as etapas.

A contaminação de queijos tipo Minas frescal por coliformes (30°C) acima dos padrões estabelecidos nas legislações anteriores (Brasil, 1997a; Brasil, 1987) foi observada em vários trabalhos, como em Peresi *et al.* (2001), Oliveira *et al.* (1998), Rodriguez & Brandão(1995), García-Cruz *et al.* (1994), entre tantos outros, mostrando a vulnerabilidade desse tipo de alimento à proliferação desses microrganismos.

4.4. Avaliação da sensibilidade de *Listeria monocytogenes* às bacteriocinas produzidas por lactococos

Durante sua proliferação em produtos fermentados, as bactérias lácticas, como os lactobacilos, lactococos, leuconostocs, streptococos e propionobactérias, produzem metabólitos antimicrobianos. Esses inibidores incluem um largo espectro de antagonistas, ácidos orgânicos, diacetil e peróxido de hidrogênio. Algumas bactérias lácticas também produzem bacteriocinas ou proteínas bactericidas, que são inibidores conhecidos de microrganismos (Bareffot & Netlles, 1993).

No presente estudo, os ensaios para a avaliação da atividade das bacteriocinas da cultura láctica, constituída de cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, demonstraram a ausência de formação de halos de inibição. Tal fato revela que o fermento láctico mesófilo utilizado no processamento dos queijos não era produtor de bacteriocinas inibidoras da cepa de *Listeria monocytogenes* inoculada nos queijos. Portanto, diferenças entre os valores das contagens de *Listeria monocytogenes* dos queijos produzidos pelo

método da acidificação direta e convencional não podem ser atribuídas à produção de bacteriocinas pelo fermento láctico.

4.5. Avaliação do comportamento de *Listeria monocytogenes* em queijos produzidos por acidificação direta e pelo método convencional

4.5.1. Queijos mantidos a 5°C

As contagens de *Listeria monocytogenes* e de bactérias lácticas nos queijos armazenados a 5°C, e a análise estatística dos resultados estão representadas nas Figuras 8, 9 e 10.

As Figuras 8 e 9 mostram que os valores das contagens de *Listeria monocytogenes* para o queijo produzido por acidificação direta e armazenado a 5°C, tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) de 2,20 ciclos logarítmicos do início até o 12^o dia de armazenamento, mantendo-se, então, sem alteração até o 25^o dia. Por sua vez, os queijos elaborados pelo método convencional e armazenados a 5°C (Figuras 8 e 9) não apresentaram valores de contagens para *Listeria monocytogenes* com diferença significativa ($p < 0,05$) durante todo o tempo de armazenamento refrigerado .

Na Figura 9, comparando-se os dois diferentes tratamentos, os valores médios de contagem de *L. monocytogenes* apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) desde o 1^o dia de amostragem (dia seguinte à embalagem e dois dias após a inoculação), com valores de 5,05 ciclos logarítmicos para queijos produzidos por acidificação direta e 4,19 ciclos logarítmicos para queijos elaborados pelo método convencional, evidenciando assim a ação da cultura láctica adicionada já nas primeiras 48 horas após a inoculação de *L. monocytogenes*. Ao final de 25 dias de armazenamento refrigerado a 5°C, a diferença entre os dois tratamentos, nas contagens de *L. monocytogenes*, atingiu 2,94 ciclos logarítmicos, com o queijo produzido por acidificação direta apresentando valor médio de contagem de 7,48 ciclos logarítmicos (aumento de 2,43 ciclos logarítmicos em

relação ao início do armazenamento a 5°C) e queijo fabricado pelo método convencional 4,54 ciclos logarítmicos (aumento de apenas 0,35 ciclo logarítmico após 25 dias).

Nas Figuras 8 e 10 observam-se que os valores médios de contagem de bactérias lácticas nos queijos produzidos por acidificação direta apresentaram crescimento significativo ($p < 0,05$) de 0,70 ciclo logarítmico apenas no 18^o dia (em relação ao 1^o dia) de armazenamento refrigerado a 5°C. Nos queijos produzidos pelo método convencional, as contagens diferiram significativamente comparando-se o 1^o e o 12^o dia, revelando-se um declínio nas contagens, de 0.31 ciclos logarítmicos porém até o 25^o dia, os valores tendem a apresentar similaridades com os valores dos primeiros dias de análises.

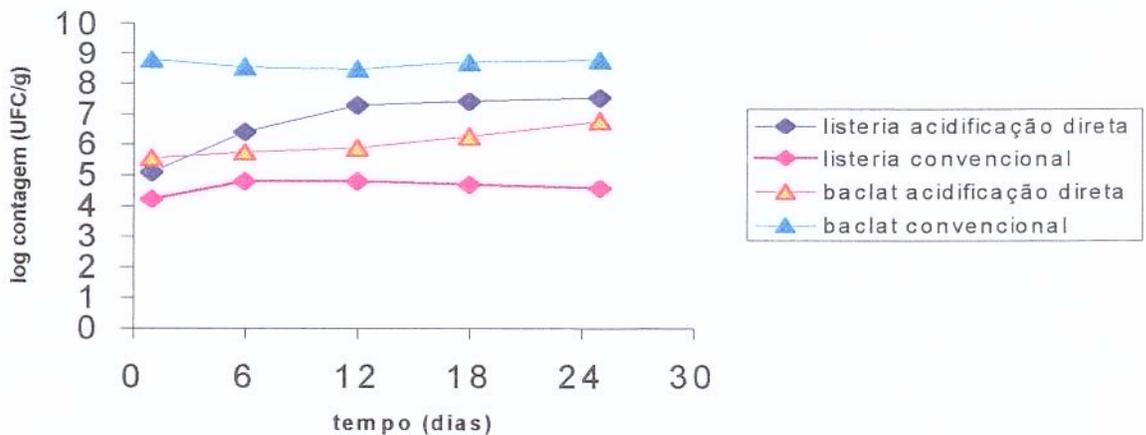


Figura 8. Contagem de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas (baclat) em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional, armazenados a 5°C.

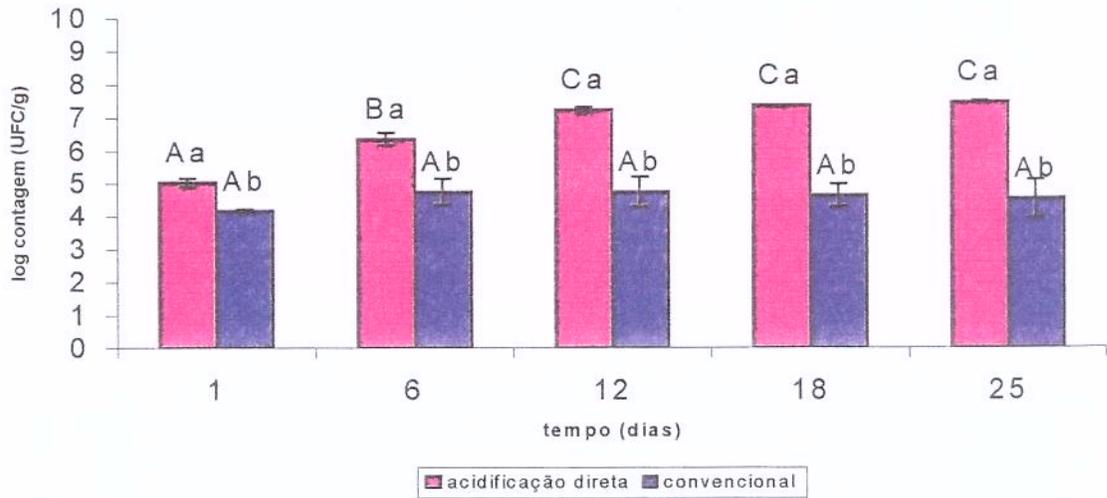


Figura 9: Valores médios de contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C .

