

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DURANTE A
ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO**

Claucia Fernanda Volken de Souza
Química Industrial (UFRGS)

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Microbiologia de Alimentos

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2002

Agradecimentos

Ao professor **Marco Antônio Záchia Ayub**, meu excelentíssimo orientador, pela confiança, incentivo, ensinamentos e, principalmente, por ter me dado a oportunidade de conhecer esse mundo da pesquisa científica;

Ao professor **Eduardo Tondo**, que me introduziu nos caminhos da Microbiologia;

Ao **Sr. Araújo**, da Secretaria de Agricultura de Caxias do Sul, por toda sua dedicação e apoio para a realização desse trabalho;

Aos produtores rurais **Dorneles Sandi e família, Roberto Andriolo e Regina Andriolo e Antônio Capelani e família**, sem os quais esse trabalho não teria saído do papel;

Ao professor **Tiziano**, pela sua amizade e companheirismo durante esses dois anos de trabalho;

Ao **Cássio, Lia e Suzette**, pela ajuda no laboratório, mas principalmente pela amizade;

À **PUC**, pela disponibilização do Laboratório de Bromatologia;

À **UNIVATES**, pela disponibilização do equipamento de análise de atividade de água;

À **FEPAGRO**, pelos dados climáticos climáticos fornecidos;

À professora **Elsa Nhuch**, pelas bibliografias valiosas;

Ao estatístico **Manoel**, pela paciência e ajuda na análise estatística;

Ao **Júlio**, por sua colaboração na leitura e sugestões aos originais;

À **Bernadete**, secretária do PPGMAA, por sua eficiência, dedicação e atenção em todos os trâmites burocráticos que envolvem uma dissertação de mestrado;

Aos colegas do mestrado **Gisa, Alessandro, Bacana, Samanta, Diego, Cris, Virgínia, Tati e Kiko**, pela nossa convivência, amizade e momentos alegres compartilhados nesses últimos anos;

Aos colegas do laboratório **Júlio, Vanderlei, Luís Henrique, Davi, Rosane, Stella, Andrea, Francine, Flaviana, Natália, Dani, Angela, André**, por proporcionarem sempre um excelente ambiente de conversas, risos e, é claro, de trabalho;

Ao **Léo**, meu amor, por estar sempre ao meu lado, até mesmo nas longas jornadas de trabalho no laboratório, em feriados e finais de semana.

EVOLUÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO¹

Autor: Cláucia Fernanda Volken de Souza

Orientador: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, PhD

SINOPSE

As variações da flora microbiana de seis bateladas do Queijo Serrano (3 maturadas no verão e 3 maturadas no inverno) foram estudadas durante a produção e maturação, com o objetivo de contribuir para a sua caracterização. Este queijo é tradicionalmente elaborado com leite cru de vaca sem a adição de cultura iniciadora por produtores rurais de Caxias do Sul. Os níveis de vários grupos microbianos foram enumerados no leite, na coalhada e em diferentes estágios ao longo dos 60 dias de maturação. Também foram investigadas as variações da composição química e dos principais parâmetros físico-químicos. Determinou-se os coeficientes de correlação entre os valores desses parâmetros e as contagens dos microrganismos ao longo da maturação. Os resultados demonstraram que a microflora e as características químicas e físico-químicas do Queijo Serrano apresentaram variações significativas durante o período de maturação de 60 dias, principalmente no verão. A maioria dos grupos microbianos atingiram suas contagens máximas no queijo aos 7 dias, após diminuindo progressivamente até o fim do processo. O aumento nas contagens durante a primeira semana de maturação foi acompanhado por um declínio acentuado no valor do pH, devido a produção de ácido pelos microrganismos. As bactérias lácticas constituíram-se no principal grupo microbiano do Queijo Serrano; suas contagens foram similares a de aeróbios mesófilos totais em todos os pontos amostrados. A abundância de lactobacilos durante a elaboração e maturação sugere que estes microrganismos possam ter um importante papel na produção do Queijo Serrano. Não observou-se diferenças significativas para a maioria das contagens microbianas e das características químicas e físico-químicas em relação ao período do ano em que os queijos foram maturados. Somente as contagens de halotolerantes e bolores e as análises químicas de umidade, nitrogênio total, proteína e gordura apresentaram diferenças significativas entre o verão e o inverno. A evolução que os parâmetros químicos e físico-químicos sofreram ao longo da maturação do Queijo Serrano não produziram condições acentuadamente antagonistas para qualquer um dos grupos microbianos investigados. Portanto, deve-se levar em conta que o progressivo desaparecimento dos microrganismos no interior do Queijo Serrano não é consequência da influência de um único efeito inibitório, mas da combinação de vários fatores.

¹/ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Microbiologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (139p). Março, 2002.

EVOLUTION OF THE MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SERRANO CHEESE THROUGHOUT THE MANUFACTURE AND RIPENING¹

Author: Cláucia Fernanda Volken de Souza

Advisor: Marco Antônio Záchia Ayub, PhD

SYNOPSIS

Changes in the microbial flora of six batches of Serrano Cheese (3 ripened in summer and 3 ripened in winter) were studied during the production and ripening, with the objective of contributing to the characterization of this cheese. It is traditionally manufactured by farmers in the city of Caxias do Sul, using raw milk of cows, without the addition of starter cultures. The levels of several microbial groups were enumerated in the milk, curd and different stages of the 60-day long ripening period. The changes in the general chemical composition and in the main physico-chemical parameters were also determined. The correlation coefficients between the values of these parameters and the microbial group counts throughout ripening were determined. The results demonstrated that the microflora and the chemical and physico-chemical characteristics of Serrano Cheese changed significantly during the 60 days ripening period, especially in the summer. Almost all microbial groups reached their highest counts after the 7th day of maturation, decreasing steadily until the end of the process. The increase in count during the first week of ripening was accompanied by a sharp drop in pH, which is a consequence of the production of acid by the microorganisms. The lactic acid bacteria constituted the main microbial group of Serrano Cheese; their counts were similar to the total aerobic mesophilic flora at all sampling points. The abundance of lactobacilli during the manufacture and ripening suggests that these microorganisms may play an important role in Serrano Cheese production. There were no significant differences observed either for microbial counting or for physico-chemical and chemical characteristics of the cheese in respect to the season of the year in which the product was manufactured. Only the halotolerant and molds counts, besides chemical characteristics of moisture, total nitrogen, protein and fat, were significantly different between the two seasons. The evolution that chemical and physico-chemical parameters undergo with the ripening of Serrano Cheese does not produce conditions markedly antagonistic for any of the microbial groups investigated. Therefore, the progressive disappearing of the microorganisms in the interior of the cheese is not a consequence of the influence of one isolated inhibitory effect, but rather the combination of several inhibitory factors.

¹/ Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology (Food Microbiology), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (139p.). March, 2002.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJOS.....	3
2.1.1. <i>Tratamento do leite</i>	3
2.1.2. <i>Coagulação</i>	4
2.1.2.1. <i>Coagulação ácida</i>	5
2.1.2.2. <i>Coagulação enzimática</i>	5
2.1.2.2.1. <i>Coagulante</i>	6
2.1.3. <i>Tratamento da massa e dessoragem</i>	6
2.1.4. <i>Moldagem ou enformagem</i>	7
2.1.5. <i>Prensagem</i>	7
2.1.6. <i>Salga</i>	7
2.1.7. <i>Maturação</i>	7
2.1.7.1. <i>Maturação acelerada</i>	9
2.2. PRINCIPAIS MICRORGANISMOS DO QUEIJO.....	10
2.2.1. <i>Bactérias Lácticas</i>	11
2.2.1.1. <i>Gênero Lactobacillus</i>	15
2.2.1.2. <i>Gênero Leuconostoc</i>	16
2.2.1.3. <i>Gênero Enterococcus</i>	17
2.2.1.4. <i>Gênero Lactococcus</i>	18
2.2.2. <i>Micrococcaceae</i>	19
2.2.3. <i>Bolores</i>	20
2.2.4. <i>Leveduras</i>	21
2.2.5. <i>Colifomes</i>	22
2.2.5.1. <i>Coliformes Fecais</i>	23
2.2.6. <i>Bactérias psicrótróficas</i>	23
2.3. DEFEITOS DE ORIGEM MICROBIANA DO QUEIJO	24
2.4. EVOLUÇÃO DE ALGUNS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E COMPOSICIONAIS DO QUEIJO DURANTE A MATURAÇÃO.....	25
2.4.1. <i>pH e acidez titulável</i>	25
2.4.2. <i>Atividade de Água e Umidade</i>	25
2.4.3. <i>Concentração de sal</i>	26
2.4.4. <i>Degradação da lactose</i>	26
2.4.5. <i>Degradação das proteínas</i>	27
2.4.6. <i>Degradação da Gordura</i>	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. <i>CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO QUEIJO SERRANO</i>	29
3.2. <i>ESCOLHA DOS PRODUTORES</i>	30
3.3. <i>MANUFATURA DOS QUEIJOS</i>	30
3.3.1. <i>Esquema de elaboração do Queijo Serrano</i>	31

3.4. COLETA DAS AMOSTRAS	32
3.5. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	34
3.5.1. Instalações	34
3.5.2. Material de Laboratório	34
3.5.3. Homogeneização das Amostras e Preparação das Diluições	34
3.5.3.1. Leite	34
3.5.3.2. Coalhada e Queijo	34
3.5.4. Contagem dos diferentes grupos microbianos	35
3.5.4.1. Contagem Total de Aeróbios Mesófilos	35
3.5.4.2. Contagem Total de Aeróbios Psicrotróficos	35
3.5.4.3. Contagem de Proteolíticos	36
3.5.4.4. Contagem de Lipolíticos	36
3.5.4.5. Contagem de Bactérias Lácticas	37
3.5.4.5.1. Isolamento e Identificação das Bactérias Lácticas	38
3.5.4.5.1.1. Isolamento das Bactérias Lácticas	39
3.5.4.5.1.2. Preservação das Culturas	39
3.5.4.5.1.3. Identificação das Bactérias Lácticas	39
3.5.4.6. Contagem de Halotolerantes (<i>Micrococcaceae</i>)	42
3.5.4.7. Contagem de Bolores e Leveduras	42
3.5.4.8. Contagem de Coliformes Totais	43
3.5.4.9. Contagem de Coliformes Fecais	43
3.6. ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICO-QUÍMICAS	44
3.6.1. Instalações	44
3.6.2. Material de laboratório	44
3.6.3. Preparação das Amostras	44
3.6.4. Determinação dos Parâmetros Físico-Químicos e das características químicas	45
3.6.4.1. Determinação do pH	45
3.6.4.2. Determinação da Acidez Titulável	45
3.6.4.3. Determinação da Atividade de Água (a_w)	46
3.6.4.4. Determinação da Umidade	46
3.6.4.5. Determinação do teor de Cloretos (NaCl)	47
3.6.4.6. Determinação do teor de Cinzas	48
3.6.4.7. Determinação do teor de Lactose	49
3.6.4.8. Determinação do teor de Nitrogênio Total e Proteína	50
3.6.4.9. Determinação do teor de Gordura	52
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. EVOLUÇÃO DAS CONTAGENS DOS GRUPOS MICROBIANOS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO	55
4.1.1. Contagem Total de Aeróbios Mesófilos	58
4.1.2. Contagem Total de Aeróbios Psicrotróficos	61
4.1.3. Contagem de Proteolíticos e Lipolíticos	63
4.1.4. Contagem de Lactobacilos e Lactococos	66
4.1.4.1. Evolução das bactérias lácticas	70
4.1.5. Contagem de Halotolerantes (<i>Micrococcaceae</i>)	75
4.1.6. Contagem de Bolores e Leveduras	77
4.1.7. Contagem de Coliformes Totais e Fecais	81
4.2. EVOLUÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E DAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DURANTE A ELABORAÇÃO E MATURAÇÃO DO QUEIJO SERRANO	90
4.2.1. Determinação dos pHs e da acidez titulável	93

4.2.2. Determinação da atividade de água e da umidade	99
4.2.3. Determinação do teor de sal e de cinzas	103
4.2.4. Determinação do teor de lactose.....	107
4.2.5. Determinação do teor de nitrogênio total, de proteínas e de gordura.....	109
5. CONCLUSÃO	113
6. PERSPECTIVAS	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8. APÊNDICES	127

Lista de Tabelas

TABELA 1 : Variações nas contagens (log ufc/g) dos grupos microbianos do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no verão.....	57
TABELA 2 : Variações nas contagens (log ufc/g) dos grupos microbianos do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no inverno.	57
TABELA 3: Valores médios das contagens dos diferentes grupos microbianos para o período do verão e do inverno.....	58
TABELA 4: Distribuição dos microrganismos isolados do meio de cultura M17 ao longo do processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano (3 bateladas do verão e 3 bateladas do inverno).....	73
TABELA 5 : Distribuição dos microrganismos isolados do meio de cultura Rogosa ao longo do processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano (3 bateladas do verão e 3 bateladas do inverno).....	73
TABELA 6: Coeficientes de correlação entre os parâmetros químicos, físico-químicos e as contagens (log ufc/g) dos diferentes grupos microbianos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no período do verão.....	86
TABELA 7: Coeficientes de correlação entre os parâmetros químicos, físico-químicos e as contagens (log ufc/g) dos diferentes grupos microbianos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no período do inverno.	88
TABELA 8 : Variações das características químicas e físico-químicas do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no verão.....	91
TABELA 9 : Variações das características químicas e físico-químicas do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no inverno.....	92
TABELA 10 :Valores médios das características químicas e físico-químicas para o período do verão e do inverno.....	93
TABELA 11 : Teor de gordura (%) dos leites coletados no verão e inverno.....	112

Lista de Figuras

FIGURA 1: Esquema da reação de formação da coalhada	5
FIGURA 2 : Rótulos colocados nas embalagens dos Queijos Serranos	30
FIGURA 3 : Esquema simplificado de fabricação artesanal do Queijo Serrano	32
FIGURA 4 : Amostras dos queijos coletadas dos três produtores	33
FIGURA 5 : Teste de produção de CO ₂ pelas bactérias lácticas a partir da glicose. A : Resultado positivo; B : Resultado negativo	40
FIGURA 6 : Evolução das contagens totais de aeróbios mesófilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	60
FIGURA 7 : Evolução das contagens totais de aeróbios mesófilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	60
FIGURA 8 : Evolução das contagens totais de aeróbios psicotróficos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	62
FIGURA 9 : Evolução das contagens totais de aeróbios psicotróficos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	62
FIGURA 10: Evolução das contagens de proteolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	63
FIGURA 11: Evolução das contagens de proteolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores. ..	64
FIGURA 12: Evolução das contagens de lipolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	65
FIGURA 13: Evolução das contagens de lipolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores. ..	65
FIGURA 14: Evolução das contagens de lactobacilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores	67
FIGURA 15: Evolução das contagens de lactobacilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores ...	68
FIGURA 16: Evolução das contagens de lactococos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores	68
FIGURA 17 : Evolução das contagens de lactococos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores ...	69
FIGURA 18: Evolução dos gêneros de bactérias lácticas (431 isolados) durante a elaboração e maturação do Queijo Serrano. Porcentagem de cada gênero isolado dos dois meios de cultura (M17 e Rogosa) em cada estágio	72

FIGURA 19: Morfologias e arranjos de algumas bactéria lácticas isoladas do Queijo Serrano. 1, 2, 3 e 4 – <i>Lactobacillus</i> spp.; 5 – <i>Leuconostoc</i> spp.; 6 – <i>Lactococcus</i> spp.; 7 e 8 – <i>Enterococcus</i> spp.....	74
FIGURA 20 : Evolução das contagens de halotolerantes durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	76
FIGURA 21: Evolução das contagens de halotolerantes durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores. ..	77
FIGURA 22: Evolução das contagens de bolores durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	79
FIGURA 23: Evolução das contagens de bolores durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores. ..	79
FIGURA 24 : Evolução das contagens de leveduras durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	80
FIGURA 25: Evolução das contagens de leveduras durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores. ..	80
FIGURA 26: Evolução das contagens de coliformes totais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.83	83
FIGURA 27 : Evolução das contagens de coliformes totais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	84
FIGURA 28: Evolução das contagens de coliformes fecais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.84	84
FIGURA 29: Evolução das contagens de coliformes fecais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.	85
FIGURA 30: Variação do pH durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	95
FIGURA 31: Variação do pH durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	96
FIGURA 32 : Variação do pH interno durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	96
FIGURA 33: Variação do pH interno durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	97
FIGURA 34 : Variação do pH externo durante a maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	97
FIGURA 35 : Variação do pH externo durante a maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	98
FIGURA 36: Variação da acidez titulável durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	98
FIGURA 37: Variação da acidez titulável durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	99
FIGURA 38 : Variação da atividade de água durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	101
FIGURA 39 : Variação da atividade de água durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	101
FIGURA 40: Variação da umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	102
FIGURA 41: Variação da umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.	102

FIGURA 42: Variação da concentração de NaCl durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	104
FIGURA 43: Variação da concentração de NaCl durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	104
FIGURA 44 : Variação da concentração de NaCl na umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	105
FIGURA 45: Variação da concentração de NaCl na umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	105
FIGURA 46: Variação do teor de cinzas durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	106
FIGURA 47: Variação do teor de cinzas durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	106
FIGURA 48: Variação do teor de lactose durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	108
FIGURA 49 : Variação do teor de lactose durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	108
FIGURA 50 : Variação do teor de nitrogênio total durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	109
FIGURA 51: Variação do teor de nitrogênio total durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	110
FIGURA 52: Variação do teor de proteína durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	110
FIGURA 53: Variação do teor de proteína durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	111
FIGURA 54: Variação do teor de gordura durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	111
FIGURA 55: Variação do teor de gordura durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.....	112

1. Introdução

O queijo é o produto mais comum derivado do leite, sendo um dos melhores alimentos que o homem dispõe, devido ao seu excelente valor nutritivo em função de sua composição química, rico em gordura, em proteína de excelente qualidade e em compostos como cálcio, fosfatos, vitamina A, e também pelas suas características organolépticas.