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Médias de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

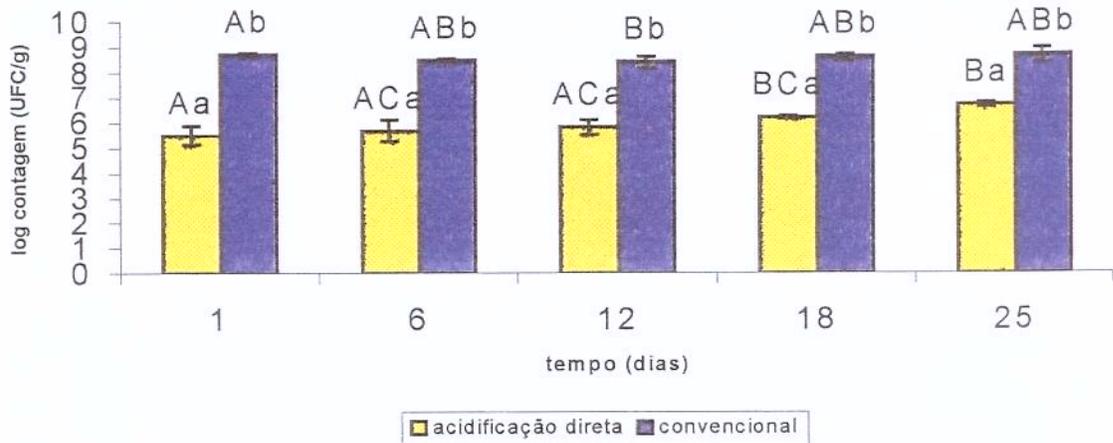


Figura 10: Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tratamentos.

**Médias de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os diferentes tempos do mesmo tratamento

***Barras de erro representam o desvio padrão.

Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Schaack e Marth (1988) onde se inoculou 10^3 UFC/ml de *Listeria monocytogenes* em leite desnatado juntamente com 0.1, 0.5, 1.0, 5.0% de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Os autores observaram um maior crescimento de *Listeria monocytogenes* com a diminuição da quantidade de cultura láctica. Em algumas situações desse estudo, o crescimento desse patógeno foi completamente inibido a pH 5.60 e 5.99. Outro estudo de Ryser & Marth (1988) mostra a incapacidade de crescimento de *Listeria monocytogenes* a valores de $\text{pH} \leq 5.45$, quando inoculada em soro de queijo proveniente do processamento de

queijo Camembert, mantido a 6°C. Corner *et al.* (1986) demonstraram a ausência de reprodução de *Listeria monocytogenes* inoculada em suco de repolho a pH ≤ 5.6 , mantido à temperatura de 5°C.

No presente trabalho, observando-se a *Tabela 4*, para o 12^o dia, para queijo elaborado pelo processo de acidificação direta, o valor médio de pH atingiu 5,57, e nesse mesmo dia notou-se que o crescimento de *Listeria monocytogenes* foi inibido (*Figura 9*). Os valores de pH continuaram abaixando até o 18^o dia (último dia de monitoramento), onde atingiram 5,42. Nos queijos produzidos pelo método convencional, que não apresentaram crescimento significativo de *Listeria monocytogenes* (*Figura 8*), obtiveram-se valores de pH mais baixos (5,31), desde o 1^o dia chegando-se a 4,58 no último dia de leitura.

As bactérias lácticas, durante a fermentação de produtos lácteos, metabolizam lactose a ácido láctico. A produção de ácido abaixa o pH e propicia proteção a contaminantes indesejáveis como por exemplo, patógenos. Em adição, o baixo pH dos produtos fermentados potencializa os efeitos antimicrobianos dos ácidos orgânicos. Esses ácidos apresentam maior letalidade para bactérias do que os ácidos inorgânicos, que dissociam-se completamente em solução aquosa. Em produtos fermentados, os ácidos lipolíticos não dissociados (acético, láctico ou propiônico, por ex.) dissolvem-se na membrana celular, interferindo na sua permeabilidade, afetando o transporte de substrato e a fosforilação oxidativa, inibindo o transporte de elétrons e causando a acidificação do interior da célula e o cessamento das funções metabólicas que são essenciais para a sobrevivência da célula. (Barefoot & Nettles, 1993; Mäkinen & Bigret, 1993).

Breidt & Fleming (1998) afirmam que o uso de bactérias lácticas como cultura competidora para inibir o crescimento de patógenos em alimentos pode se mostrar muito eficiente. Segundo os autores, algumas hipóteses sobre a forma de ação das bactérias lácticas são o amensalismo, em que uma cultura microbiana inibe o crescimento de outra através da produção de metabólitos, ou através da competição por nutrientes entre as culturas. Segundo Adams & Nicolaidis (1997),

uma população de bactérias láticas pode restringir o crescimento de outros microrganismos simplesmente pela ocupação do espaço físico e assimilação dos nutrientes disponíveis.

Em estudo realizado por Lourenço Neto (1998), queijo produzido por acidificação direta, e o mesmo adicionado de cultura lática termofílica e cultura probiótica, foram analisados microbiologicamente (coliformes 30°C, coliformes 45°C). Os queijos elaborados com o uso de culturas apresentaram maior tendência à queda do nível de contaminação durante o período de armazenagem do que aqueles fabricados com o uso exclusivo de ácido lático. Resultados semelhantes foram verificados por Dornellas (1997), com queijos elaborados por acidificação direta e pelo método tradicional, com cultura lática mesófila.

Campos (2000) realizou processamento de queijos com o uso exclusivo de ácido lático e o mesmo adicionado de cultura lática mesófila a 0.1% e 0.5%. Os resultados obtidos das análises de coliformes a 30°C, coliformes a 45°C, bolores e leveduras, demonstraram que para todos os microrganismos estudados as maiores taxas de crescimento foram encontradas nos queijos onde não se utilizou o fermento lático, e que portanto, o uso do mesmo na fabricação de queijo Minas Frescal, mesmo que em pequenas proporções (0.1%, 0.5%), confere ação protetora contra os contaminantes.

4.5.2. Queijos mantidos a 10°C

As contagens de *Listeria monocytogenes*, bactérias láticas nos queijos armazenados a 10°C e a análise estatística dos resultados estão representadas nas Figuras 11, 12 e 13. Nas Figuras 14 a 19, pode-se visualizar comparativamente as contagens de *Listeria monocytogenes* e bactérias láticas nos queijos às diferentes temperaturas de armazenamento (5°C e 10°C).