O estado do Rio Grande do Sul é um grande produtor de leite, mas produz um número muito limitado de queijos, quase todos do tipo fresco ou semi-curado e com escasso controle tecnológico.

A produção rural de queijos, ou seja, o queijo artesanal e caseiro produzido em fazendas e sítios, remonta desde as épocas pioneiras, e vem se perpetuando por anos, passando de geração em geração. Dessa forma a produção artesanal tem uma grande importância social. Embora não se encontre nas estatísticas oficiais, sua contribuição é extremamente significativa na formação da renda do proprietário rural, principalmente daqueles que não têm acesso às usinas processadoras de leite, e, até mesmo, têm participação efetiva na economia do Estado.

Para se produzir um queijo de qualidade, de ótimo aroma e sabor, muitos fatores influenciam. Dentre esses pode-se destacar o papel dos microrganismos, os quais são importantes durante todo o processo de fabricação. Ao agirem sobre as proteínas, lactose e gordura são responsáveis pelo aparecimento do sabor, aroma, textura e consistência, que diferenciam os diversos tipos. O conhecimento da flora microbiana de um queijo, sua evolução ao longo da maturação e a contribuição dos diversos microrganismos para o processo é de importância fundamental para o estabelecimento de uma tecnologia adequada de fabricação.

Embora os microrganismos sejam fundamentais para a elaboração de um produto final homogêneo e com padrão de qualidade, a flora microbiana característica dos diferentes queijos artesanais brasileiros não é conhecida, com exceção do Queijo-de-Minas. Conseqüentemente, eles não possuem uniformidade, e muitas vezes apresentam defeitos que

poderiam ser evitados caso houvesse um maior controle das práticas de fabricação artesanal. Ao contrário da grande maioria dos queijos originários de países onde essa tradição já é difundida, tais como: Itália, Espanha, França, Portugal e Argentina, nos quais os queijos artesanais já possuem suas normas de identidade especificadas.

O Queijo Serrano é elaborado por produtores rurais, organizados em agroindústrias na cidade de Caxias do Sul e tem importância na vida econômica dos agricultores, constituindo-se esta atividade numa importante fonte alternativa de sobrevivência. Apesar desse queijo ser apreciado pelo seu sabor e aroma, não existe informação sobre sua flora microbiana e propriedades químicas e físico-químicas.

Como é produzido com leite cru e sem adição de cultura "starter", suas características organolépticas dependem da flora natural do leite e do ambiente. Esses procedimentos artesanais de elaboração, juntamente com a ausência de qualquer controle de temperatura e umidade relativa na sala de maturação, resultam num produto final muito variável.

Além disso, segundo legislação do Ministério da Agricultura, os queijos produzidos com leite cru, sem o uso de cultura iniciadora, devem ser maturados por no mínimo 60 dias para que o produto seja garantido sob o aspecto higiênico-sanitário e adquira as características como sabor, aroma e textura. Entretanto, o Queijo Serrano é vendido com no máximo 30 dias de cura, devido à inviabilidade econômica que um período maior representa para os produtores rurais. Portanto, se isolada a microflora responsável pela maturação, estas poderão ser usadas como cultura iniciadora com a vantagem de acelerar a maturação sem modificar as características organolépticas do produto original, além de possibilitar uma padronização do produto final.

Os produtores estão cientes de seus problemas e dificuldades tecnológicas e desejam modificá-las visando a melhoria da qualidade dos seus queijos, ou seja, a obtenção de um produto uniforme de qualidade constante, porém isso demanda um amplo conhecimento dos aspectos bioquímicos, físico-químicos e microbiológicos do Queijo Serrano.

Por estas razões, o objetivo deste trabalho foi estudar a evolução de vários grupos microbianos, em especial as bactérias lácticas, durante a elaboração e maturação dos queijos em duas estações climáticas distintas, bem como algumas características químicas e físico-químicas dos mesmos.

Este estudo constitui o primeiro passo para o desenvolvimento de uma cultura láctica específica que permitirá a elaboração de um produto de qualidade padronizada e seguro sob o aspecto de saúde pública.

2.Revisão Bibliográfica

2.1. Processo de fabricação de queijos

Praticamente todos os tipos de queijos têm uma sequência comum no seu processo de fabricação. O grande número de variedades resulta de variações em algumas etapas da fabricação, tais como: leites, culturas lácticas, condições de maturação, entre outras. De um modo geral, a fabricação de queijos envolve as seguintes etapas: tratamento do leite, coagulação, tratamento da massa e dessoragem, enformagem, prensagem, salga e cura (Scott, 1991).

2.1.1. Tratamento do leite

O leite deve ser filtrado e submetido a uma pasteurização, mas, tradicionalmente, é perfeitamente possível e até mesmo preferido pelos queijeiros o emprego de leite cru na fabricação de queijos, principalmente dos queijos mais finos de longa maturação. Os queijos fabricados com leite cru apresentam cura mais rápida e aroma e sabor mais intensos (Grappin e Beuvier, 1997). Como exemplo, McSweeney et al. (1993) concluíram que o número de bactérias lácticas não iniciadoras viáveis era bem maior no leite cru que no leite pasteurizado ou microfiltrado, e foi aparentemente responsável pela alta proteólise, maturação mais rápida e o forte aroma do queijo tipo Cheddar.

A finalidade da pasteurização é destruir todos os patógenos que estiverem presentes no leite (Chapman e Sharpe, 1987). Sob o aspecto higiênico-sanitário há exigência legal (portaria nº 146 de 07/03/96) da pasteurização somente para os queijos cujo período de cura seja inferior a sessenta dias (Brasil, 1996), pois no caso dos queijos maturados por mais de dois meses há vários trabalhos mostrando que os patógenos morrem durante esse período, tornando o produto garantido sob o ponto de vista higiênico-sanitário. Foi observado uma significativa

redução da flora potencialmente patogênica ao longo de nove semanas em que foi maturado o queijo espanhol Cendrat del Montsec, produzido com leite cru de cabra. As enterobactérias diminuíram durante esse período, bem como os coliformes fecais, que não foram mais detectados a partir da 9^o semana de maturação (Mor-Mur et al., 1994). Característica semelhante ocorreu com o queijo espanhol León, elaborado com leite cru de vaca, no qual foi observado um constante decréscimo na contagem de enterobactérias, que desapareceram completamente após três meses de maturação (em um dos quatro queijos estudados após duas semanas de maturação já não foram mais detectadas enterobactérias) (Medina et al., 1995).

Na pasteurização do leite o tratamento térmico exigido para a destruição dos patógenos destrói também os microrganismos lácticos importantes na produção do sabor e aroma durante a cura; por isso a exigência de se adicionar ao leite, após a pasteurização, culturas lácticas selecionadas específicas para os diversos tipos de queijos (Estepar et al., 1999). Quando se emprega leite cru, os microrganismos lácticos naturalmente presentes no leite são selecionados no queijo em função das etapas de fabricação e das condições de cura, não havendo, portanto, uma exclusiva dependência do emprego de fermento ou culturas lácticas selecionadas no processo, embora, ao fazê-lo, tenha-se uma maior garantia da ocorrência da fermentação desejada (Oliveira, 1986).

2.1.2. Coagulação

Para o processo de coagulação o leite é colocado em tanques onde sua temperatura é ajustada, e são adicionados ingredientes como: cultura láctica, cloreto de cálcio e coalho. O agente coagulante ou coalho é o último ingrediente adicionado e após agitação o leite deve ser deixado em completo repouso para que ocorra a coagulação (Olson e Mocquot, 1985).

A coagulação é a etapa decisiva na fabricação de queijos e visa concentrar a proteína do leite retendo também a gordura. O fenômeno da coagulação do leite deve-se basicamente à hidrólise parcial da caseína, cujas partículas, em virtude de suas dimensões e de suas cargas negativas, flutuam no leite e repelem-se mutuamente (Wegner, 1987), perdendo, porém a sua estabilidade em função da acidificação ou da ação de enzimas proteolíticas (Scott, 1991).

As características físico-químicas e tecnológicas do coágulo obtido em cada um dos processos são diferentes, possibilitando, dessa forma o processamento de diferentes tipos de queijos. A coalhada produzida por via ácida tem o pH em torno de 4,6 a 5,0 e tende a ser granular, frágil, particulada e inelástica, devido a precipitação da caseína próximo ao ponto isoelétrico, no qual é insolúvel. O coágulo enzimático, que ocorre num pH próximo ao do leite, ou seja, na faixa de 5,8 a 6,6, é mais firme e elástico, semelhante a uma gelatina, que se

torna cada vez mais resistente e ao ser fracionado se contrai, dando origem a um precipitado consistente e elástico (Fox et al., 2000).

2.1.2.1. Coagulação ácida

A coagulação ácida é devida ao abaixamento do pH até o ponto isoelétrico da caseína, em torno de 4,6. A diminuição do pH causada pela acidificação (ion +) reduz a ionização negativa das micelas de caseína, pois as cargas elétricas dessas partículas coloidais se neutralizam e as forças de repulsão, devido ao excesso de cargas negativas num pH próximo da neutralidade, desaparecem, permitindo assim que as partículas coloidais unam-se formando o coágulo ou gel (Dumais et al., 1985). No Brasil o seu uso na fabricação de queijos é muito restrito, limitando-se praticamente ao preparo de massa para requeijões. A coagulação ácida geralmente se processa através de ácidos orgânicos ou acidificação microbiológica por culturas lácticas selecionadas ou contaminantes naturais (Oliveira, 1986).

2.1.2.2. Coagulação enzimática

As micelas ou partículas coloidais da caseína são constituídas de 4 frações protéicas principais: alfa (α), beta (β), gama (γ) e kapa (κ). A fração κ , embora representando somente cerca de 10 a 20% da caseína, exerce um importante papel protetor sobre essas partículas coloidais, evitando que precipitem-se em presença de cálcio solúvel (Fox, 1993). Na coagulação enzimática, uma enzima proteolítica age especificamente sobre uma porção específica da fração κ , ou seja, na ligação peptídica entre o aminoácido fenilalanina e metionina, removendo uma cadeia glicopeptídica, que fica no soro (Scott, 1991). Desse modo a fração κ perde sua capacidade protetora e as partículas coloidais de caseína tornam-se instáveis (paracaseína) na presença de cálcio solúvel, dando origem à formação do paracaseinato de cálcio (coágulo), conforme mostra a Figura 1 (Oliveira, 1986).

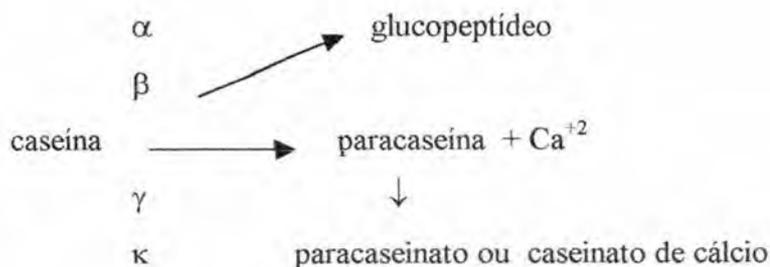


FIGURA 1: Esquema da reação de formação da coalhada

Em condições de repouso o caseinato de cálcio formado agrega-se em um só bloco reticular de aparência semi-sólida (coalhada), cuja consistência aumenta gradativamente chegando a um ponto considerado ótimo. A gordura e a umidade ficam retidas no coágulo, sendo que a fase aquosa contendo os componentes hidrossolúveis constitui o soro, que é eliminado durante a dessoragem da massa (Scott, 1991).

Quando o leite é submetido a um tratamento térmico (pasteurização) excessivo os sais de cálcio solúveis são precipitados como fosfato de cálcio coloidal. Com isso, o processo de coagulação enzimática torna-se demorado ou incompleto, resultando num coágulo frágil, devido a falta de cálcio solúvel. Portanto, para melhorar a firmeza da coalhada enzimática, adiciona-se cloreto de cálcio ao leite pasteurizado (Chapman e Sharpe, 1987).

2.1.2.2.1 Coagulante

O coalho pode ser encontrado na forma líquida, de pastilhas, em pasta ou em pó. O seu poder coagulante depende do tipo da enzima e da sua atividade proteolítica na fração κ da caseína (Oliveira, 1986). São usados coagulantes de origem vegetal, animal (extraído do estômago de bezerras), bacteriana e fúngica (Fox, 1993). O queijo espanhol La Serena e o queijo português Serra Estrela são obtidos por coagulação de leite cru de ovelha com extrato da flor *Cynara cardunculus* L. (Fernandez del Pozo et al., 1988; Macedo et al., 1993).

2.1.3. Tratamento da massa e dessoragem

O final da coagulação é determinado em função da consistência do coágulo formado, sendo denominado de ponto de corte da massa (Oliveira, 1986). Imediatamente após atingi-lo o coágulo deve ser fracionado, aumentando a sua superfície e, portanto, acelerando o fenômeno da sinérese, no qual o soro tende a separar-se da coalhada que se contrai e diminui de volume, possibilitando um dessoramento mais rápido e homogêneo (Wegner, 1987). Os fragmentos devem ser de tamanhos iguais, pois os maiores reterão mais umidade. O principal efeito disso é a desigualdade na acidificação produzida pelas bactérias lácticas do fermento, as quais agem mais rapidamente no interior dos grãos de maior umidade (Oliveira, 1986).

Com o corte do coágulo há a formação de duas fases, uma precipitante, denominada massa e outra aquosa, denominada soro. Visando acelerar e intensificar a dessoragem, a mistura é mantida sob agitação e leve aquecimento (Olson e Mocquot, 1985).

2.1.4. Moldagem ou enformagem

Após a remoção do soro a coalhada forma uma massa consistente que é colocada em formas, cujas dimensões e formatos variam de acordo com o tipo de queijo (Fox et al., 2000).

2.1.5. Prensagem

Imediatamente após a enformagem, as formas são tampadas e levadas à prensa. Esta operação permite a extração de água livre do queijo e visa transformar as partículas da coalhada em uma massa compacta (Scott, 1991), conferindo o formato desejado ao queijo, além de completar a dessoragem e possibilitar a formação da casca (Furtado, 1990).

2.1.6. Salga

O sal de cozinha é adicionado em praticamente todos os queijos, em porcentagens que variam de acordo com o tipo (Nath, 1993). Além de conferir sabor, exerce influência preponderante nos fenômenos físico-químicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem durante a maturação. Intensifica a dessoragem, favorecendo a liberação da água livre da massa e exerce um importante papel na seleção da flora microbiana (Furtado, 1990). Segundo Medina et al. (1995) o declínio da contagem de enterobactérias no queijo espanhol León parece ter sido devido à alta concentração de sal.

A salga úmida é realizada em tanques de salmoura, onde os queijos são mergulhados logo após a prensagem. Na salga seca, o sal é esfregado na superfície externa e dissolve-se lentamente devido à umidade do próprio queijo (Oliveira, 1986).

2.1.7. Maturação

A maturação ou cura corresponde à etapa de atividade biológica no produto, envolvendo reações de caráter enzimático de decomposição dos três componentes principais do leite, que ficam retidos no queijo (lactose, proteína e gordura) (El Soda, 1993). Como consequência, o sabor, o aroma e a textura modificam-se progressivamente devido aos inúmeros metabólitos gerados até alcançar as características típicas de cada variedade (Olson e Mocquot, 1985).

No caso de queijos, qualquer atividade microbiológica do fermento láctico adicionado, ocorrida durante as etapas de fabricação, já poderia ser considerada uma cura (Dilanjan, 1984). Entretanto, em termos práticos, um queijo só é tido como curado quando armazenado

por algum tempo após a salga, visando promover alterações no sabor, textura, consistência e cor, de modo a torná-lo distinto do queijo recém-fabricado ou queijo fresco (Oliveira, 1986).

Dependendo do tipo de queijo a maturação pode ser principalmente na superfície ou no interior (Nath, 1993).

As mudanças que ocorrem durante a maturação podem ser divididas em dois eventos principais. As fermentações primárias envolvem a formação de peptídeos e aminoácidos a partir das caseínas, ácidos graxos da gordura do leite, a conversão da lactose para ácido láctico, ou outros produtos como CO₂, etanol e ácido acético (Dumais et al., 1985). As fermentações secundárias envolvem a conversão dos produtos finais das transformações primárias (El Soda, 1993). Nessas fermentações secundárias, ácido láctico, peptídeos e ácidos graxos são transformados na mais variada gama de produtos, tais como aminas, ácidos orgânicos, compostos sulfurosos, cetonas, lactonas, aldeídos e álcoois, que contribuem para o refinamento do sabor, aroma e características típicas de cada tipo de queijo. A complexidade do mecanismo de cura de um queijo aumenta com o tempo de maturação (Oliveira, 1986).

As enzimas responsáveis pelas transformações são provenientes (Fox, 1993):

- dos microrganismos originalmente presentes no leite (principalmente nos queijos fabricados com leite cru);
- da cultura láctica adicionada;
- de microrganismos que crescem no interior ou sobre a superfície do queijo;
- do coalho (enzimas proteolíticas);
- do leite, principalmente proteases e lipases, que são importantes em queijo elaborado a partir de leite cru.

Além do aspecto qualitativo e quantitativo das enzimas presentes em um queijo, vários outros fatores interferem na sua cura. A temperatura do ambiente de maturação tem uma influência primordial, pois é o principal fator controlador do crescimento ou multiplicação dos microrganismos envolvidos nesse processo, além de controlar também a atividade das reações enzimáticas (Fox et al., 2000). As temperaturas baixas retardam ou paralisam certas reações enzimáticas e o crescimento microbiano, retardando ou, até mesmo, impedindo a maturação, enquanto que temperaturas elevadas aceleram excessivamente as atividades microbiológicas e enzimáticas, resultando em transformações intensas e desordenadas que dão origem, geralmente, à queijos com sabores fortes e desagradáveis (Dumais et al., 1985). A umidade relativa e a tensão de oxigênio do ar são fatores que também interferem no processo de maturação. Por estas razões existem variedades de queijos tradicionalmente ligadas a países e regiões climáticas (Nath, 1993).

Outros elementos que interferem na cura são o pH e a quantidade de sal no queijo, de modo que a alta concentração de sal inibe o processo, enquanto que a inexistência ou baixa concentração resulta numa maturação mais acelerada (Scott, 1991). A forma e o tamanho do queijo também influenciam em suas transformações (Nath, 1993).

Os processos fermentativos são complexos e muito sensíveis a quaisquer mudanças, tanto na composição e qualidade da matéria-prima como nas condições de processamento. Assim sendo, quando trabalha-se com leite cru, é muito maior a dificuldade em controlar-se a fermentação ou cura do queijo devido à incidência de contaminantes naturais secundários indesejáveis, que, embora dominados pelos microrganismos lácticos desejáveis, desempenham um papel complementar na cura dos queijos. Isto resulta numa maior dificuldade na padronização tecnológica dos queijos e há uma maior incidência de defeitos e perdas, devido à fermentações anormais, enquanto que no caso de leite pasteurizado esses contaminantes são destruídos. A pasteurização do leite e o uso adequado de culturas lácticas selecionadas ou fermento têm contribuído de uma forma muito significativa para a melhoria da qualidade dos queijos (Nath, 1993).

2.1.7.1. Maturação acelerada

O armazenamento de queijos, até que tenham a consistência e características organolépticas adequadas, incrementa significativamente os custos de produção. Portanto, a possibilidade de reduzir este tempo, desenvolvendo métodos controlados de maturação acelerada sem modificar o equilíbrio das características organolépticas do produto, permite diminuir os custos e os riscos de surgirem defeitos provocados por fermentações anômalas (Chapman e Sharpe, 1987).

Conseqüentemente, há considerável interesse industrial e acadêmico em acelerar o processo. As técnicas que têm sido investigadas, incluem elevação da temperatura de maturação, aumento do número de "starter", modificação genética das bactérias lácticas e adição de enzimas como lactases, proteases e lipases (Fox, 1989). As bactérias lácticas representam um papel chave durante a maturação e podem, portanto, serem usadas como agentes de aceleração. As pesquisas nos últimos vinte anos têm demonstrado que um agente para acelerar a maturação que não envolva bactérias lácticas ou suas enzimas não será certamente bem sucedido (El Soda, 1993).

Especialmente no Brasil, para diminuir os custos, alguns fabricantes de queijo tipo Prato tem diminuído o tempo de maturação sem o uso adicional de qualquer tipo de tecnologia, prejudicando as suas características. Desta forma, o produto vem perdendo seus

padrões de qualidade e identidade. A opção mais viável para solucionar este problema consistiria na aceleração da maturação desse tipo de queijo (Silva et al., 1999).

2.2. Principais microrganismos do queijo

A flora microbiana dos queijos, particularmente daqueles elaborados de leite cru, é muito complexa. A evolução que segue ao longo da maturação é determinada tanto por fatores extrínsecos (processo tecnológico de elaboração ou condições de maturação dos queijos) como intrínsecos (características e peculiaridades de cada queijo). Estes fatores estão interrelacionados entre si, sendo que as características físicas e químicas dos queijos são determinadas, em parte, pela flora microbiana (Beresford et al., 2001). Por consequência, o processo de maturação depende da interação que se produz entre a flora microbiana e os fatores bióticos e abióticos dos queijos, que determinam as reações e as adaptações fisiológicas e morfológicas dos microrganismos ao meio, que se modifica como consequência da ação microbiana. O estudo dessas interações é difícil por causa do ecossistema microbiológico complexo encontrado nos queijos (Martley e Crow, 1993).

Os fatores abióticos compreendem as características do meio sendo, portanto, de natureza físico-química, os principais são: pH, atividade de água (a_w), concentração salina, temperatura e disponibilidade de O_2 (Fleet, 1999; Beresford et al., 2001). Os fatores bióticos são determinados pela presença de outros microrganismos, da mesma ou de outra espécie. Pode-se considerar o queijo como um sistema biológico no qual vários grupos microbianos compartilham um mesmo habitat, estabelecendo relações de competição ou associações do tipo simbiose. A competição que se estabelece pelos nutrientes faz com que os grupos microbianos melhor adaptados às condições abióticas ou com um metabolismo mais ativo acabem se constituindo como dominantes em relação ao resto. Quando se modificam essas condições, como consequência da própria atividade microbiana ou de diversas reações bioquímicas, pode-se favorecer, então, o crescimento de outro grupo microbiano (Beresford et al., 2001). As associações do tipo simbiótica também são freqüentes já que, enquanto certos microrganismos possuem capacidade enzimática para degradar proteínas e peptídeos de alto peso molecular, outros, no entanto, são capazes de degradar somente os peptídeos de baixo peso molecular e os aminoácidos, dependendo, portanto, da ação degradativa dos primeiros para terem acesso aos nutrientes. A utilização de ácidos orgânicos pelas leveduras e bolores favorecendo o crescimento de bactérias é um outro exemplo desse tipo de interação (Fleet, 1999).

As características desenvolvidas durante a produção e maturação, devido às alterações dos componentes do leite, são catalisadas por enzimas derivadas de várias espécies de microrganismos do queijo e, por conseguinte, grande é a importância da microflora na determinação das características de cada variedade (Bhowmik e Marth, 1990). Há dois tipos de enzimas excretadas pelos microrganismos do queijo: as exocelulares, que são excretadas pelas células, sendo então dispersadas no meio, e têm atividade hidrolítica; e as intracelulares, que são liberadas pelas células microbianas somente após sua morte, cuja função é mais importante em queijos duros, que sofrem um longo processo de maturação (Dumais et al., 1985).

Os processos que se desenvolvem ao longo da elaboração do queijo dependem da composição qualitativa e quantitativa da microflora acompanhante (Dilanjan, 1984). O conhecimento da flora microbiana envolvida na maturação é essencial para uma uniformidade na produção dos queijos, visando garantir aos consumidores um produto com alto padrão de qualidade (Gómez et al., 1989). Para estudar a microbiologia dos queijos é necessário enumerar e isolar os principais grupos de bactérias presentes no leite, na coalhada e no queijo em maturação. A avaliação das suas funções na maturação exige que se determine a viabilidade ou multiplicação dos grupos microbianos durante um longo período (Chapman e Sharpe, 1987).

2.2.1. Bactérias Lácticas

A flora microbiana durante o processo de elaboração dos diferentes tipos de queijos é extremamente variada. Porém, cabe às bactérias lácticas uma função primordial, constituindo-se nos microrganismos mais importantes, tanto do ponto de vista quantitativo como metabólico, na conversão de leite para queijo. São os microrganismos mais abundantes e característicos de todos os tipos de queijos. Nesse grupo incluem-se, além de outros, os gêneros *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* e *Enterococcus* (López-Díaz et al., 2000).

Os produtos derivados do leite são meios adequados para o crescimento de bactérias lácticas (Nath, 1993). De um total de 4379 isolados de 35 produtos lácteos artesanais europeus, incluindo 24 queijos artesanais, 38% foram classificados como *Lactococcus* spp., 17% como *Enterococcus* spp., 14% como *Streptococcus thermophilus*, 12% como *Lactobacillus* mesófilos, 10% como *Leuconostoc* spp. e 9% como *Lactobacillus* termófilos (Cogan et al., 1997).

No queijo artesanal Serra da Estrela, elaborado por produtores rurais na região de Serra em Portugal usando leite cru de ovelha, as bactérias lácticas foram os principais

componentes da microflora durante a maturação de 35 dias (Macedo et al., 1996). De acordo com Macedo et al. (1993), a fermentação láctica nesse queijo é devido principalmente às bactérias dos gêneros *Lactococcus* (*Lc. lactis*), *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (*Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum*). Segundo Macedo et al. (1995), a presença de lactococos e enterococos durante os estágios finais de maturação sugerem que estas bactérias possam ser importantes para o processo de cura desse tipo de queijo.

Segundo Kaminarides e Anifantakis (1989), no queijo grego Kopanisti os lactobacilos e lactococos constituíam os grupos predominantes, especialmente no início da cura. A contagem dessas bactérias lácticas durante a maturação foram similares tanto na superfície como no interior do queijo. O mesmo ocorreu no queijo espanhol artesanal Peñamellera, elaborado com leite cru de vaca, no qual as bactérias lácticas tornaram-se dominantes ao longo da maturação tanto na superfície como no interior deste queijo (Estepar et al., 1999). Já no queijo espanhol La Serena as bactérias lácticas predominaram no interior do queijo. Um menor crescimento de bactérias lácticas na superfície ocorre devido a concentração de sal e as condições aeróbias (Fernandez del Pozo et al., 1988).

Em épocas anteriores a fermentação da lactose do leite para a fabricação de queijos dependia somente das bactérias lácticas da microflora natural do leite (Chapman e Sharpe, 1987). Atualmente, bactérias viáveis, denominadas culturas "starter" ou iniciadoras, são adicionadas a alimentos com a finalidade de melhorar a conservação, a segurança e as características sensoriais. Na indústria de produtos lácteos as bactérias lácticas têm sido empregadas como culturas iniciadoras (Balduino et al., 1999).

Com o desenvolvimento da microbiologia, os microrganismos desejáveis foram isolados, selecionados e mantidos em culturas puras, a fim de serem usados no preparo de culturas lácticas. Isso deu origem a processos fermentativos muito mais rápidos, seguros e constantes, o que permite uma melhor padronização dos produtos, principalmente com relação a sabor e aroma. A escolha da cultura é feita tomando-se como base um produto de excelente qualidade obtido pela fermentação natural, do qual se procura isolar a flora dominante responsável (Oliveira, 1986).

As culturas lácticas são de grande importância no processo de fabricação de queijos, sendo um fator indispensável para a obtenção de um produto de boa qualidade e padronizado. É o ingrediente mais importante utilizado na fabricação dos queijos (Furtado et al., 1990; Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 1992; Mor-Mur et al., 1994). Esta cultura é apropriadamente chamada "starter", pois ela inicia a maioria das reações e mudanças que

ocorrem durante a fabricação do queijo, principalmente a produção de ácido láctico, permanecendo no período de cura (Isepon e Oliveira, 1995).

Estas culturas iniciadoras podem ser constituídas por uma estirpe ou uma associação de duas ou mais. As que normalmente são empregadas na fabricação da maioria das variedades de queijos incluem microrganismos acidificantes, geralmente *Lactococcus lactis*, e alguma espécie de *Leuconostoc*, que produz compostos responsáveis pelo aroma, ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, que também é aromatizante. Os lactobacilos são considerados flora não "starter" nos queijos, pois, apesar de serem isolados em altas proporções, não costumam ser incluídos nas culturas iniciadoras (Fox et al., 2000).

As bactérias lácticas podem ter um metabolismo homo ou heterofermentativo. As homofermentadoras degradam as hexoses pela via glicolítica, produzindo ácido láctico como produto final. As heterofermentativas seguem a rota das pentoses-fosfato e produzem ácido láctico, acético ou etanol e CO₂. Todos os membros do gênero *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e algumas espécies de lactobacilos são homofermentativas, enquanto todas do gênero *Leuconostoc* e alguns lactobacilos são heterofermentativos. Além disso existe um outro grupo, os lactobacilos heterofermentativos facultativos, que apresentam um metabolismo homo ou heterofermentativo em função das características do meio de cultivo; assim, quando a glicose não é limitante, esta é degradada pela rota glicolítica com produção final de ácido láctico, comportando-se como homofermentadores. As heteroláticas são mais importantes que as homoláticas na produção de componentes de sabor e aroma, como acetaldeído e diacetil (Jay, 1992).

Os lactobacilos (pH ótimo de crescimento de 5,5 a 6,2) são mais ácido-tolerantes que os lactococos e os leuconostoc (pH ótimo de crescimento de 6,3 a 6,5) e os pHs finais de acidificação também são mais baixos no gênero *Lactobacillus* (3,2 a 3,5) que nos outros dois gêneros (4,0 a 4,5 em lactococos e 5,0 em leuconostoc). Portanto, a sensibilidade de cada espécie bacteriana ao pH do meio é um dos elementos determinantes da competição entre estes grupos microbianos (Sharpe, 1979).

No transcorrer da maturação a a_w diminui para valores abaixo de 0,92 e o metabolismo das bactérias lácticas é detido, ainda que prossigam algumas reações enzimáticas. Inclusive podem interromper seu crescimento com valores mais altos de a_w se, além desse, concorrem outros fatores inibidores (Beresford et al., 2001).

A evolução que as bactérias lácticas apresentam durante a maturação parece ser comum na maioria das variedades de queijos. Caracteriza-se por um rápido crescimento inicial dos lactococos, que começam a fermentação da lactose, logo após os leuconostoc se desenvolvem,

pois possuem uma capacidade menor para metabolizar os carboidratos e requerem a ação prévia dos lactococos. Já os lactobacilos e enterococos se mantêm num segundo plano, uma vez que nestes o metabolismo da lactose é mais lento, portanto, a medida que a maturação transcorre esses microrganismos tornam-se dominantes e participam do processo (López-Díaz et al., 2000).