As Figuras 11 e 12 mostram que os valores médios de contagem de *Listeria monocytogenes* dos queijos elaborados pelo método convencional e armazenados a 10°C, apresentam-se praticamente inalterados (não apresentam diferença

significativa) durante os 25 dias de armazenamento. Esse comportamento assemelha-se muito ao mesmo queijo armazenado a 5°C (Figuras 14 e 15). Os valores de pH diminuem de 5,31 para 4,65 entre o 1^o e o último dia de leitura (Tabela 5).

Os queijos produzidos por acidificação direta e mantidos a 10°C (Figuras 11 e 12) apresentaram aumento expressivo de 1,76 ciclos logarítmicos em suas contagens de *Listeria monocytogenes* entre o 1^o e o 6^o dia de armazenamento e, concomitantemente redução de pH de 6,39 para 5,46 (Tabela 5). Os valores diferem dos obtidos nos ensaios com manutenção a 5°C, em que o maior crescimento deu-se entre o 1^o e o 12^o dia de armazenamento (Figuras 14 e 16). Esse crescimento mais acelerado de *Listeria monocytogenes* a temperaturas mais elevadas foi demonstrado por Bojsen & Moller (1972), utilizando frascos contendo caldo triptose fosfato inoculados com várias linhagens de *Listeria monocytogenes* e incubadas a 4°C, 10°C e 15°C. Os tempos de geração obtidos foram de 12.02, 5.03 e 2.63 horas, respectivamente.

Rosenow & Marth (1987) utilizaram diferentes produtos lácteos como leite (desnatado, integral e achocolatado) e creme de leite, inoculados com 10² e 10³ microrganismos/ml de *Listeria monocytogenes* e submetidos a temperaturas de 4, 8, 13, 21 e 35°C. Os resultados dos experimentos mostraram que apesar de diferentes comportamentos nos diversos substratos, o tempo de geração diminuiu com o aumento da temperatura de incubação.

Rosso *et al.* (1996) observaram que o aumento de 4°C para 8°C, durante o armazenamento de carne bovina, reduzia em 75-80% o tempo necessário para *Listeria monocytogenes* atingir uma densidade populacional pré-estabelecida.

As contagens de bactérias lácticas para queijos produzidos por acidificação direta e armazenados a 10°C estão representadas nas Figuras 11 e 13. Observa-se um aumento de 1,75 ciclos logarítmicos entre o 1^o e o 6^o dia, semelhante ao de *Listeria monocytogenes*, e do 6^o ao 25^o dia os valores apresentaram-se sem diferença significativa ($p < 0,05$). Quando comparados às contagens do mesmo tipo

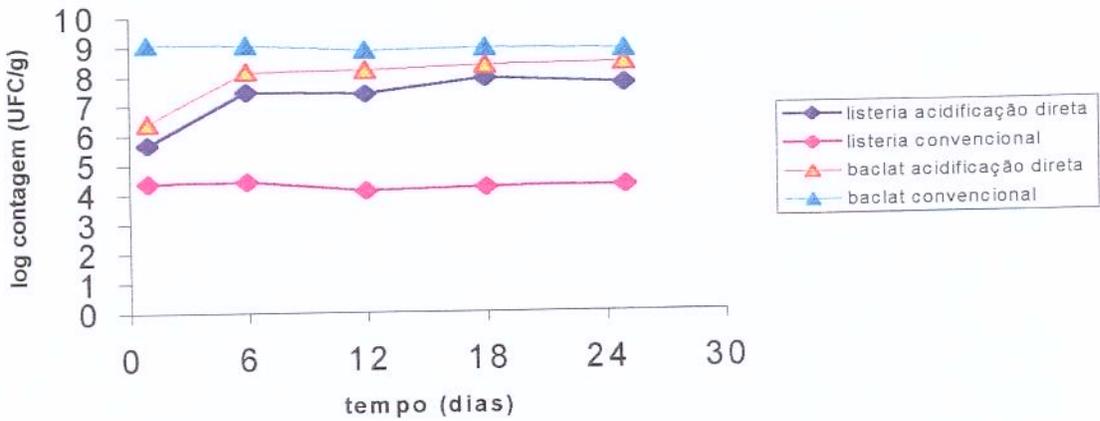


Figura 11. Contagem de *L. monocytogenes* e bactérias lácticas (baclat) em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional, armazenados a 10°C.

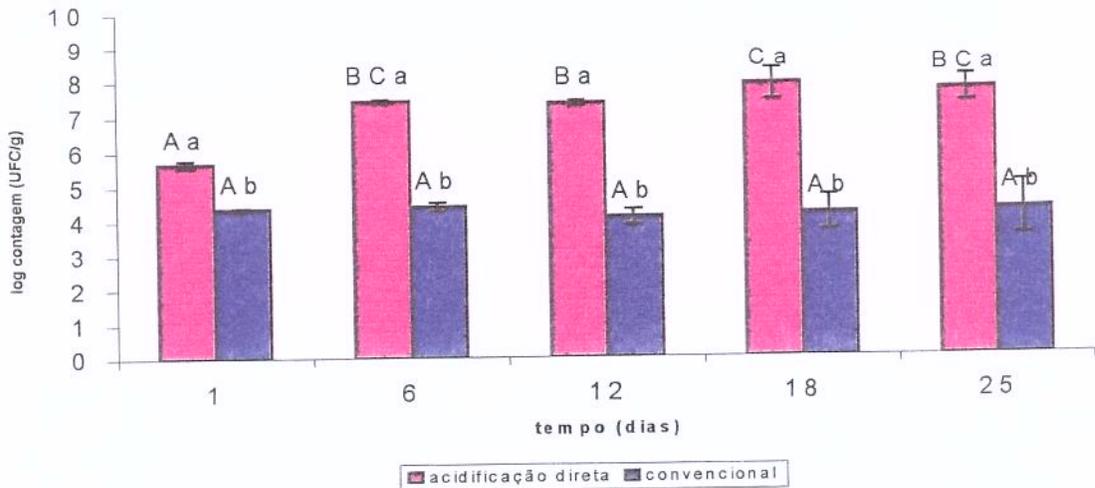


Figura 12: Valores médios de contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 10°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

**Médias de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

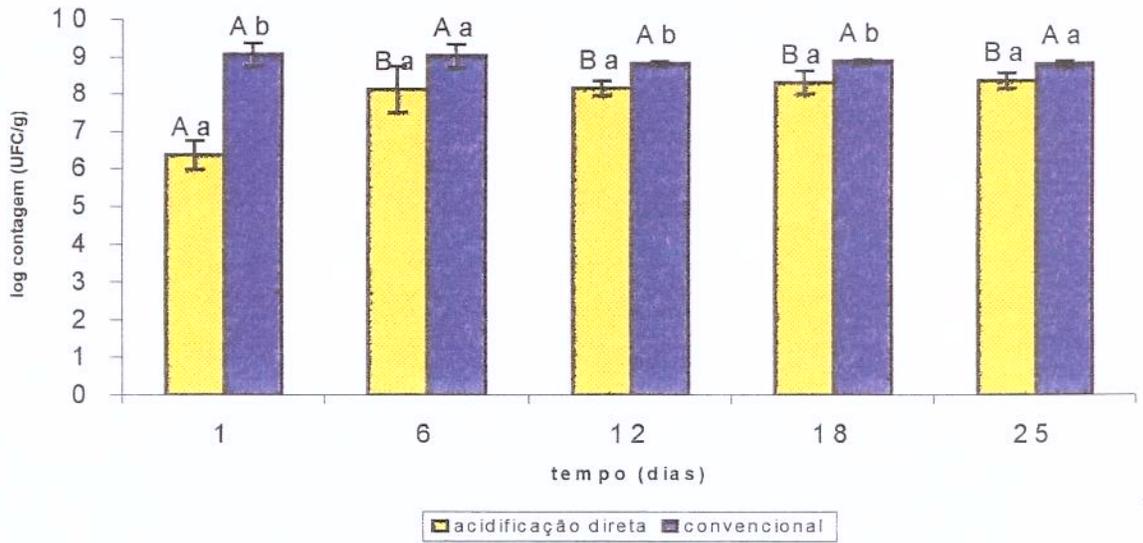


Figura 13: Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 10°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

**Médias de contagem com letras maiúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tempos do mesmo tratamento.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

de queijo estocado a 5°C, nota-se nas Figuras 18 e 19 que a temperatura de abuso colaborou para a multiplicação das bactérias lácticas, com valores superiores desde o 1º dia de armazenamento, chegando a 1,65 ciclos logarítmicos de diferença no último dia de monitoramento (25º dia).

As contagens de bactérias lácticas para queijos obtidos pelo método convencional e armazenados à temperatura de abuso de 10°C mostraram-se praticamente inalteradas durante todo período de armazenamento monitorado (Figuras 11 e 13). Esse perfil assemelha-se às contagens obtidas para o mesmo

queijo armazenado a 5°C (Figuras 17 e 19) com valores médios de contagens mais elevados entre o 6^o e o 18^o dia.

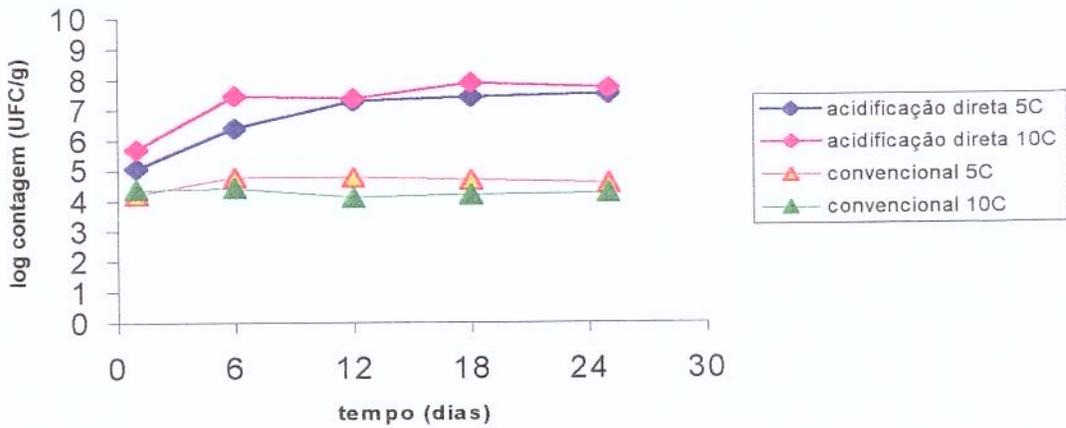


Figura 14. Contagem de *L. monocytogenes* em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C.

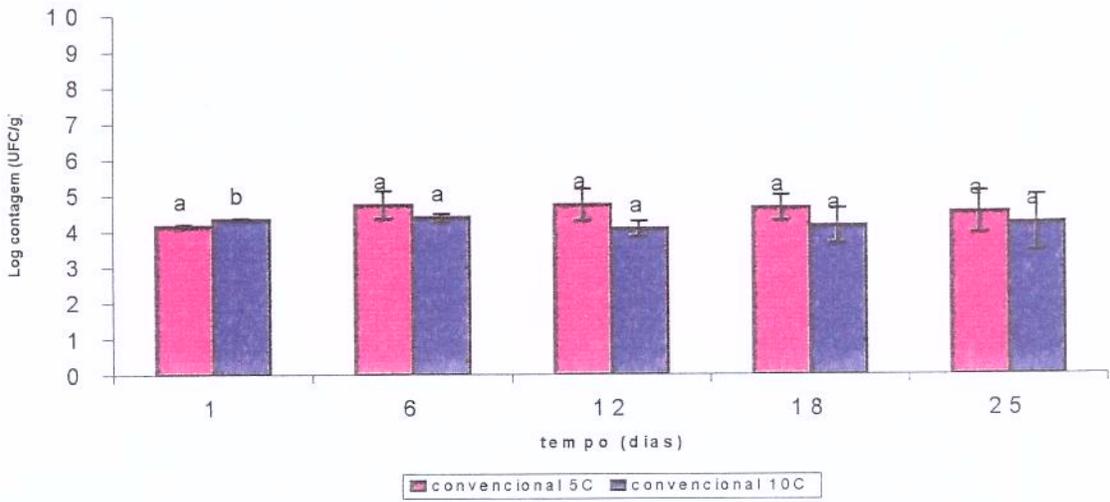


Figura 15: Valores médios de contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos produzidos pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C .

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

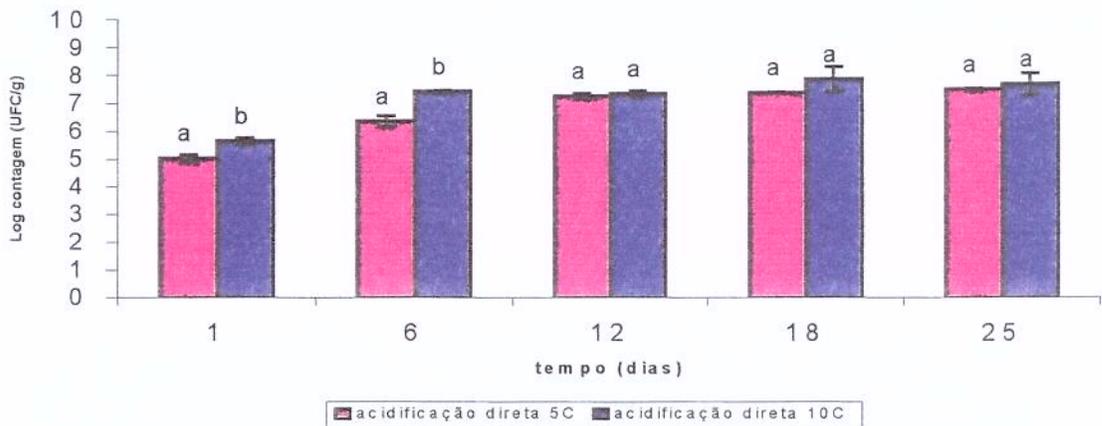


Figura 16: Valores médios de contagem de *Listeria monocytogenes* em queijos produzidos por acidificação direta e armazenados a 5°C e 10°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