Os lactococos dominam a microflora até o 12^o dia de maturação do queijo Minas padronizado e, em seguida, diminuem até o final do período, mostrando serem importantes na fase inicial de cura. Já os lactobacilos, mesmo sem terem sido adicionados, estão presentes, sendo o único grupo a apresentar aumento, a partir do 12^o dia, de forma que no 24^o dia de maturação, o número de lactobacilos é mais elevado que de lactococos, o que pode sugerir uma possível atuação desse gênero no final da cura desse queijo (Gomes e Bonassi, 1996).

O primeiro efeito das bactérias lácticas é a produção de ácido que se inicia imediatamente após a sua adição e resulta no aumento do poder coagulante do coalho, favorecendo a coagulação do leite. Além de ajudar na ação da renina essa acidificação aumenta sensivelmente a coesão ou consistência do coágulo e auxilia na dessoragem (Fox et al., 1990). Além do ácido láctico, podem produzir compostos aromatizantes, responsáveis pelo desenvolvimento das características organolépticas dos queijos, e, em menor extensão, enzimas proteolíticas e lipolíticas que participam dos fenômenos bioquímicos que ocorrem durante a maturação do queijo (Chapman e Sharpe, 1987). As bactérias lácticas possuem proteinases ativas na degradação da caseína, produzindo aminoácidos e peptídeos (Fox, 1989; Fox e McSweeney, 1996). É significativa a função que as bactérias lácticas tem na proteólise de queijos semi-duros para o desenvolvimento da textura e das características organolépticas (Requena et al., 1991).

As bactérias lácticas possuem escassa atividade lipolítica, atuando mais facilmente sobre a gordura já parcialmente hidrolisada. Quando se encontram em alto número e durante longo tempo em contato com o substrato as bactérias lácticas podem hidrolisar a gordura do leite (Kamaly et al., 1990). Segundo Singh et al. (1973) as lipases das bactérias lácticas seriam intracelulares e, ao morrer, as células difundiriam as ao meio, produzindo a hidrólise da gordura; outros autores (Kamaly e Marth, 1989) estabelecem que os lactococos possuem lipases intracelulares e extracelulares. Ainda que a atividade lipolítica e esterolítica das bactérias lácticas seja limitada e provavelmente não contribua muito para o aroma do queijo, pode, no entanto, ter certa influência no desenvolvimento do mesmo, principalmente nos que possuem um longo período de maturação (El Soda et al., 1986; Khalid e Marth, 1990).

As bactérias lácticas também exercem uma efetiva inibição do crescimento de microrganismos ou contaminantes indesejáveis, devido à produção de ácidos orgânicos, incluindo láctico, acético e propiônico (Caplice e Fitzgerald, 1999). Além disso, dependendo das condições de cultivo e da espécie, podem produzir outras substâncias antimicrobianas durante a maturação, que junto com o baixo pH, contribuem para inibir a flora patogênica, conferindo aos produtos maturados melhor qualidade sanitária (Balduino et al., 1999). Vários *Lactobacillus* spp. são capazes de produzir pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio, que atua devido à sua forte capacidade oxidante na membrana lipídica e nas proteínas celulares (Fox, 1993). Outros antimicrobianos como peptídeos e polipeptídeos também são produzidos por bactérias lácticas. O polipeptídeo nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e tem um amplo espectro de inibição contra bactérias Gram-positivas, incluindo muitos patógenos e pode prevenir o crescimento de esporos de *Bacillus* e *Clostridium* (Caplice e Fitzgerald, 1999). Várias outras bacteriocinas estão sendo estudadas: a pediocina produzida por algumas espécies de *Pediococcus* (Pucci et al., 1988), a sakacina elaborada por *Lactobacillus sake* (Schillenger e Lücke, 1989) e a enterocina produzida por *Enterococcus* spp. (Farias et al., 1994).

Conforme De Giori et al. (1983) a redução gradual na contagem de todos os grupos microbianos após 30 dias de maturação do queijo artesanal Tafi, elaborado por produtores rurais da província de Tucumán na Argentina, parece ser influenciada pelos metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas e componentes das células autolisadas. Também no queijo espanhol León o decréscimo das enterobactérias é devido a um aumento na acidez (Medina et al., 1995).

2.2.1.1. Gênero *Lactobacillus*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são proteolíticas, de modo que desempenham um papel importante na maturação de muitos queijos (Gomes e Bonassi, 1996; Desmazeaud, 1996), os quais são um meio ideal para o crescimento de lactobacilos mesófilos (Laleye et al., 1990; Peterson e Marshall, 1990; McSweeney et al., 1993). Muitas espécies têm sido isoladas de queijo, mas aquelas mais frequentemente encontradas são *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. brevis* (Beresford et al., 2001).

Nos queijos Feta e Teleme, 47,8% e 65,8%, respectivamente, dos lactobacilos isolados foram identificados como *Lb. plantarum* (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992). *Lb. plantarum* e *Lb. paracasei* corresponderam a 18,4% e 15,8%, respectivamente, da flora do queijo Kefalotyri maturado por quatro meses (Litopoulou-Tzanetaki, 1990). *Lb. plantarum*

(56,9%) e *Lb. paracasei* (37,2%) foram as principais espécies isoladas do queijo de leite de cabra Tenerife. *Lb. plantarum* esteve presente em alta proporção no queijo de dois dias, mas diminuiu durante a maturação, enquanto *Lb. paracasei*, inicialmente em baixa densidade, aumentou durante a maturação e foi a espécie de *Lactobacillus* dominante no 60^o dia de cura (Zarate et al., 1997). No queijo espanhol Majorero os principais componentes da flora após 90 dias de maturação foram os lactobacilos, sendo *Lb. casei* ssp. *casei* a espécie mais representativa, aproximadamente 36% dos lactobacilos isolados (Gómez et al., 1989).

Os lactobacilos requerem fatores de crescimento essenciais, tais como purinas, pirimidinas, vitaminas e aminoácidos. O leite possui suficiente fatores de crescimento, porém, a concentração de aminoácidos é muito baixa de forma que os lactobacilos geralmente não crescem bem nesse meio (Khalid e Marth, 1990; Cogan et al., 1997).

Crescem em associação com lactococos e leuconostoc e degradam a lactose residual produzindo lactato, compostos aromáticos (acetato, etanol, diacetila) e CO₂. Constituem a maioria de bactérias lácticas não iniciadoras encontradas em muitas variedades de queijos maturados, atingindo de 10⁶ a 10⁸ ufc/g dentro de poucas semanas após a fabricação. Ao contrário dos lactococos, são tolerantes ao sal e aos ácidos (López e Mayo, 1997).

A presença de lactobacilos não iniciadores nos queijos pode ocorrer devido à contaminação do leite durante fabricação, a partir do ar, dos materiais utilizados ou do ambiente das indústrias de laticínios, e também por estar naturalmente presente no leite (Litopoulou-Tzanetaki, 1990).

2.2.1.2. Gênero *Leuconostoc*

As bactérias do gênero *Leuconostoc* são as principais responsáveis pelo aroma em diversos produtos lácteos. Agem sobre o ácido cítrico e, com menor intensidade, sobre o ácido láctico, produzindo gás carbônico, ácidos acético e propiônico, álcool etílico, acetato de etila e diacetil. Destas substâncias, a mais importante é o diacetil, responsável pelo aroma suave e agradável em diversos produtos (Chaves et al., 1995).

Os leuconostoc crescem no leite em associação com os lactococos podendo degradar os carboidratos e gerar compostos aromáticos. As espécies *Leuconostoc cremoris* e *Leuconostoc dextranicum* são comumente conhecidas como fermentadoras de citrato, formando diacetil, além de vários outros metabólitos aromáticos (Nath, 1993).

A flora mais estável durante a maturação do queijo espanhol Cendrat del Montsec, elaborado com leite de cabra, foram os *Leuconostoc* spp., sendo os únicos microrganismos cuja contagem não sofreu variação ao longo do processo de cura (Mor-Mur et al., 1994). A

principal espécie de *Leuconostoc* encontrada no queijo espanhol La Serena, elaborado com leite cru de ovelha, foi *Leuconostoc mesenteroides* (Fernandez del Pozo et al., 1988).

2.2.1.3. Gênero *Enterococcus*

Os enterococos, que também são incluídos dentro das bactérias lácticas pela sua capacidade de fermentar a lactose e produzir ácido láctico, possuem certas diferenças que se traduzem em um interesse não somente tecnológico (algumas espécies são proteolíticas e/ou lipolíticas), como também higiênico-sanitário (podendo serem indicadores de contaminação fecal e possíveis patógenos) (Carrasco de Mendoza et al., 1992).

Os enterococos encontram-se entre os muitos contaminantes do leite e produtos lácteos. Durante muito tempo foram considerados indicadores das condições higiênicas durante a produção e processamento dos alimentos, sua presença na água e nos alimentos era um índice de contaminação fecal, assim como a presença de coliformes (Farias et al., 1994; Fox et al., 2000).

Atualmente se questiona se os enterococos podem realmente ser considerados indicadores de contaminação fecal, já que, por tratarem-se de organismos muito resistentes a condições adversas, como a temperatura, a atividade de água, o sal e a acidez, não se poderia relacionar claramente sua presença em um alimento com contaminação fecal. Para avaliar a importância e o significado da presença destes microrganismos num alimento, e sua repercussão na saúde, seria necessário considerar antes vários fatores como o tipo de produto, sua tecnologia de elaboração ou a concentração em que estão presentes (Tornadijo, 1995).

Na tecnologia queijeira os enterococos formam parte da flora microbiana normal dos queijos elaborados com leite cru, pelo qual sua presença tem começado a ser interpretada de modo diferente. Como a contaminação se produz de modo totalmente ao acaso, a concentração em que se encontram varia muito de um queijo para outro (Hernández et al., 1989). A presença de algumas espécies poderia ser inclusive desejável, já que possuem determinadas características que permitem sua utilização como cultivos iniciadores (Litopoulou-Tzanetaki et al., 1993; Menéndez et al., 1999).

Os enterococos tem capacidade de acidificar, de produzir compostos aromáticos, de degradar proteínas e lipídeos, de produzir substâncias antimicrobianas de natureza protéica (bacteriocinas) (Cogan et al., 1997), de estimular a produção de ácido por alguns lactococos e de favorecer o desenvolvimento e produção de gás pelos leuconostoc, devido a sua intensa atividade proteolítica (López-Díaz et al., 2000). Em geral, os enterococos produzem mais diacetila/acetoina e são mais proteolíticos que outros grupos de bactérias lácticas (Centeno et

al., 1996b). Além disso, são capazes de resistir a uma ampla faixa de temperatura e a altas concentrações salinas e ácidas (Medina et al., 1995).

A possibilidade de ocasionar deterioração nos alimentos está relacionada com a capacidade proteolítica que é evidente em cepas da espécie *Enterococcus faecalis* var. *liquefaciens*. Caso esta espécie esteja em proporção muito elevada o produto pode se deteriorar pela degradação das proteínas originando sabores amargos (Carrasco de Mendoza et al., 1992). *E. faecium* pode provocar alterações em produtos lácteos envasados, originando sabores ácidos e defeitos de textura. Além disso, algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* possuem, inclusive, atividade proteolítica em temperaturas de refrigeração (Wessels et al., 1990).

Ao final do período de maturação de 120 dias do queijo Kefalotyri, de um total de 76 isolados de bactérias lácticas, 40 (52,7%) foram identificados como enterococos (Litopoulou-Tzanetaki, 1990). Também no queijo grego Anthotyro os enterococos predominaram sobre as outras bactérias lácticas, representando 44,3% dos isolados, com *Enterococcus faecalis* sendo a espécie dominante (38,5%) (Vassiliadou et al., 1994). A contagem de *Enterococcus* spp. no queijo espanhol León permaneceu alta e constante (níveis de aproximadamente 10^5 ufc/g) desde a coalhada até o final da maturação de 3 meses, sugerindo que este grupo poderia ter algum efeito na maturação desse queijo (Medina et al., 1995).

É possível que os enterococos tenham um papel importante na maturação dos queijos e que também contribuam para o desenvolvimento das características organolépticas (Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 1992; Centeno et al., 1996b; Beresford et al., 2001). Em geral, os enterococos podem ser considerados como microflora secundária normal e, inclusive, desejável nos queijos (Devoyod e Desmazeaud, 1971).

2.2.1.4. Gênero *Lactococcus*

Os lactococos fermentam rapidamente a lactose e são responsáveis pelas mudanças que ocorrem nas etapas iniciais da maturação e que, direta ou indiretamente, vão influir no desenvolvimento do sabor e nas reações subseqüentes do processo de maturação (Gomes e Bonassi, 1996). O papel dos lactococos na hidrólise da caseína é escasso, no entanto, atacam os produtos derivados da ação da quimosina sobre a caseína, originando peptídeos e aminoácidos ao longo da maturação (Kaminogawa et al., 1986). Conforme Requena et al. (1991) a análise da atividade proteolítica dos isolados de *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum* mostrou que os do gênero *Lactococcus* apresentam uma atividade proteolítica em leite desnatado muito maior que a de lactobacilos. O *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* é

capaz de produzir CO₂ e diacetila a partir de citrato, sendo por isso responsável pelo aroma dos queijos (Fox, 1993).

Em praticamente todos os tipos de queijo se encontram as espécies *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *cremoris* e ambas são responsáveis pelo processo de acidificação (Collins, 1962). A produção de ácido láctico por certos lactococos é estimulada pela presença de enterococos, que ao terem uma atividade proteolítica intensa proporcionariam substâncias de crescimento para a flora láctica (Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 1992).

Os lactococos são amplamente utilizadas como cultura láctica na elaboração de queijos nacionais, entre eles o tipo Minas (Gomes e Bonassi, 1996).

No estudo microbiológico do queijo espanhol León, segundo Medina et al. (1995), o *Lc. lactis* ssp. *lactis* foi a espécie mais numerosa no leite (62,5% dos isolados), aumentando sua proporção na coalhada (82,5%) e após uma semana de maturação atingiu seu valor máximo (85% dos isolados). Enquanto que em outros tipos de queijos, como Tafi (De Giori et al., 1983), Feta e Teleme (Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis, 1992), foi observado um progressivo decréscimo de *Lc. lactis* ssp. *lactis* durante os primeiros estágios da maturação, provavelmente devido ao efeito inibitório do baixo pH e da alta concentração de NaCl (Medina et al., 1995).

Os lactococos foram os microrganismos mais numerosos durante todos os estágios da maturação do queijo espanhol artesanal Peñamellera, tanto na superfície como no interior do queijo, com crescimento paralelo ao das bactérias aeróbias mesofílicas. A maioria dos isolados foram classificados como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (Estepar et al., 1999). Nuñez (1978) observou que durante a elaboração e salga do queijo espanhol Cabrales foi considerável o crescimento de lactococos e, com a produção de ácido láctico e queda do pH, houve multiplicação de lactobacilos, micrococos, leuconostoc e leveduras no interior dos queijos.

2.2.2. *Micrococcaceae*

A família *Micrococcaceae* constitui outro grupo microbiano que normalmente é isolado dos queijos e fazem parte da flora secundária. Esta família compreende os gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*. Sua presença deve ser avaliada por duas razões, o aspecto higiênico-sanitário, já que algumas estirpes podem ser responsáveis pela produção de enterotoxinas em alimentos, e o aspecto tecnológico, pois possuem atividade proteolítica (com capacidade para atuar inclusive sobre a caseína) e lipolítica, contribuindo para o

desenvolvimento da textura e das propriedades organolépticas dos queijos. São mais proteolíticas que as bactérias lácticas (Bhowmik e Marth, 1990).

São microrganismos sensíveis aos baixos valores de pH, por isso a acidificação que se produz durante a elaboração e as etapas iniciais da maturação dos queijos contribui para o controle do seu crescimento e, uma vez que suas lipases e proteases atuam em pHs alcalinos, também a ação das enzimas é inibida. Porém, quando as condições do meio se tornam mais alcalinas, a contagem de *Micrococcaceae* podem aumentar (Nuñez, 1978). Por outro lado, são microrganismos resistentes às altas concentrações de sal, crescendo na presença de 7,5% de NaCl, apesar de que os pHs ácidos podem aumentar a sensibilidade ao sal. A redução da a_w que ocorre com a maturação não influi no metabolismo desse grupo de microrganismos, já que alguns podem crescer e, inclusive, produzir toxinas, em valores de a_w de 0,90 ou 0,88 (Bhowmik e Marth, 1990).