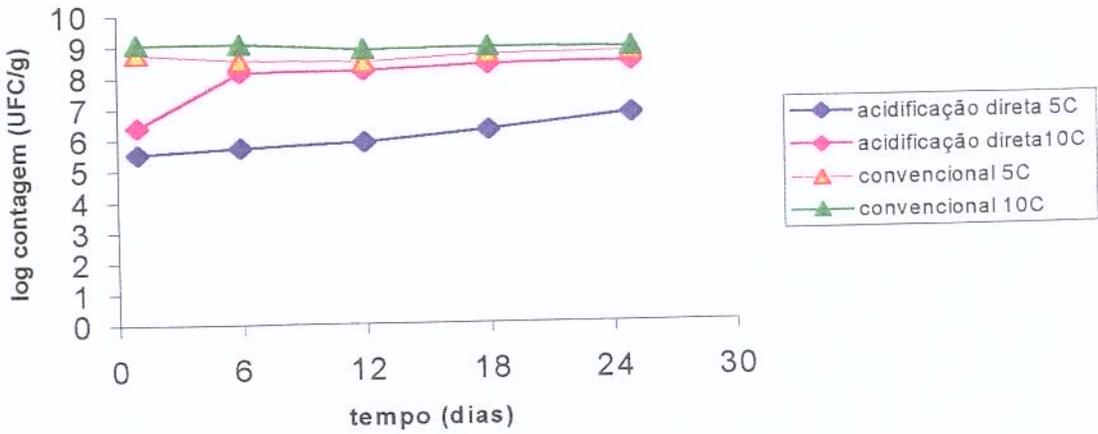


Figura 17. Contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C.

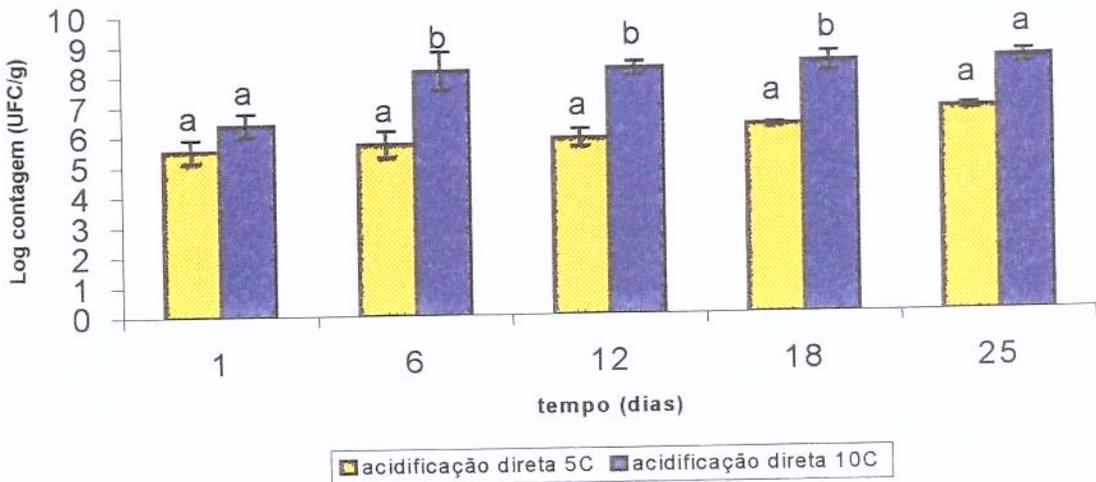


Figura 18: Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos por acidificação direta e armazenados a 5°C e 10°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

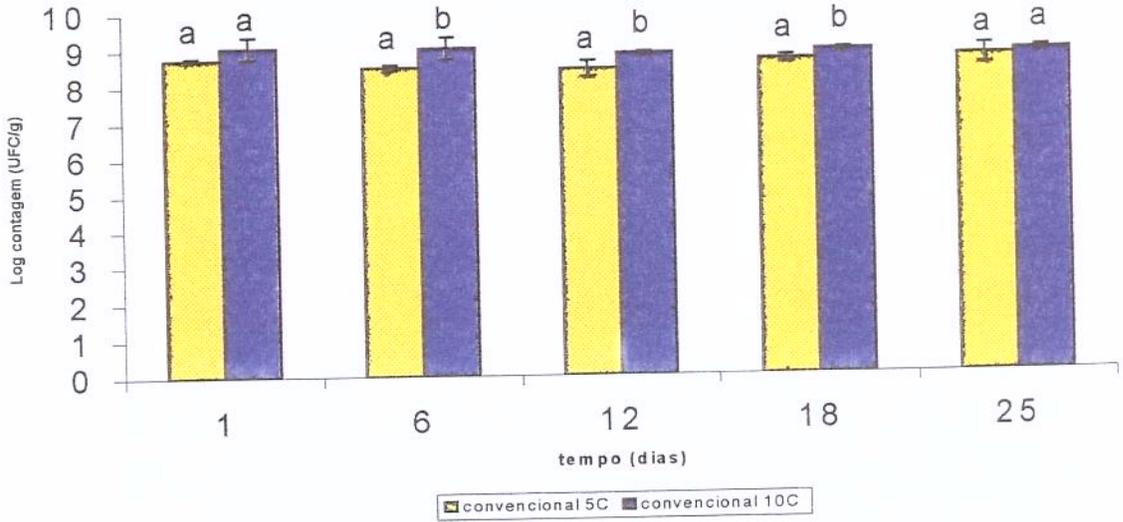


Figura 19: Valores médios de contagem de bactérias lácticas em queijos obtidos pelo método convencional e armazenados a 5°C e 10°C.

*Médias de contagem com letras minúsculas diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$), entre os diferentes tratamentos.

***Barras de erro representam o desvio padrão.

5. CONCLUSÕES:

Os queijos produzidos pelo método convencional apresentam durante todo armazenamento monitorado valores de pH mais baixos, decorrente da produção de ácido láctico, constituindo-se fator importante no controle do crescimento de *Listeria monocytogenes*, concomitantemente com a competição por nutrientes.

O uso de temperatura de abuso de 10°C produz aumento na velocidade de reprodução de *Listeria monocytogenes* em queijo Minas Frescal produzido por acidificação direta, revelando que o armazenamento a temperaturas inadequadas pode comprometer ainda mais a segurança alimentar desse tipo de queijo.

O trabalho revelou que o uso do processo de acidificação direta conduz a obtenção de um produto mais susceptível à proliferação de *Listeria monocytogenes*. Os resultados mostram que o emprego de fermento pode constituir-se de uma ferramenta eficaz contra o desenvolvimento desse microrganismo patogênico, evidenciando que uma vez suprimido completamente da formulação, a *Listeria monocytogenes* não encontrará obstáculos e poderá desenvolver-se com maior facilidade, atingindo valores de contagem potencialmente perigosos à saúde pública.