A fonte primária de micrococos em leite e queijo é o úbere dos animais. Estão presentes em grande quantidade em queijo produzido de leite cru. Porém, já foi verificado sua presença em queijo elaborado com leite pasteurizado, uma vez que alguns são termodúricos (Fox, 1993).

2.2.3. Bolores

Os fungos filamentosos são quase sempre aeróbios estritos, por isso desenvolvem-se na superfície dos alimentos ou onde haja a presença do ar (Siqueira, 1995). Nos queijos crescem na superfície externa afetando a aparência, a consistência e o sabor. Causam uma série de problemas, como proteólise da casca em alguns tipos de queijos semiduros, aparecimento de manchas de cores variadas, produção de micotoxinas e modificação do sabor na região periférica. Os gêneros de mofos que normalmente crescem na superfície de queijos são: *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Monillia* e *Geotrichum* (Furtado, 1999).

As espécies de *Penicillium* são os principais contaminantes de produtos lácteos fermentados, tais como os queijos ao longo da maturação e estocagem. Muitas investigações tem mostrado que *Penicillium* spp. são os contaminantes predominantes desse produto, seguidos por espécies de *Aspergillus* (Scott, 1989).

Ainda que o queijo seja um excelente substrato para o crescimento dos bolores não é para a produção de micotoxinas (Bullerman, 1981; Scott, 1989). Os reduzidos níveis de micotoxinas detectados no queijo podem ser devido a que certas micotoxinas são menos estáveis em produtos com elevado conteúdo protéico e baixo em carboidratos (Lieu e Bullerman, 1977). Este fenômeno é atribuído a combinação das toxinas com aminoácidos e

compostos que contêm grupos sulfidríla, reduzindo assim sua atividade biológica (Bullerman, 1981). Além disso, vários trabalhos têm demonstrado o potencial antifúngico e antimicotoxigênico de bactérias lácticas, devido, provavelmente, à produção de metabólitos de natureza protéica que podem interferir na biossíntese de micotoxinas (Gourama e Bullerman, 1995a; Gourama e Bullerman, 1995b; Gourama, 1997).

Os mofos são incluídos no grupo dos microrganismos mesófilos. O ótimo crescimento se encontra entre os 20-25^oC. Nas temperaturas de refrigeração crescem quase que exclusivamente espécies de *Penicillium*. No caso de outros mofos, como *Aspergillus*, pode-se prevenir o crescimento a temperaturas inferiores a 5^oC (Bullerman, 1981).

Os bolores são os microrganismos mais lipolíticos dos queijos (Nath, 1993).

Apesar dos bolores causarem inúmeros defeitos, há algumas espécies que são importantes em certos tipos de queijos, principalmente o gênero *Penicillium* (Dumais et al., 1985). Um deles é o *Penicillium camemberti*, cuja ação proteolítica é responsável pela peptonização e conseqüente produção do sabor típico dos queijos Camembert e Brie (Fox e McSweeney, 1996); o outro é o *Penicillium roqueforti*, cuja ação lipolítica é responsável pela decomposição da gordura do leite dando origem ao sabor e aroma típico dos queijos Roquefort, Gorgonzola e Danish blue (Fox, 1993).

2.2.4. Leveduras

Constituem também parte da microflora normal dos queijos elaborados com leite cru. As leveduras geralmente crescem tanto na presença como em ausência de oxigênio, porém multiplicam-se com maior rapidez e constituem populações mais elevadas na presença deste ar (Elliott et al., 1982). A temperatura ótima de crescimento desse grupo de microrganismos é entre 25 – 28^oC (Vivier et al., 1994).

A ocorrência de leveduras em produtos lácteos é relevante porque, enquanto algumas podem causar deterioração e o desenvolvimento de defeitos no sabor e aroma, a maioria são cruciais para a formação de um sabor completo em alguns tipos de queijos (Scott, 1991).

As leveduras que assimilam lactose contribuem, juntamente com as bactérias lácticas, para o decréscimo do pH que ocorre nas etapas iniciais da maturação. Aquelas leveduras que, além disso, têm capacidade fermentativa hidrolisam a lactose formando etanol e CO₂ e, a partir do etanol, dão origem aos ésteres de ácidos graxos que são responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e aroma em determinados tipos de queijos (Dumais et al., 1985). Algumas leveduras são capazes de sintetizar enzimas lipolíticas e proteolíticas que podem eventualmente contribuir para o desenvolvimento do aroma, sabor e textura durante a

maturação (Macedo et al., 1995; Roostita e Fleet, 1996). Porém sua principal contribuição é a utilização do ácido lático como uma fonte de carbono, reduzindo então a acidez e contribuindo para o aumento do pH que se observa nas etapas finais da maturação na maioria das variedades de queijos, permitindo com isso o crescimento de microrganismos que não são resistentes à ambientes ácidos, como por exemplo, os micrococcos (Fernandez del Pozo et al., 1988), possibilitando, então, o início do segundo estágio de maturação (Macedo et al., 1995).

Vivier et al. (1994) estudou o efeito de vários parâmetros, pH, concentração de NaCl e a_w , sobre o crescimento das leveduras; concluiu que, enquanto o pH praticamente não afeta o crescimento, já que crescem numa faixa ampla entre 2,5 a 8 (ainda que seu pH ótimo esteja entre 3,5 e 6,5), aumentos na concentração de NaCl e diminuição da a_w provocavam decréscimos lineares na população de leveduras.

Quando a salga é efetuada a seco, a população de leveduras se mantém mais estável no centro do queijo que na superfície, já que o sal penetra gradualmente no interior, onde seu efeito é menos intenso que na superfície (Fox, 1993).

2.2.5. Colifomes

A contagem desse grupo deve ser avaliada por duas razões, o aspecto higiênico-sanitário e o aspecto tecnológico, na prevenção de defeitos no aroma e textura; sendo indesejável sua presença em número elevado (Lück e Dunkeld, 1981).

Os coliformes são um dos grupos microbianos mais importantes no leite cru. Sua enumeração é empregada como índice do grau de higiene. A presença em número elevado indicaria, em cada caso: métodos de ordenha e/ou fabricação pouco higiênicos, inadequada pasteurização do leite ou contaminação pós-pasteurização. Nos queijos elaborados com leite cru costuma-se isolar um número elevado de coliformes, devido a deficiências de higiene durante a ordenha e posterior manipulação (Gaya et al., 1983; Tornadijo et al., 2001).

Além de representar um risco para a saúde, algumas espécies podem causar problemas tecnológicos. O estufamento precoce é um dos maiores problemas nos queijos, ocorre quando há uma forte produção de gás no interior. Ao corte, observa-se uma massa repleta de pequenos olhos arredondados ou irregulares ou até mesmo bolhas na casca. O sabor e o aroma também ficam anormais. O problema é causado pela presença, em grande número, de bactérias do grupo coliforme, principalmente, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia coli*, as quais fermentam a lactose, produzindo CO_2 , sendo que a primeira é muito mais danosa, pois produz mais CO_2 do que a *E. coli* (Furtado, 1990).

Os valores de pH e de acidez titulável do leite influem na população de coliformes (Gaya et al., 1987). Na fabricação de queijos o emprego de cultivos iniciadores adequados tem um importante papel no controle destes microrganismos, através da produção de ácido láctico e conseqüente declínio do pH e, possivelmente, também pela produção de alguma substância com capacidade inibitória sobre o crescimento (Hargrove et al., 1969). Furtado et al. (1980) em estudo comparativo de fabricação de queijo Minas Frescal, com e sem adição de cultura láctica, observaram que a não adição desse fermento pode aumentar os casos de estufamento precoce do produto, pois as bactérias do fermento desempenham um papel antagonista importante aos microrganismos causadores deste defeito, pelo consumo de lactose e pelo abaixamento do pH, devido à produção de ácido láctico.

A evolução deste grupo microbiano é determinada pelos níveis iniciais no leite, pelas características dos queijos e pelas condições de maturação. Apesar de algumas espécies serem relativamente ácido-tolerantes, a maioria desaparece nas etapas iniciais da maturação dos queijos. Além disso, apresentam pouca resistência a baixos valores de a_w e o efeito combinado de vários fatores de inibição repercutem de modo eficaz no controle deste grupo microbiano e determinam sua progressiva diminuição ao longo da maturação do queijo (Gaya et al., 1983; Fontán et al., 2001).

2.2.5.1. Coliformes Fecais

Atualmente sabe-se que o grupo dos coliformes fecais inclui pelo menos três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, dos quais os dois últimos incluem cepas de origem não fecal. Por esse motivo, a presença de coliformes fecais em alimentos é menos representativa, como indicação de contaminação fecal, do que a enumeração direta de *E. coli*. Porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais, dada a alta incidência de *E. coli* dentro do grupo fecal (Silva et al., 1997).

2.2.6. Bactérias psicrotóxicas

Os microrganismos psicrotóxicos são aqueles capazes de crescerem em temperaturas de refrigeração, independente da sua temperatura ótima de crescimento. Além de aumentarem sua população em temperaturas consideradas eficientes para a conservação de alimentos, estas bactérias alteram produtos, como leite e queijo, por produzirem enzimas lipolíticas e

proteolíticas termorresistentes capazes de degradar as proteínas e gorduras do leite e de produtos lácteos, produzindo características indesejáveis. A maioria das bactérias deteriorantes encontra-se dentro desta categoria. O aparecimento de cheiro e gosto estragados e defeitos físicos dependem largamente do nível e características bioquímicas das espécies microbianas (Santos et al., 1999).

A enumeração de bactérias psicotróficas é muito importante quando os queijos são mantidos a temperatura de refrigeração, pois sua presença, particularmente em grande número, em torno de 10^7 ufc/g, indica um grande potencial de degradação durante o armazenamento (Bishop e White, 1986).

Consiste basicamente em bactérias Gram-negativas, sendo que o gênero *Pseudomonas* é o mais prejudicial. Suas proteases podem degradar parcialmente as β e κ -caseínas e hidrolisar outras proteínas, durante a maturação, liberando peptídeos de baixo peso molecular, responsáveis pelo surgimento de sabor amargo. As lipases hidrolisam a gordura liberando ácidos graxos que causam o defeito conhecido como rancidez e formação, principalmente, de ácido butírico, que confere gosto de sabão ao queijo (Furtado, 1999).

Champagne et al. (1990) estudaram o efeito do nível de inóculo de bactérias lácticas e do pH sobre o crescimento de bactérias psicotróficas e verificou que, para serem efetivas, as bactérias lácticas devem ser inoculadas em níveis superiores a $2,5 \times 10^6$ ufc/mL e a acidificação do meio não produz um efeito significativo sobre o crescimento de psicotróficos.

2.3. Defeitos de origem microbiana do queijo

As transformações indesejáveis, produzidas geralmente por microrganismos contaminantes que podem estar no leite ou atingirem os queijos durante a fabricação, devem ser evitadas. No queijo maturado a lactose já foi consumida pela cultura láctica e não se encontra disponível para os microrganismos alterantes que podem estar presentes. Isto limita a alteração do queijo maturado a microrganismos que podem oxidar o lactato ou utilizar produtos das degradações protéicas. Neste grupo se incluem as leveduras, os mofos e certos tipos de bactérias anaeróbias formadoras de esporos, tais como os *Clostridium* spp.. As condições essencialmente anaeróbias que prevalecem no interior de todos os queijos limitam a atividade das leveduras oxidativas e dos mofos à superfície (Chapman e Sharpe, 1987).

Muitos microrganismos indesejáveis que podem provocar sérios defeitos nos queijos são sensíveis a moderadas concentrações de sal. Além disso, o estufamento de queijos, pode ser eficientemente controlado através do uso adequado de culturas lácticas, mesmo em queijos de leite cru. A acidificação normal produzida pela cultura láctica, reduz o pH do queijo a

valores inferiores a 5,6, acidez esta suficiente para inibir a germinação dos esporos de *Clostridium* no queijo (Furtado, 1990).

2.4. Evolução de alguns parâmetros físico-químicos e composicionais do queijo durante a maturação

2.4.1. pH e acidez titulável

As transformações que ocorrem na coalhada e no queijo estão condicionadas ao pH e à acidez. O pH interfere na regulação do desenvolvimento dos microrganismos importantes para o processo e na produção e atividade das enzimas responsáveis pela maturação (Fox et al., 1990). Em geral, pHs inferiores a 4,5 reduzem notavelmente a atividade de muitas delas, como, por exemplo, as proteases, que apresentam um máximo de atividade a pHs compreendidos entre 5,5 e 6,5. O pH também influencia no sabor e na textura, determinada fundamentalmente pelo grau de proteólise (Fox, 1993).

Normalmente, ao final da dessoragem a coalhada apresenta valores de pH entre 4,5 e 5,3, porém, sua evolução durante a maturação é diferente para cada tipo de queijo e constitui um reflexo das transformações que tenham sido produzidas (Fleet, 1999; Beresford et al., 2001).

2.4.2. Atividade de Água e Umidade

A atividade de água (a_w) é diretamente proporcional ao conteúdo de umidade do queijo (Marcos et al., 1981).

Constitui-se num fator determinante do crescimento microbiano, das transformações químicas e enzimáticas e contribui para o desenvolvimento das características organolépticas e reológicas do queijo. Todos os microrganismos necessitam de água, portanto uma das maneiras mais eficientes para controle da atividade metabólica e multiplicação é reduzir a sua disponibilidade, seja por desidratação ou adição de algum componente solúvel em água, tais como, o sal e outros componentes de baixo peso molecular (ácidos orgânicos) (Beresford et al., 2001). Os processos de dessoragem, de salga e a evaporação da água da superfície do queijo no transcorrer da maturação influem na evolução da a_w (Scott, 1991).

As proteínas do queijo estão hidratadas de forma que a água ligada não está disponível para o crescimento microbiano. Além disso, as reações bioquímicas, fundamentalmente hidrolíticas, causam uma diminuição da água livre. A hidrólise das proteínas a peptídeos e

aminoácidos e dos lipídeos a glicerol e ácidos graxos durante a maturação reduzem a disponibilidade de água, uma vez que uma molécula é adicionada a cada ligação peptídica ou éster hidrolisada (Fox et al., 2000).

A umidade do queijo influi na consistência e regula indiretamente o curso da maturação. A intensidade da desidratação dependerá do tamanho e forma do queijo, assim como das condições ambientais em que se realiza a maturação (Beresford et al., 2001).

2.4.3. Concentração de sal

O sal e a a_w estão muito interrelacionados e a sua capacidade inibitória sobre os microrganismos reflete essencialmente o efeito desse em reduzir a a_w (Beresford et al., 2001). A concentração de sal dissolvido na umidade do queijo (sal/umidade), ao invés do teor total, é que influencia a extensão com que a microflora "starter" e secundária serão lisadas, crescerão e produzirão enzimas; bem como a velocidade de degradação da lactose (Grappin e Beuvier, 1997).

2.4.4. Degradação da lactose

A primeira fase de maturação em todos os tipos de queijo é a fermentação da lactose residual que permanece na fase aquosa da coalhada. De modo que esta praticamente desaparece após mais ou menos 10 dias, afetando principalmente o sabor (Wegner, 1987) e baixando o pH para 5,5-5,0 (Yúfera, 1998). Um excesso na produção de ácido láctico pode conduzir a um sabor muito ácido no queijo (Casagrande e Pombo, 1988).

A fermentação da lactose com formação de ácido láctico por bactérias lácticas é uma reação primária fundamental na fabricação de todas variedades de queijos. A maior parte da lactose do leite, em torno de 96%, é solubilizada e drenada com o soro e, ainda que fique retida uma pequena proporção, sua degradação pela flora láctica é uma reação essencial que afeta a sinérese, retenção de cálcio, atividade das enzimas coagulantes e crescimento da flora contaminante (Fox et al., 2000).

A velocidade de metabolização da lactose residual é função da porcentagem de sal/umidade no queijo, da temperatura e dos microrganismos. Com altas concentrações de sal/umidade, em torno de 6%, e se o número de bactérias lácticas presentes é baixo a lactose residual é consumida muito lentamente (Fox et al., 1990).