Em amostras comerciais de queijos Minas Frescal produzidos por acidificação direta e pelo método convencional, verifica-se que para os acidificados, o prazo de validade estabelecido pela maioria dos laticínios é maior (30 dias) que os adicionados de cultura láctica (20 dias). Isso demonstra que esses intervalos são estabelecidos levando-se em consideração apenas os parâmetros de qualidade sensoriais e estruturais, desconsiderando-se os microbiológicos. Como foi demonstrado no presente trabalho o uso da acidificação direta proporcionaria o crescimento mais acentuado de microrganismos como *Listeria monocytogenes*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, Oxford, v.8, n.5/6, p.227-239, 1997.
2. ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "Frescal". **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.6, dez., 2000.
3. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. Washington, 16 ed, 1995.
4. ATHERTON, H. V. **Chemistry and testing of dairy products**. 4.ed. Westport: AVI, 1981, 396p.
5. BARBANO, D. M. **Procedure for salt analysis of Cheddar cheese**. Cornell University, nov., 1991. In: ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC international**. Washington, 16 ed, 1995.
6. BAREFOOT, S. F.; NETTLES, C.G. Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produced by Dairy Starter Cultures. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.8, p.2366-2379, 1993.
7. BEAN, N.; GRIFFIN, P.N. Foodborne diseases outbreaks in the United States, 1973-1983: Pathogens vehicles and trends. **Journal of Food Protection**, Ames, v.53, n.9, p.804-7, 1990.
8. BILLE, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special refence to the Swiss outbreak. In: MILLER, A. J. L.; SOMKUTI, G. A. **Foodborne Listeriosis**. New Yorker: Elsevier, 1990. Cap.12, p. 71-74.

9. BJOSEN-MØLLER, J. Human listeriosis – diagnostic, epidemiological and clinical studies. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.** Section B (Suppl.) n.229, p. 1-157, 1972. Apud: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. *Listeria, listeriosis and Food Safety*. New York, Marcel Dekker, INC, 1991.
10. BOGHOSSIAN, A.R. **Uso de carragenas na fabricação do queijo tipo Minas Frescal**. Piracicaba, 1995. 91p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ.
11. BONASSI, I. A. **Influência de algumas espécies de bactérias lácticas na elaboração do queijo tipo Minas**. Botucatu, 1979. 133p. Tese (Doutor em Tecnologia dos Produtos Agropecuários) – Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP.
12. BRASIL. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal.
13. BRASIL. Portaria 001 de 28 de janeiro de 1987. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 25 fev. 1987.
14. BRASIL. Portaria n. 146 de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Brasília, 50p.
15. BRASIL. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997a. Aprova regulamento técnico para princípios gerais de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 1997.

16. BRASIL. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997b. Aprova regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. In: FOOD STAFF (Comp.). **Food Base: Legislação de Alimentos**. São Paulo: 1999. CD-ROM. Produzido por Vox Editora.
17. BRASIL. Resolução RDC - nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamentos técnicos sobre padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.
18. BREIDT, F.; FLEMING, H.P. Modeling of the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Lactococcus lactis* in vegetable broth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 9, p. 3159-3165, sept. 1998.
19. BRYAN, F. L. **Atualização em APPCC: Análise de perigo em pontos críticos de controle**. Manual traduzido por Gillian Alonso Arruda, 1992. 78p.
20. 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**. Campinas, 2000. 80p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
21. CAMPOS, J. E.; ORLANDO, J. C.; PAPE, G.; ROBERTELLI, R.; ALEXANDRE, G. N. Estudo da fabricação de queijos não curados usando ácido láctico em lugar de culturas lácticas selecionadas (fermentos lácticos). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.158-9, p.1-7, 1971.
22. CARMINATI, D.; GIRAFFA, G.; BOSSI, M. G. Bacteriocin-like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Ames, v.52, n.9, p.614-617, 1989.

23. CARVALHO, E. P.; GÓMES, R. C.; COSTA, L. C. G. Condições microbiológicas de queijo "Minas Frescal" comercializados em Lavras, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 5., 1981, Viçosa. **Anais**. p.147.
24. CASAROTTI, V.T.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba - SP. **Archivos LatinoAmericanos de Nutricion**, v.44, n.3, p.158-163, 1994.
25. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION **Listeriosis outbreak associated with Mexican-Style cheese**. Morb. Mortal. California, rep. 34, p.357-359, 1985.
26. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Listeriosis**. Disponível em <www.cdc.gov>. Acesso em 21 set. 2001.
27. CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; MESQUIARI, M.; RODRIGUES, R. Freqüência de *Listeria* sp e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p.95-7.
28. COMI, G.; CANTONI, C.; d'AUBERT, S. Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* nei formaggi. **Industrie Alimentari**, v.26, n.247, p.216-218, 1987.
29. CORNER, D. E.; BRACKETT, R. E.; BEUCHAT, L. R. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. **Applied and Enviromental Microbiology**, v.52, p. 59-63, 1986.
30. DESTRO, M. T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n.2, p. 110-112, Apr., 1991.

31. DEVER, F.P.; SCHAFFNER, D.W.; SLADE, P.J. Methods for the detection of foodborne *Listeria monocytogenes* in the U.S. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.13, n.4, p. 263-292, dec. 1993.
32. DIAS, R. S.; SILVA, S. L.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, M. B. C. M. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p.143-4.
33. DONNELLY, L.; BRACKETT, R. E.; DOORES, S.; LEE, W. H.; LOVETT, J. *Listeria*. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D .F. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 3. Ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p.637-663.
34. DORNELLAS, J. R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e “shelf life” do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. 197p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
35. DOYLE, M. P. Effect of enviromental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.4, n.42, apr. 1988.
36. ESCARTÍN, E. F.; AYALA, A. C.; VITELA, R. T. Destino de *Staphylococcus aureus* nativo y de *Salmonella* artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. II Influencia del pH de la flora asociada y del nivel original de contaminacion del patogeno. **Revista Latino-Americana de Microbiologia**, v.25, n.2, p.79-86, 1983.
37. FAGUNDES, C. M.; MOLIN, L. Interferência dos resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Informe Agropecuário**, v.13, n.155, p.24-30, 1988.

38. FARBER, J. M.; JOHNSTON, M. A.; PURVIS, U.; LOIT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* ssp. **Internacional Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.5, n.2, p.157-63, 1987.
39. FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v.55, n.3, p. 476-511, sept. 1991.
40. FLEMING, D. W.; COCHI, S. L.; MAC DONALD, K.L.; BRONDUM, J.; HAYES, P.S.; PLYKAYTIS, B.D.; HOIMES, M. B.; AUDURIER, A.; BROOME, C.V.; REINGOLD, A. L. Pasteurized milk as a vehicle of infection in na outbreak of listeriosis. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v.312, n.7, p.404-407, feb. 1985.
41. FRANCO, B.D.G.M & LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: FRANCO, B.D.G.M.& LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimetos**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap.4, p.33-81.
42. FURLANETTO, S. M. P.; CAMPOS, C.M.L.; IARA, S. T. Pesquisa de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella* em queijo frescal, vendido em supermercados do município de São Paulo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 12., 1983, São Paulo p.144 ,. Apud: NASCIMENTO, D.; SABIONI, J. G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 120-129, abr./jun. 1995.
43. FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2ed. São Faulo, Globo, 1990. 297p. (Publicação Globo Rural).

44. FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. Tecnologia de queijos. **Manual técnico para produção industrial de queijos**. São Paulo, Dipemar, 1994. 112p. Apud: SABOYA, L. V. **Adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas Frescal**, Piracicaba, 1998. 83p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, USP.
45. FURTADO, M.M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V. A fabricação do queijo Minas Frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207, p.15-21, jan./fev. 1980.
46. FURTADO, M.M.; SOUZA, H. M.; MUNCK, A. V.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Estudo conclusivo à respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.208, p.13-6, 1980.
47. GARCÍA-CRUZ, C.H.; HOFFMANN, F.L.; VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto – SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.54, n.2, p.78-82, 1994.
48. GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, n.36, p.12-6, 1995.
49. GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, n.53, p.38-44, jan./fev. 1998.
50. HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. ; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Listeria*. In: HOLT, J.G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A. ; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey’s Manual of Deyterminative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 566-67

51. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Listeria monocytogenes*. In: ICMSF. **Microorganisms in Foods**. 5. Microbiological Specifications of food pathogens. London: Blackie Academic & Professional, 1996.
52. ISEPON, J.S.; OLIVEIRA, A. J. Variação do índice de proteólise e aceitabilidade do queijo tipo Minas Frescal. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1995. p.287-90.
53. KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. 2. ed. Ann Arbor: Edwards Brothers, Inc. 1977. P. 179-212
54. LANDGRAF, M. Microrganismos Indicadores. In: FRANCO, B.D.G.M.& LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap.3, p.27-31.
55. LEITE BRASIL. **Produção Brasil em toneladas de queijos comuns em estabelecimentos comerciais sob Inspeção Federal**. Disponível em <www.leitebrasil.org.br>. Acesso em: 08 ago. 2001.
56. LOURENÇO NETO, J.P.M. O uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal como alternativa de melhoria de qualidade. I **Seminário Internacional de “Queijos Frescos”**. Atibaia, p. 59-75, 1998.
57. LOVETT, J. & HITCHINS, A.D. *Listeria* Isolation. In: U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**,. 6. ed. 1984. Cap 29, p. 29.06-29.07.
58. LOVETT, J. & TWEDT, R. M. *Listeria*. **Food Technology**, Chicago, v.42, n.4, p.188-190, apr. 1988.
59. LÜCK,H. Control de la calidad de la industria lactológica. In: ROBSON, R. K., **Microbiologia Lactologica**, Zaragoza: Acribia,1987. v.2, p. 255-94.
60. MÄKINEN, A.M.; BIGRET, M. Industrial use and production of lactic acid bacteria. In: SALMINEN, S.; WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria**, New York: Maral Dekker, Inc., 1993. Cap. 2, p. 65-96.

61. MANDIL, A.; MORAIS, V. A. D.; PEREIRA, M. L.; FAGUNDES, J. M. S.; CARMO, L. S.; CORREIA, M. G.; CASTRO, E. P.; GOMEZ, M. J. V. M. *Staphylococcus aureus* em queijos tipo "Minas". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 2, n. 2, p. 233-241, 1982.
62. MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J.; BERKELEY, C. W. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R. & RIBBONS, D. W. (Ed). **Methods in Microbiology**. New York: Academic Press Inc., 1972, v. 7a, 115p.
63. MORAES, J. M.; HAJDENWURCEL, J.R. Importância das contaminações no estufamento tardio de queijos. **Informe Agropecuário**, v.8, n.88, p.23-6, 1982. Apud: PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da Vigilância Sanitária. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.44, p.22-6, jul./ago. 1996.
64. NASCIMENTO, D.; SABIONI, J. G.; PIMENTA, N.; XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal da cidade de Ouro Preto (MG). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 120-129, abr./jun. 1995.
65. OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos tecnológicos**. 2. ed. São Paulo: Editora da Unicamp, Ícone Editora LTDA, 1986, 146, 146p.
66. OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia – Goiás**. Belo Horizonte, 1993. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais.
67. 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. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 31-34, mai./jun. 1998.
68. PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. Health Products and Food Branch. Canada, p.5-6, jan./2001.

69. PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.5, out. 1999.
70. PERESI, J.T.M.; GRACIANO, R.A.S.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S. I.; RIBEIRA, A.K.; CARVALHO, I.S.; LIMA,M. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.83, p.63-70, abr. 2001.
71. PINHEIRO, A. J. R.; SANTOS, M. T. M.; SOUSA, L. R. M.; OLIVEIRA, L. M. Queijo Minas II – Efeitos do tratamento térmico do leite sobre as características físico-químicas e sensoriais do queijo de Minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.47, p. 29-32, jun. 1992.
72. PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da Vigilância Sanitária. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.10, n.44, p.22-6, jul./ago. 1996.
73. ROCOURT, J.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M. P.; BEUCHARTE, L. R.; MONTVILLE, T. J. ed. **Food Microbiology – Fundamentals and Frontiers**. 1. ed. Washington: ASM PRESS, 1997. p. 337-352.
74. RODRIGUES, W. S.; BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia para a fabricação de queijo Minas Frescal que não dessora, usando leite adicionado de “Dairy-Lo”. In: XIII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ILCT, 1995. p. 215-217.
75. ROSENOW, E.M.; MARTH, E.H. Grow of *Listeria monocytogenes* in skim, whole and chocolate milk, and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 50, n. 6, p. 452-459, 1987.

76. ROSSO, L.; BAJARD, S.; FLANDROIS, J.P.; LAHELLEC, C.; FOURNAUD, J.; VEIT, P. Differential growth of *Listeria monocytogenes* at 4 and 8°C: Consequences for the shelf life of chilled products. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 9, p. 944-949, sept. 1996.
77. RYSER, E. T.; MARTH, E.H. Survival of *Listeria monocytogenes* in Cold-Pack Cheese Food during refrigerated storage. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, n. 8. p. 615-621, aug. 1988.
78. RYSER, E. T.; MARTH, E.H. Growth of *Listeria monocytogenes* at different pH values in uncultured whey or whey cultured with *Penicillium camemberti*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 730-735. 1988. Apud: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. **Listeria, listerioses and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. Cap. 5, p.71.
79. RYSER, E. T.; MARTH, E.H. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. **Listeria, listerioses and food safety**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 45-65.
80. SABIONI, J.G. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 458-61, 1988.
81. SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG). **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 8, n. 33. p. 22-3, 1994.
82. SABOYA, L.V. **Adição de leite reconstituído na fabricação de queijo Minas Frescal**. Piracicaba, 1997. 82p. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ.
83. SCHAACK, M.M.; MARTH, E.H. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesiphilic lactic starter cultures. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 51, p. 600-606, 1998.

84. SEELINGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P.H.A.; MAIR, N.S.; SHARPE, M.E. **Bergey's Manual os Sistematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 1235-1245.
85. SGHEDONI, A.; RETTI, C.; SOUZA, G.P. Queijo Minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 34, n. 203, p. 37-0, mai./jun. 1979.
86. SILLIKER, J. H. *Listeria monocytogenes*. **Food Technology**, Chicago, v.40, n.8, aug. 1986.
87. SILVA, C. A. M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo Minas Frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4., 1980. Rio de Janeiro. **Anais**. Campinas: SBCTA, 1980, p. 202.
88. SILVA, M. C. C.; CASTRO, D. G. Ocorrência de surto de toxinfecção alimentar causada por queijo tipo "Minas". In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p.145-7.
89. SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence de *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, n. 3, p. 354-356, mar. 1998.
90. SILVA, M. C. D.; TIBANA, A. *Listeria monocytogenes* em alimentos: seu significado nos dias atuais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 38. p. 7-10, 1995.
91. SKOVGAARD, N. *Listeria*: Major sources and routes of human infection – enviroment and plants. In: **Listeriosis – Joint WHO/ROI Consultation on Prevention and Control**, v. 10, n. 12, p. 86-97, West Berlim, 1987. Apud: RYSER E.T.; MARTH, E.H. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: **Listeria, Listeriosis and Food Safety**, New York, Marcel Dekker, Inc.,1991. p. 66-119.

92. SORRELS, K. M.; ENIGL, D.C.; HATFIELD, J.R. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the grow and survival of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 8, p. 571-573, aug. 1989.
93. VAN DENDER, A. G. F.; MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 47, n. 279/281, p. 76-77, 1992.
94. VAN DENDER, A. G. F.; SCHEIDER, I.S. Fabricação do “Queso Blanco” visando melhor aproveitamento do leite ácido. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 43, n. 255, p. 3-12, 1988.
95. VANDERZANT, CARL & SPLITTSTOESSER, DONF. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.**, 3. ed. Washington: American Public Health Association, Edwards Brothers, 1992. 1219p.
96. VEDAMUTHU, E. R. & REINBOLD, G. W. Starte culture for Cheddar cheese. **Journal of Milk and Food Technology**. v. 30, n. 8, p. 247-252, 1967.
97. VIEIRA, M.A.S.V. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas Frescal através de tratamento termoquímico.** Campinas, 2000. 195p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
98. VIEIRA, M.C.M.; MESQUITA, A.J.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; RABELO, J.A.; LIMA, S.V.; SILVA, E.V. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido no estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80-81, p.113, 2001.
99. VIEIRA, S. D. A. A utilização de culturas lácticas na indústria de laticínios. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 36, n. 215, p. 29-36, 1981.

100. WARBURTON, D. W.; FARBER, J.M.; BABIUK, T. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and enviromental samples. In: CANADA. Health and Welfare. **Compendium of analytical methods:** laboratory procedures of microbiological analytical of foods, [MFHPB 30]. Ottawa: Polyscience, 1991.
101. WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Sobre a determinação da força de coalho. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207/212, p. 33-34, 1980.
102. WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M.; MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição do fermento láctico. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 5., 1978, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1978. p. 160-82,.
103. WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; CASAGRANDE, H. R.; LOURENÇO-NETO, J. P. M.; MUNCK, A.V. Alterações do queijo Minas Frescal durante o período de armazenamento. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 39, n. 233, mai./jun. 1984.

7. APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Valores médios das contagens de *Listeria monocytogenes* (expressos em log UFC/g) para queijos elaborados por acidificação direta e pelo método convencional para os três processamentos realizados e análise de variância dos resultados.

TEMPO (dias)	<i>L. monocytogenes</i> Acidificação direta 5°C	<i>L. monocytogenes</i> Convencional 5°C
1	A5,05 ^a	A4,18 ^b
6	B6,36 ^a	A4,75 ^b
12	C7,25 ^a	A4,75 ^b
18	C7,38 ^a	A4,66 ^b
25	C7,48 ^a	A4,54 ^b

TEMPO (dias)	<i>L. monocytogenes</i> Acidificação direta 10°C	<i>L. monocytogenes</i> Convencional 10°C
1	A5,66 ^a	A4,36 ^b
6	B,C7,42 ^a	A4,40 ^b
12	B7,34 ^a	A4,08 ^b
18	C7,85 ^a	A4,17 ^b
25	B,C7,66 ^a	A4,24 ^b

TEMPO (dias)	<i>L. monocytogenes</i> Acidificação direta 5°C	<i>L. monocytogenes</i> Acidificação direta 10°C
1	A5,05 ^a	A5,66 ^a
6	B6,36 ^a	B,C7,42 ^a
12	C7,25 ^a	B7,34 ^a
18	C7,38 ^a	C7,85 ^a
25	C7,48 ^a	B,C7,66 ^a

TEMPO (dias)	<i>L. monocytogenes</i> Convencional 5°C	<i>L. monocytogenes</i> Convencional 10°C
1	A4,18 ^b	A4,36 ^b
6	A4,75 ^b	A4,40 ^b
12	A4,75 ^b	A4,08 ^b
18	A4,66 ^b	A4,17 ^b
25	A4,54 ^b	A4,24 ^b

Valores médios na mesma linha, com letras minúsculas diferentes, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Valores médios na mesma coluna, com letras maiúsculas diferentes, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

APÊNDICE 2 – Valores médios das contagens de bactérias lácticas (expressos em log UFC/g) para queijos elaborados por acidificação direta e pelo método convencional para os três processamentos realizados e análise de variância dos resultados.

TEMPO (dias)	Bactérias Lácticas Acidificação direta 5°C	Bactérias Lácticas Convencional 5°C
1	A5,52 ^a	A8,74 ^b
6	A,C5,71 ^a	A,B8,45 ^b
12	A,C5,85 ^a	B8,43 ^b
18	B,C6,23 ^a	A,B8,66 ^b
25	B6,72 ^a	A,B8,71 ^b

TEMPO (dias)	Bactérias Lácticas Acidificação direta 10°C	Bactérias Lácticas Convencional 10°C
1	A6,37 ^a	A9,07 ^b
6	B8,13 ^a	A9,03 ^a
12	B8,16 ^a	A8,84 ^b
18	B8,32 ^a	A8,90 ^b
25	B8,38 ^a	A8,83 ^a

TEMPO (dias)	Bactérias Lácticas Acidificação direta 5°C	Bactérias Lácticas Acidificação direta 10°C
1	A5,52 ^a	A6,37 ^a
6	A,C5,71 ^a	B8,13 ^a
12	A,C5,85 ^a	B8,16 ^a
18	B,C6,23 ^a	B8,32 ^a
25	B6,72 ^a	B8,38 ^a

TEMPO (dias)	Bactérias Lácticas Convencional 5°C	Bactérias Lácticas Convencional 10°C
1	A8,74 ^b	A9,07 ^b
6	A,B8,45 ^b	A9,03 ^a
12	B8,43 ^b	A8,84 ^b
18	A,B8,66 ^b	A8,90 ^b
25	A,B8,71 ^b	A8,83 ^a

Valores médios na mesma linha, com letras minúsculas diferentes, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)
 Valores médios na mesma coluna, com letras maiúsculas diferentes, são significativamente diferentes ($p < 0,05$)