O ácido láctico produzido pela fermentação da lactose é também alvo de modificações. Normalmente, este se combina com cálcio no soro para formar lactato. Além disso, o ácido

lático ou seus lactatos podem ser decompostos por fermentação através de bactérias ácido propiônicas, nos queijos suíços, com a produção de ácido propiônico, ácido acético e CO₂, que são responsáveis pela formação de olhaduras e contribuem para o aparecimento de aromas específicos. Nos queijos maturados por bolores o ácido lático é transformado em CO₂ e H₂O, ocasionando um incremento no pH na parte externa, após a metabolização completa do ácido esses microrganismos começam a utilizar as proteínas produzindo amoníaco, que se difunde até o interior, e provoca um aumento do pH (Fox, 1993). Também podem servir como substrato para a fermentação butírica, especialmente pelo *Clostridium tyrobutyricum*, na qual a formação de ácidos acético e butírico, CO₂ e hidrogênio pode afetar o aroma de queijos e causar estufamento (Furtado, 1999).

2.4.5. Degradação das proteínas

A proteólise consiste na degradação parcial das proteínas em produtos solúveis mais simples, como peptonas, peptídeos, aminoácidos, etc. (Scott, 1991). É o mais complexo dos três eventos primários durante a maturação, além de ser provavelmente o mais importante para o desenvolvimento do sabor, aroma e textura dos queijos (Fox, 1993). Não é um fenômeno simples, considerando a natureza complexa das proteínas do leite, a variedade de sua flora e o grande número de enzimas proteolíticas envolvidas nesta degradação (Fox e McSweeney, 1996).

São responsáveis por esta atividade as proteases do leite e as proteases dos microrganismos do leite e da cultura lática. Além disso, a renina atua sobre outras proteínas do leite, além da caseína, esta atividade secundária da enzima começa lentamente após a coagulação e continua durante o processo de maturação (Fox e McSweeney, 1996). O desdobramento das proteínas pela ação das enzimas proteolíticas ocorre mais lentamente que a fermentação da lactose (Bhowmik e Marth, 1990).

A degradação das proteínas, segundo Fox e McSweeney (1996), produz mudanças na textura dos queijos, originadas:

- pela ruptura das cadeias protéicas;
- pela diminuição da a_w por causa da água que interage com os grupos carboxila e amino liberados;
- pelo aumento no pH devido à produção de NH₃ pela desaminação dos aminoácidos livres.

As diferentes frações nitrogenadas que aparecem durante a maturação constituem um perfil diferente e característico para cada variedade de queijo, que está condicionado ao

método de elaboração, as diferenças ambientais a que são submetidos durante a maturação e a diversidade dos agentes implicados na mesma (Fox et al., 2000).

2.4.6. Degradação da gordura

A degradação da fração lipídica do queijo se produz fundamentalmente pela ação de lipases, que transformam os triglicerídeos em glicerídeos parciais e ácidos graxos livres. O grau de lipólise varia enormemente nas diferentes variedades de queijos (Dilanjan, 1984). A maioria, exceto aqueles elaborados com leite de cabra e os maturados por bolores, sofrem relativamente pouca lipólise (Fox, 1993).

O desdobramento da gordura é tão lento quanto o das proteínas, porém bem mais específico, desenvolvendo o sabor e o aroma característicos a certos tipos de queijos e não causando alterações significativas na consistência dos mesmos (Bhowmik e Marth, 1990). Como os principais produtos gerados são ácidos graxos voláteis de cadeia curta, a lipólise contribui para os aromas fortes de alguns queijos (Yúfera, 1998).

Estes ácidos graxos liberados podem permanecer no queijo como tais ou serem transformados em compostos como cetonas ou álcoois, que são elementos importantes no desenvolvimento de aromas típicos (Nath, 1993).

A lipólise é devido à atividade de lipases naturais do leite e, principalmente, dos microrganismos que compõem a flora microbiana dos queijos (Bhowmik e Marth, 1990). Muitos microrganismos podem excretar lipases, mas a quantidade varia significativamente dependendo da espécie. Os fungos filamentosos produzem as maiores quantidades, enquanto que as bactérias lácticas são geralmente pouco lipolíticas (Nath, 1993). Uma fonte importante de lipases ativas no leite e no queijo são as bactérias psicrotóxicas mas não são consideradas muito importantes a menos que seus números excedam 10^7 ufc/g (Fox et al., 2000).

3. Materiais e Métodos

3.1 Caracterização da produção do Queijo Serrano

Os Queijos Serranos, estudados nesse trabalho de pesquisa, são elaborados por produtores rurais de Caxias do Sul, que fazem parte do Programa da Agroindústria Familiar da Secretaria da Agricultura e Abastecimento do Estado do Rio Grande do Sul. Estes produtores possuem uma estrutura de trabalho e assistência constante, de forma que sua produção não é tão rudimentar quanto a grande maioria dos queijos artesanais.

Todos eles possuem uma queijaria com três salas (vestiário, sala de manufatura e sala de maturação), totalmente de alvenaria, paredes revestidas com azulejo até o teto e piso com lajota.

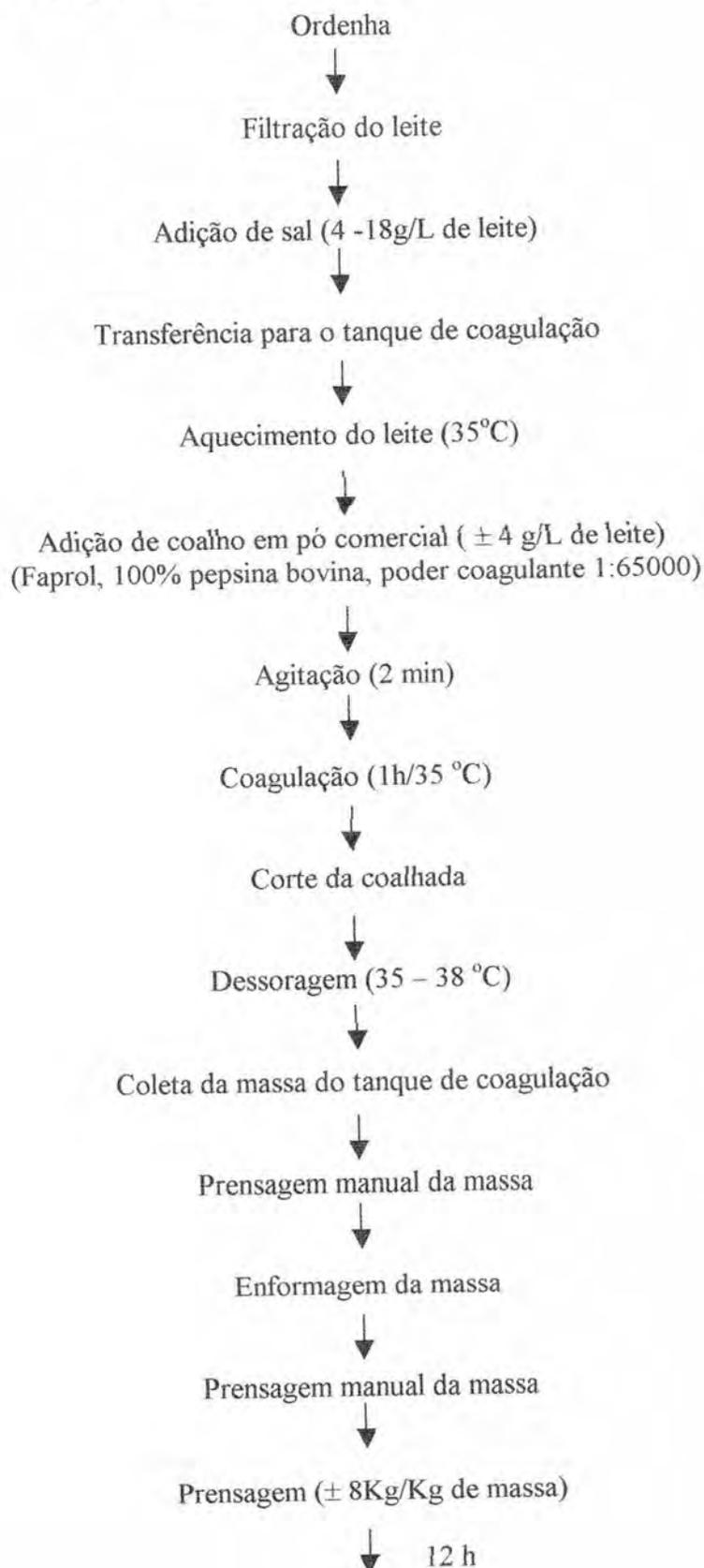
Os equipamentos (tanque de coagulação, prensa, pia e mesa auxiliar) são de aço inox e as formas dos queijos são de plástico. Além disso, vários produtores possuem ordenha mecânica.

Periodicamente a Secretaria Municipal da Agricultura de Caxias do Sul realiza encontros com os produtores, onde são discutidos vários assuntos de interesse deles, mas, principalmente, os procedimentos de Boas Práticas de Fabricação (BPF); de forma que eles possuem conhecimentos sobre a necessidade de hábitos de higiene e limpeza na produção de seus queijos.

O Queijo Serrano é elaborado na Serra Gaúcha, a 950 m acima do nível do mar, numa zona fria e úmida. A temperatura e a umidade relativa de maturação dependem da estação do ano em que os queijos foram processados. Conforme a média dos últimos dez anos, no verão estas variam, respectivamente, de 20 a 22^oC e de 74 a 79% e no inverno de 10 a 13^oC e de 78 a 82% (FEPAGRO, 2001).

3.3.1. Esquema de elaboração do Queijo Serrano

O Queijo Serrano é elaborado com leite cru inteiro de vaca sem a adição de cultura iniciadora, conforme fluxograma abaixo.



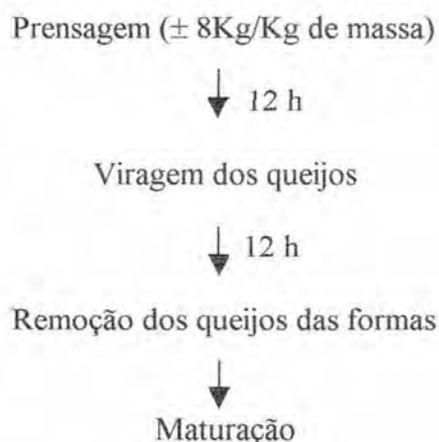


FIGURA 3 : Esquema simplificado de fabricação artesanal do Queijo Serrano

Durante a maturação os queijos são virados diariamente e lavados com água morna quando necessário.

Os Queijos Serranos foram maturados sob condições ambientais. No apêndice 2 estão os dados de temperatura e umidade relativa ao longo dos períodos de coleta dos queijos.

O produto final após 30-60 dias de maturação tinha uma forma cilíndrica com um diâmetro de 14 a 17 cm, uma altura de 4 a 7 cm e um peso de 0,8 a 1,2 Kg; sua casca era fina, uniforme e lisa, com uma cor amarelo palha e a massa do queijo tinha uma textura macia, cor amarelo clara e bastante olhaduras.

3.4. Coleta das amostras

Para cada batelada foram coletadas uma amostra de coalhada e de queijos (cada amostra consistindo de um queijo inteiro) com 7, 14, 28, 42 e 60 dias de maturação bem como uma amostra do leite utilizado.

As amostras de leite foram coletadas em garrafas de vidro estéreis, com capacidade para 600 mL, com o auxílio de uma concha inox estéril, logo após a ordenha diretamente dos tarros de leite, previamente homogeneizados.

As amostras de coalhada foram coletadas, no momento em que a massa estava sendo colocada nas formas, com o auxílio de uma colher de inox estéril, em garrafas de vidro estéreis, previamente identificadas.

As amostras de queijos foram colocadas em sacos plásticos esteréis que foram em seguida selados e identificados.

Todas as amostras foram acondicionadas em banho de gelo em recipiente isotérmico, imediatamente após a coleta, e transportadas para o laboratório, sob temperatura de

3.5. Análises Microbiológicas

3.5.1. Instalações

As análises microbiológicas dos Queijos Serranos foram realizadas no Bioteclab (Laboratório de Biotecnologia) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS).

3.5.2. Material de Laboratório

Os meios de cultura utilizados foram da Oxoid (Inglaterra) e os reagentes da Merck (Alemanha), Nuclear (Brasil) ou Synth (Brasil). Todos os meios de cultura, soluções, vidrarias, ponteiros e materiais diversos foram esterilizados por calor úmido em uma autoclave vertical da Phoenix Equipamentos modelo AV 75.

A formulação e o procedimento de elaboração dos meios de cultura e das soluções estão descritos no apêndice 4.

3.5.3. Homogeneização das Amostras e Preparação das Diluições

3.5.3.1. Leite

A garrafa com o leite foi invertida 25 vezes. Em seguida, pesou-se, assepticamente, 10g de amostra em um frasco contendo 90 mL de água peptonada 0,1% estéril, obtendo-se dessa maneira a diluição 1/10, a partir da qual preparou-se as diluições decimais subseqüentes também com água peptonada 0,1% estéril, que foram plaqueadas em duplicata em uma variedade de meios de cultura, como segue.

3.5.3.2. Coalhada e Queijo

A amostra de queijo foi colocada sob uma forma de vidro refratária estéril no interior da câmara de fluxo laminar (Trox-modelo FLV/Brasil ou LabConco modelo Purifier Clean Bench/Brasil).

Retirou-se quatro setores opostos do queijo, por meio de dois cortes radiais a partir do centro, com o auxílio de faca e garfo de inox estéreis (FIL-IDF 50B: 1985). Após removeu-se a casca, de aproximadamente 1 cm de largura, desses pedaços e então procedeu-se a etapa de pesagem (Marte modelo AL500 ou AM5500/Brasil), assepticamente, de uma amostra de 25g

em sacos plásticos especiais para homogeneizador tipo “stomacher” (Interscience BagSystem modelo L / França) .

A amostra de coalhada foi homogeneizada, com o auxílio de uma colher inox estéril, na própria garrafa de vidro em que foi transportada, e em seguida pesou-se 25g, sob condições assépticas.

Após a pesagem, em ambos os casos, adicionou-se 225 mL de citrato de sódio tribásico 2% estéril, previamente aquecido a 40-45^oC, e homogeneizou-se por 1 min no “stomacher” (Seward Medical modelo 400/Inglaterra) em velocidade normal.

Obteve-se assim a diluição 1/10, a partir da qual preparou-se as diluições decimais sucessivas com água peptonada 0,1% estéril, que foram plaqueadas em duplicata em uma variedade de meios de cultura, como segue.

3.5.4. Contagem dos diferentes grupos microbianos

3.5.4.1. Contagem Total de Aeróbios Mesófilos

Para essa contagem utilizou-se o Ágar Padrão para Contagem (PCA).

Esse é descrito como o meio de cultura isento de substâncias inibidoras e padrão para a contagem total de microrganismos heterótrofos aeróbios e anaeróbios facultativos em água, leite e produtos lácteos e outros alimentos (Oxoid, 1995).

Pipetou-se, assepticamente, alíquotas de 1mL das diluições selecionadas, em duplicata, para placas de petri, seguidas de aproximadamente 20mL do meio de cultura, previamente fundido e resfriado a 45^oC. Após misturar homogeneamente o ágar e o inóculo deixou-se solidificar e incubou-se as placas invertidas a 32^oC durante 48 horas (APHA, 1993).

3.5.4.2. Contagem Total de Aeróbios Psicrotróficos

Contou-se esse grupo microbiano também em Ágar Padrão para Contagem, porém inoculou-se pelo método de semeadura em superfície (“spread plate”), que foi previamente secada antes da semeadura.

Embora o método de plaqueamento em profundidade possa ser utilizado para a contagem total de aeróbios psicrotróficos, recomenda-se que este grupo seja enumerado pelo método de plaqueamento em superfície (Silva et al., 1997). Bactérias psicrotróficas são facilmente injuradas ou mortas quando as placas são preenchidas com ágar acima de 44-46^oC. Mesmo nessa faixa algumas células morrerão, portanto, como uma alternativa, o

inibidoras

“spread plate” pode ser usado (APHA, 1976). Este cuidado evita a exposição das células ao calor do ágar fundido, benéfico para os psicrotróficos (sensíveis às altas temperaturas) (Silva et al., 1997).

Inoculou-se em duplicata 0,1 mL de cada diluição, que foi espalhada na superfície com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 7^oC em uma geladeira (Consul modelo Pratices 240/ Brasil) por 10 dias (APHA, 1993).

3.5.4.3. Contagem de Proteolíticos

Essa contagem foi realizada em Ágar Leite.

Este é um meio nutritivo enriquecido com sólidos de leite para a determinação da microflora proteolítica de produtos lácteos (Oxoid, 1995). Colônias de bactérias proteolíticas serão rodeadas por uma zona clara como resultado da conversão da caseína em compostos nitrogenados solúveis. Porém, zonas claras em ágar leite podem ser produzidas por bactérias que produzem ácido a partir de carboidratos fermentescíveis do meio. A fim de confirmar se os halos são produzidos por proteólise ou pela formação de ácidos adiciona-se sobre o meio solução de HCl que atua como precipitante químico das proteínas. A zona clara no ágar leite indica somente a completa quebra da caseína, uma vez que os estágios iniciais de proteólise não podem ser detectados contra o fundo opaco (APHA, 1976).

Inoculou-se na superfície de placas de ágar leite, previamente secadas, 0,1 mL das diluições e espalhou-se com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 32^oC durante 72 horas. Após esse período adicionou-se sobre o meio de cultura HCl 1%, em quantidade suficiente para cobrir toda a superfície da placa, por 1min. Retirou-se o excesso da solução ácida e contou-se as colônias rodeadas por zonas claras (APHA, 1993).

3.5.4.4. Contagem de Lipolíticos

Essa análise foi realizada em ágar tributirina.

Como substância reagente este meio contém a tributirina, que é o substrato de escolha para a contagem de microrganismos lipolíticos de importância potencial em alimentos. A degradação desse ácido graxo sintético é reconhecida pela formação de halos claros ao redor das colônias lipolíticas em contraste com o restante do meio de cultura que permanece turvo (APHA, 1993).

Espalhou-se com o auxílio de uma alça de Drigalski 0,1mL da diluição desejada sobre a superfície do meio solidificado e previamente secado. As placas foram incubadas invertidas

a 32^oC por 72 horas. Após esse período contou-se as colônias rodeadas por um halo transparente.

Das placas de petri da diluição contável dos queijos, com 60 dias de maturação no verão, isolou-se as bactérias que apresentaram halos de hidrólise da tributirina, ou seja, as que tinham atividade lipolítica com o objetivo de explorar a capacidade de produção de lipases desses microrganismos (Lima et al., 2001).

3.5.4.5. Contagem de Bactérias Lácticas

A contagem de bactérias lácticas em alimentos é baseada principalmente na seleção de condições ótimas para o seu crescimento (condições microaerófilas e meios enriquecidos, para atender às altas exigências nutricionais), havendo pouca ênfase na criação de condições seletivas, uma vez que, nos alimentos onde sua enumeração é relevante, a microbiota competidora restringe-se quase que exclusivamente aos bolores e leveduras (Silva et al., 1997).

Nesse trabalho utilizou-se os seguintes meios de cultura para crescimento e isolamento de bactérias lácticas:

- Ágar M17 (Contagem de lactococos)

O ágar M17 é uma modificação da fórmula descrita por Terzagui e Sandine (1975) recomendado como meio melhorado para o desenvolvimento e quantificação de estreptococos lácticos e seus bacteriófagos. É um meio eletivo que se emprega para a contagem e o isolamento de lactococos. Apesar deste meio não ser seletivo, é usado para contar lactococos em queijo porque estas bactérias excedem em número todos os outros microrganismos, especialmente durante os estágios iniciais da maturação; à medida que o queijo matura, o meio torna-se menos seletivo, pois essa população tende a diminuir (Fox et al., 2000).

Trata-se de um meio muito rico que permite o crescimento destes microrganismos, alguns dos quais com complexas exigências nutricionais. Os estreptococos lácticos são muito exigentes em substâncias nutritivas e precisam meios complexos para um desenvolvimento ótimo. Seu metabolismo homofermentativo produtor de ácidos exige que o meio esteja bem tamponado para manter o pH acima de 5,7 durante seu crescimento ativo. Esta manutenção do pH é importante, já que um pH inferior pode prejudicar e reduzir sua viabilidade. Entre os componentes do meio se encontram a lactose (5%) e o glicerofosfato de sódio (19%) que permite aumentar a capacidade tamponante do meio e manter o pH acima de 5,7 (Oxoid, 1995).

Para a contagem de lactococos, adicionou-se 1mL de cada diluição, em duplicata, em placas de petri seguida do meio de cultura, previamente fundido e resfriado a 45^oC. Após misturar homogeneamente o ágar e o inóculo deixou-se solidificar e colocou-se uma cobertura de aproximadamente 3-4 mL (sobrecamada) de M17. As placas foram incubadas a 30^oC durante 72 horas.

- Ágar ROGOSA (Contagem de Lactobacilos)

Este meio é empregado para o isolamento e determinação do número de lactobacilos da flora bucal e intestinal, assim como em carne, leite, produtos lácteos e outros alimentos (Rogosa et al., 1951).

Devido a elevada concentração de acetato (1,7%) e ao baixo valor do pH (aproximadamente 5,4), pela adição de ácido acético glacial, o crescimento da flora acompanhante indesejável é notavelmente suprimido. Ainda que seja um meio bastante seletivo, pode permitir o crescimento de pediococos e alguns leuconostoc. Por outro lado, as concentrações apropriadas de manganês, magnésio e ferro e a atmosfera rica em CO₂ estimulam o crescimento ótimo dos lactobacilos (Oxoid, 1995).

De cada diluição inoculou-se, em duplicata, 1 mL, misturando uniformemente com o meio de cultura. Após a solidificação adicionou-se uma cobertura do mesmo meio para favorecer o crescimento dos lactobacilos (microaerófilos). Em seguida transferiu-se as placas de petri invertidas para jarras de anaerobiose (Oxoid/Inglaterra e Systems/Brasil), onde foi colocado um envelope de Anaerocult A (Merck/ Alemanha) que gera uma atmosfera rica em CO₂, confirmada com uma fita indicadora de anaerobiose Anaerotest (Merck/ Alemanha), previamente umidificada. As placas foram incubadas a 30^oC durante 5 dias (Sharpe, 1960).

3.5.4.5.1. Isolamento e Identificação das Bactérias Lácticas

Os gêneros que se incluem dentro das bactérias lácticas possuem muitas características comuns e por isso é difícil a escolha de um meio adequado para a contagem e o isolamento de cada gênero separadamente (Reuter, 1985).

Para as etapas de purificação e para as provas de identificação das bactérias lácticas utilizou-se o caldo e o ágar de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (de Man et al., 1960). É um meio não seletivo para o crescimento abundante de bactérias lácticas. Em sua formulação contém polisorbato e acetato de magnésio e manganês, substâncias conhecidas como fatores estimulantes do crescimento de lactobacilos, assim como uma base nutritiva rica e abundante.

Em virtude da pouca seletividade, podem crescer também espécies de *Pediococcus*, *Leuconostoc* e outros microrganismos acompanhantes (Siqueira, 1995).

3.5.4.5.1.1. Isolamento das Bactérias Lácticas

Dos meios M17 e Rogosa, para cada produtor e para cada ponto de amostragem, 5 a 8 colônias (20% do total), representativas de todas as morfologias diferentes, foram selecionadas de modo aleatório das placas da diluição contável, contendo entre 25-50 colônias.

Os isolados foram purificados por 4 repiques sucessivos e alternados, em caldo MRS e ágar MRS, respectivamente, sendo a incubação por 24 - 48 horas a 30^oC.

3.5.4.5.1.2. Preservação das Culturas

Após a etapa de purificação os isolados foram cultivados em caldo MRS por 24 horas a 30^oC e em seguida 800µL dessa cultura foram adicionados a 200µL de glicerol estéril em frascos de microcentrífuga, sendo, então, congelados -15^oC, até sua identificação.

3.5.4.5.1.3. Identificação das Bactérias Lácticas

Após reativação dos isolados em caldo MRS a 30^oC durante 24 - 48 horas realizou-se as seguintes provas para a identificação dos gêneros (Harrigan, 1998; Sharpe, 1979; Sharpe et al., 1966):

- **Gram, morfologia e arranjo celular:** A coloração de Gram foi realizada a partir de um cultivo em caldo MRS incubado a 30^oC durante 14 a 17 horas e de um cultivo em ágar MRS incubado a 30^oC durante 24 horas.

- **Catalase:** A um cultivo em ágar MRS de 24 horas a 30^oC adicionou-se um gota de água oxigenada. A produção de bolhas devido ao desprendimento de O₂ por decomposição da H₂O₂ indicou a positividade da reação.

- **Produção de CO₂ a partir da glicose:** Utilizou-se o meio semi-sólido de Gibson, meio nutriente tamponado contendo uma alta concentração de glicose. Após a inoculação do isolado adicionou-se uma cobertura de ágar 2% e deixou-se solidificar. Observou-se os tubos em 24, 48, 72 horas e 7 dias de incubação a 30^oC. A produção de gás se manifesta pela

formação de bolhas no interior do meio de Gibson ou, em alguns casos, a cobertura de ágar é forçada para cima do tubo. Aos 7 dias colocou-se os tubos que deram resultado negativo em um banho de água a 30⁰C para dilatar o gás que, eventualmente, ^{nesses} ~~tem~~ ficado retido.

Esta prova permite diferenciar entre bactérias homofermentativas e heterofermentativas, apesar de que certos lactobacilos homofermentadores podem tornar-se heterofermentadores em determinadas condições, como por exemplo, em baixas concentrações de glicose.

Para esse teste é essencial usar ^{grande quantidade de} bastante inóculo de uma cultura crescendo vigorosamente para a inoculação no meio semi-sólido de Gibson.

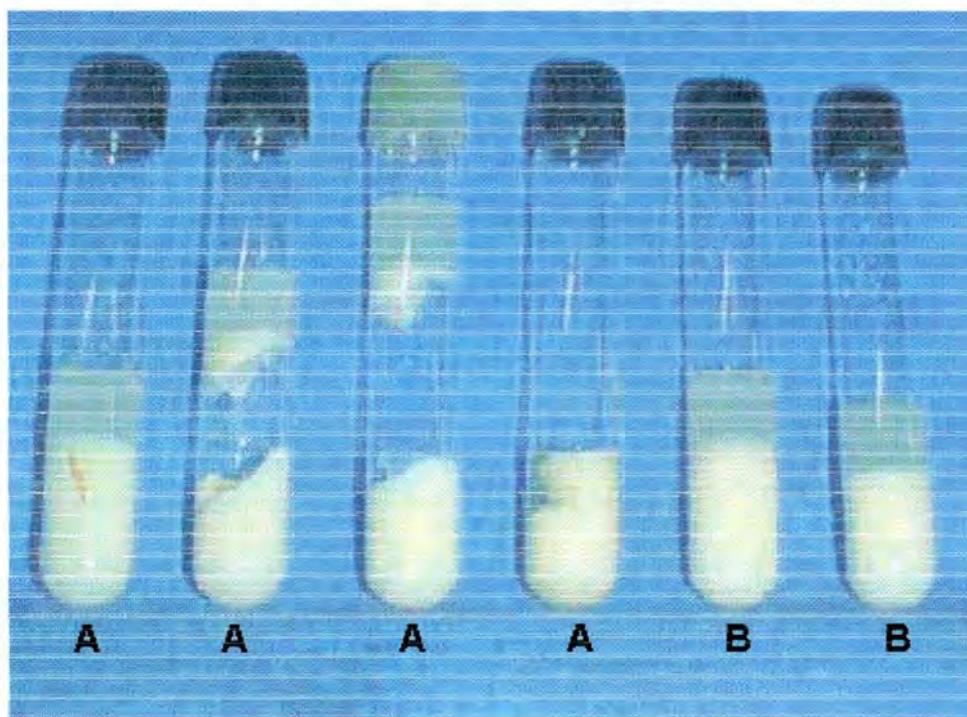


FIGURA 5 : Teste de produção de CO₂ pelas bactérias lácticas a partir da glicose. A : Resultado positivo; B : Resultado negativo.

- **Desaminação da arginina:** A uma gota de cultivo em caldo MRS com 0,3% de monoclóridrato de L-arginina, incubado a 30⁰C durante 3 dias, adicionou-se um gota do reativo de Nessler com o objetivo de demonstrar a produção de amônia. A aparição de uma cor laranja indica a positividade da reação.

Na prova de produção de amônia a partir da arginina é importante a composição do meio, sendo crítica a concentração de glicose. Com uma concentração de 2% só as espécies

de lactobacilos heterofermentadores produzem amônia (Briggs, 1953); porém, com uma baixa concentração desse açúcar não somente as espécies heterofermentativas produzem amoníaco, uma vez que algumas cepas de *Lb. plantarum* também podem produzi-lo. Por isso um meio que se torna adequado para este fim é o caldo arginina MRS, que tem 0,3% de arginina e 2% de glicose (Sharpe, 1962).

A prova de desaminação da arginina permite diferenciar os lactobacilos heterofermentadores dos leuconostoc; às vezes morfologicamente difíceis de separar, já que os lactobacilos podem adotar uma morfologia cocóide e os leuconostoc podem aparecer como cocobacilos ou bacilos curtos. Diferenciam-se porque os leuconostoc nunca desaminam a arginina ao contrário dos lactobacilos heterofermentadores.

Para os lactococos é uma prova de identificação da espécie, pois permite distinguir *Lc. lactis* subsp. *lactis* de *Lc. lactis* subsp. *cremoris*.

- **Crescimento a 10⁰C:** Para lactococos e leuconostoc é uma prova que confirma o gênero. Realizou-se em caldo MRS incubando-se em geladeira com controlador de temperatura Polilab modelo Temp-Control TC-500 (Brasil) durante 7 dias. O crescimento microbiano foi avaliado visualmente.

- **Crescimento a 45⁰C:** observou-se o crescimento, através de avaliação visual, em caldo MRS após 48 horas de incubação. Permite diferenciar entre lactococos e enterococos.

- **Crescimento em MRS com 6,5% de NaCl:** Observou-se a presença ou não de crescimento através de avaliação visual após incubar a 30⁰C, durante 2 dias, em caldo MRS com essa concentração de sal.

Estas duas últimas provas permitem diferenciar lactococos e enterococos (ambos são cocos homofermentadores). Os lactococos não crescem a 45⁰C e/ou 6,5% de sal, enquanto que os enterococos podem crescer nessas condições.

Os cocos Gram (+), catalase (-), homofermentadores, que cresceram a 10⁰C mas não a 45⁰C e/ou 6,5% de sal e que desaminaram ou não a arginina foram considerados lactococos. Os isolados que cresceram a 45⁰C e/ou 6,5% de sal foram identificados como enterococos.

As formas cocóides ou cocobacilares, Gram (+), catalase (-), heterofermentadoras, que não desaminam a arginina e não crescem a 45⁰C foram considerados leuconostoc.

Considerou-se lactobacilos os bacilos ou cocobacilos, Gram (+), catalase (-), com metabolismo homo ou heterofermentativo.

3.5.4.6. Contagem de Halotolerantes (*Micrococcaceae*)

Realizou-se essa análise em Ágar Manitol Salgado (MSA) (Chapman e Sharpe, 1987).

O MSA é um meio seletivo usado para o isolamento presuntivo de estafilococos patogênicos em leite, alimentos e outras amostras. Possui como agente seletivo um elevado conteúdo de NaCl (75g/L) de forma que só crescerão os microrganismos halotolerantes. Apresenta também em sua composição o manitol, cuja utilização se manifesta pela formação de ácido e a consequente mudança de coloração do meio, para amarelo, tendo em vista a viragem do indicador vermelho de fenol. A utilização do manitol com formação de ácido está relacionada à patogenicidade do microrganismo e serve como indicativo de *S. aureus*. As colônias manitol (+), com halo amarelo luminoso e crescimento intenso, correspondem geralmente a estafilococos coagulase positivos (*S. aureus*). Enquanto que as colônias pequenas, sem mudança de coloração do meio ao redor (manitol negativo), correspondem a outros microrganismos da família *Micrococcaceae*, entre eles o *S. epidermidis* (coagulase negativo) (Oxoid, 1995).

Inoculou-se na superfície das placas pré-secadas 0,1 mL do inóculo, em duplicata. Como em todas as inoculações em superfície o inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 32^oC durante 72 horas (APHA, 1966). A fim de enumerar as bactérias halotolerantes (*Micrococcaceae*) contou-se todas as colônias existentes na placa, grandes ou pequenas e rodeadas por um halo amarelo ou vermelho púrpura.

3.5.4.7. Contagem de Bolores e Leveduras

Realizou-se no meio de cultura Ágar Batata Dextrosado acidificado a pH 3,5 com solução estéril de ácido tartárico 10% .

Esse meio de cultura é seletivo para o isolamento, cultivo e determinação do número de bolores e leveduras a partir de produtos lácteos, bebidas, alimentos dessecados e congelados e outros. Em sua formulação o conteúdo de carboidratos e a infusão de batata favorecem o crescimento de leveduras e bolores, enquanto que o crescimento da flora bacteriana acompanhante é inibida pelo baixo valor do pH (Oxoid, 1995).

Embora o método de plaqueamento em profundidade possa ser utilizado para a contagem de bolores e leveduras, recomenda-se que estes grupos sejam enumerados pelo

método de plaqueamento em superfície. Este cuidado permite uma máxima exposição ao ar, benéfica para os bolores (aeróbios em sua maioria) (Silva et al., 1997).

Inoculou-se na superfície de placas pré-secadas, em duplicata, 0,1 mL de cada diluição, incubando-se a 25^oC em geladeira com controlador de temperatura Polilab modelo Temp-Control TC-500 (Brasil) durante 5 dias, com as placas não invertidas. Após esse período selecionou-se para contagem as placas que apresentavam de 15 a 150 colônias, enumerando separadamente os bolores e as leveduras (APHA, 1993).

3.5.4.8. Contagem de Coliformes Totais

Para essa contagem utilizou-se o meio de cultura Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA) com a técnica de semeadura em profundidade com sobrecamada.

O VRBA é um meio seletivo para a detecção e enumeração de bactérias coliformes em água, leite, produtos lácteos, carnes e outros alimentos. O cristal violeta e os sais biliares inibem o crescimento de toda a flora Gram positiva acompanhante. A fermentação da lactose a ácido pelas bactérias do grupo coliforme é visualizada pela viragem do indicador de pH, o vermelho neutro, a vermelho e pela precipitação dos ácidos biliares. A seletividade do meio diminui depois de 24 horas de incubação e os microrganismos previamente inibidos podem desenvolver-se (Oxoid, 1995).

Adicionou-se alíquotas de 1mL das diluições em placas de petri (Bioplass/ Brasil). Em seguida o inóculo foi misturado com cerca de 15mL de VRBA, previamente fundido e resfriado a 45^oC. Após solidificação, uma sobrecamada de 3-4mL do mesmo meio foi adicionada. As placas foram incubadas invertidas em estufa (Fanem e Biomatic/Brasil) a 32^oC por 24 horas (APHA/ 1993). Quantificou-se (contador de colônias Phoenix/CP 608/Brasil) apenas as colônias típicas de coliformes totais: roxo-avermelhadas com diâmetro de 0,5-2mm e rodeadas por um halo de mesma coloração devido a precipitação dos ácidos biliares (Oxoid, 1995).

3.5.4.9. Contagem de Coliformes Fecais

Essa contagem também foi realizada no meio de cultura VRBA pela técnica de semeadura em profundidade com sobrecamada. Porém as placas foram incubadas invertidas a 44 - 45^oC durante 24 horas. Quantificou-se apenas as colônias típicas de coliformes fecais: roxo-avermelhadas com diâmetro de 1,0mm ou mais e rodeadas por um halo de mesma coloração, normalmente com mais de 3,0mm. Enquanto que as colônias típicas de coliformes

não fecais nessa temperatura de incubação são pequenas e sem halo, nunca maiores que 0,5mm, conforme Klein and Fung (1976).

Depois de manter as placas na temperatura apropriada durante o tempo necessário para cada grupo microbiano, realizou-se a contagem das placas com um número de colônias entre 25 e 250 colônias, com exceção dos bolores e leveduras, expressando as contagens em unidades formadoras de colônias por grama (ufc/g).

3.6. Análises Químicas e Físico-Químicas

3.6.1. Instalações

O processamento das amostras e as análises do leite foram realizadas no Bioteclab (Laboratório de Biotecnologia) do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS). As análises de atividade de água dos queijos foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Universidade do Vale do Alto Taquari de Ensino Superior (UNIVATES). Todas as demais análises químicas e físico-químicas dos Queijos Serranos foram realizadas no Laboratório de Bromatologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS).

3.6.2. Material de laboratório

Todos os reagentes utilizados foram da Merck (Alemanha).

A formulação e o procedimento de elaboração das soluções estão descritos no apêndice 4.

3.6.3. Preparação das Amostras

Primeiramente retirou-se a amostra para a análise microbiológica. O restante das amostras de coalhada e queijo foram processadas num triturador de alimentos (Arno modelo Pic-Liq/Brasil) e divididas em porções de 20-30g que foram acondicionadas em sacos plásticos selados com identificação e guardadas no freezer a -20°C para posterior análise.

Já as amostras de leite foram analisadas logo após a retirada da amostra para a análise microbiológica. As porções das amostras de coalhada e queijo foram descongeladas lentamente, do freezer foram transferidas para a geladeira e posteriormente à temperatura ambiente.

Todas as análises foram realizadas em duplicata.

3.6.4. Determinação dos parâmetros físico-químicos e das características químicas

3.6.4.1. Determinação do pH

O pH do leite foi medido diretamente em pHmetro da René Graf Digigraf LCD (Brasil).

As determinações do pH nas amostras de coalhada e queijo foram realizadas adaptando o método da AOAC 14.022 (1980). Pesou-se (OHAUS modelo AS 200 / EUA) $10 \pm 0,1$ g de amostra e adicionou-se 100 mL de água destilada, previamente fervida e esfriada até 45-50°C. Em seguida homogeneizou-se durante 3 minutos. Após filtrou-se e mediu-se o pH do filtrado num pHmetro da DIGIMED DM 20 com eletrodo de difusão DME-CV2 da DIGIMED (Brasil).

As determinações do pH interno e externo foram realizadas num pHmetro da DIGIMED DM 20 com eletrodo de penetração DME-CF1 da DIGIMED, diretamente numa secção do queijo, equivalente a 1/8 do total. Para a medida de pH interno posicionou-se o eletrodo na porção mais interna da fatia, correspondendo ao centro do queijo. Já para a determinação do pH externo colocou-se o eletrodo em contato com a casca do queijo.

3.6.4.2. Determinação da Acidez Titulável

As determinações da acidez titulável nas amostras de coalhada e queijo foram realizadas seguindo o procedimento adaptado da AOAC 920.124 (1996).

Procedimento:

Para essa análise usou-se 50 mL do mesmo filtrado utilizado para a medida do pH, ao qual adicionou-se 2 gotas da solução alcóolica de fenolftaleína 2%, titulando-se em seguida com NaOH 0,1N até o aparecimento de coloração rosada (pH entre 8,3-8,6) persistente durante alguns segundos.

A acidez titulável, expressada como porcentagem de ácido láctico, é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Acidez Titulável (\% ácido láctico)} = \frac{V \times 0,009 \times 100 \times 100}{M \times 50 \times N}$$

V = volume, em mL, da solução NaOH gastos na titulação

N = normalidade da solução de NaOH

M = massa, em g, da amostra

Para a análise de acidez titulável nas amostras de leite seguiu-se a metodologia do Manual do Instituto Adolfo Lutz (1985).

Procedimento:

Transferiu-se, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 10mL da amostra homogeneizada para um Erlenmeyer e adicionou-se 2 gotas da solução alcóolica de fenolftaleína 2%. Titulou-se com uma solução de NaOH 0,1N até atingir uma coloração ligeiramente rósea.

A acidez titulável, expressada como a porcentagem de ácido láctico, é dada pela seguinte fórmula:

$$\text{Acidez Titulável (\% ácido láctico)} = \frac{V \times 0,009 \times 100}{V_A \times N}$$

V = volume, em mL, da solução NaOH gastos na titulação

N = normalidade da solução de NaOH

V_A = volume, em mL, da amostra

3.6.4.3. Determinação da Atividade de Água (a_w)

As determinações da atividade de água nas diferentes amostras de coalhada e queijo foram realizadas usando um AQUALAB modelo CX-2 Water Activity System da DECAGON (EUA).

Procedimento:

Primeiramente calibrou-se o aparelho utilizando uma solução saturada de K₂SO₄ (a_w a 20°C 0,976 ± 0,005).

As amostras foram colocadas de forma a encher o copo até a metade e cobrir o fundo. Limpou-se a borda superior e a parte externa com papel higiênico absorvente, encaixou-se o copo na cavidade e fechou-se o equipamento. Após a emissão de um sinal sonoro procedeu-se a leitura. O valor da atividade de água da amostra corresponde ao número apresentado no visor do equipamento.

$$a_w = \text{leitura}$$

3.6.4.4. Determinação da Umidade

As determinações de umidade das amostras de coalhada e queijo foram realizadas num MA 30 Moisture Analyzer da SARTORIUS (Alemanha).

Procedimento:

Após a adição de aproximadamente 2g de areia do mar, lavada com ácido, e de um bastão de vidro pequeno no prato de alumínio descartável da balança, pesou-se em torno de 1g de amostra, misturando-a cuidadosamente com a areia mediante o auxílio do bastão de vidro.

Em seguida baixou-se a tampa da balança de forma que o conjunto areia + bastão + amostra foi aquecido a temperatura de 90^oC até peso constante.

Após a emissão de um sinal sonoro, o valor existente no visor da balança corresponde a umidade (em %) da amostra.

$$\% \text{ umidade} = \text{leitura}$$

Conhecendo-se o teor de umidade da amostra pode-se determinar a porcentagem de extrato seco total (EST):

$$\% \text{ EST} = 100 - \% \text{ umidade}$$

3.6.4.5. Determinação do teor de Cloretos (NaCl)

As determinações de cloretos nas amostras foram realizadas adaptando o procedimento descrito por Vohlard segundo a norma da AOAC 935.43 (1996).

Nesse método a matéria orgânica do queijo é digerida com KMnO₄ e HNO₃ e todo o cloreto presente na amostra reage com o AgNO₃, cujo excesso é titulado com o KSCN, usando a solução saturada de NH₄Fe(SO₄)₂ como indicador.

Procedimento:

Em um balão redondo de fundo plano de 250 mL pesou-se 3 ± 0,1 g da amostra, adicionando-se em seguida 25 mL da solução de AgNO₃ 0,1N, que se combina com todo o cloreto presente, e 25 mL de HNO₃ 60%. Misturou-se tudo mediante agitação e colocou-se numa manta aquecedora (Fisatom/modelo 52/Brasil). Uma vez iniciada a ebulição, adicionou-se lentamente em torno de 15 mL de solução saturada de KMnO₄, até a formação de uma coloração marrom, indicando que a destruição da matéria orgânica estava completa.

Manteve-se a mistura em ebulição sob refluxo e uma vez descorado o KMnO₄ retirou-se o balão da manta e adicionou-se 100mL de água destilada e 2 mL de solução saturada de NH₄Fe(SO₄)₂, misturando o conteúdo adequadamente. Imediatamente determinou-se o excesso de AgNO₃ com a solução de KSCN 0,1N até o aparecimento de uma coloração marrom avermelhada persistente durante 30 segundos.

Realizou-se um ensaio “em branco”, usando os mesmos reagentes, exceto pela adição de sacarose para destruir o excesso de KMnO₄.

A porcentagem de cloretos, expressada como NaCl, determina-se utilizando a fórmula:

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{0,0058 \times (V_0 - V) \times 100}{M}$$

V_0 = volume, em mL, de KSCN 0,1N gastos na titulação do branco

V = volume, em mL, de KSCN 0,1N gastos na titulação da amostra

M = massa, em g, da amostra ensaiada

Para a obtenção da quantidade de NaCl no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{NaCl (\% EST)} = \frac{\% \text{ NaCl}}{\% \text{ EST}} \times 100$$

Um outro parâmetro físico-químico importante é a concentração de sal na umidade, que determina-se através da seguinte fórmula:

$$\text{NaCl (\% na umidade)} = \frac{\% \text{ NaCl}}{\% \text{ NaCl} + \% \text{ umidade}} \times 100$$

3.6.4.6. Determinação do teor de Cinzas

As determinações do teor de cinza nas amostras de coalhada e queijo foram realizadas mediante calcinação em mufla, segundo a norma FIL-IDF 27 (1964).

Esse método fundamenta-se na perda de peso que ocorre quando o produto é incinerado, a 500-550^oC, com destruição da matéria orgânica, sem apreciável decomposição dos constituintes do resíduo mineral ou perda por volatilização (Brasil, 1981).

Procedimento:

Manteve-se as cápsulas de porcelana durante 30 min a 100 ± 2^oC em estufa e, uma vez resfriadas num dessecador, foram pesadas; repetindo-se estas operações até peso constante.

Pesou-se nas cápsulas entre 2 a 2,5 g de cada amostra, transferindo-se o conjunto para um bico de Bunsen até carbonização completa da amostra. Em seguida, introduziu-se numa mufla (EDG Equipamentos/modelo EDGCON 3P 3000/Brasil), onde permaneceu durante 6 horas a 525 ± 25^oC até total incineração da amostra. Finalizado o tratamento levou-se as cápsulas para um dessecador onde foram esfriadas até temperatura ambiente e após pesadas. A incineração foi repetida mediante ciclos de 15 min até obter um peso constante.

O conteúdo de cinzas, expresso como porcentagem em peso, é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{M_1 - M_0}{M} \times 100$$

M_1 = massa, em g, da cápsula com as cinzas

M_0 = massa, em g, da cápsula vazia

M = massa, em g, da amostra

Para a obtenção da quantidade de cinzas no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Cinzas (\% EST)} = \frac{\% \text{ cinzas}}{\% \text{ EST}} \times 100$$

3.6.4.7. Determinação do teor de Lactose

As determinações de lactose nas amostras de coalhada e queijo foram realizadas segundo o método gravimétrico de Munson-Walker seguindo a norma FIL-IDF 43 (1967).

Após a eliminação das gorduras e proteínas por precipitação, com Zn_2SO_4 e $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, seguida de filtração, determina-se a quantidade de lactose numa parte do filtrado. A quantificação baseia-se na redução dos íons cúpricos (solução de $CuSO_4$) a íons cuprosos pela lactose (açúcar redutor) em meio alcalino aquecido. O NaOH faz a alcalinização do meio e o agente complexante (tartarato de sódio e potássio) impede o consumo de cobre (II) para a formação de $Cu(OH)_2$ (Tronco, 1997).

Procedimento:

Utilizou-se cadinhos filtrantes de porcelana, com porosidade média de 3-15 μ m, tratados com HNO_3 15-20% e lavados com água destilada quente e 10 mL de álcool etílico 96%. Em seguida, permaneceram na estufa a $100 \pm 2^\circ C$ durante 30 min e uma vez esfriados num dessecador foram pesados.

Pesou-se $10 \pm 0,01$ g da amostra em um gral ao qual se adicionou água destilada quente (60-70 $^\circ C$) para favorecer sua trituração. O conteúdo foi transferido para um balão volumétrico de 500 mL preenchendo com água destilada até aproximadamente 400 mL. Adicionou-se 5 mL de Zn_2SO_4 30% e 5 mL de $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$ 15%, misturando-se adequadamente depois de cada uma das adições. O conteúdo do balão foi esfriado à temperatura ambiente e completou-se o volume a 500 mL com água destilada. Após agitou-se e procedeu-se à filtração.

Em um béquer de 400 mL colocou-se 25 mL de $CuSO_4$ 7% e 25 mL de solução de tartarato alcalino. A mistura foi aquecida até ebulição e adicionou-se 100mL do filtrado, cobrindo o béquer com um vidro de relógio. Aqueceu-se de novo e interrompeu-se o aquecimento exatamente 6 min depois de ter alcançado novamente o ponto de ebulição.

O conteúdo do béquer foi filtrado, com o auxílio de uma bomba de vácuo (Primatec/ modelo 131/Brasil), sobre um cadinho filtrante de porcelana, previamente preparado. Para facilitar a transferência do precipitado utilizou-se água quente e um bastão de vidro com proteção de borracha na ponta. O filtrado deve ser de cor azul, caso seja incolor deve-se repetir a análise utilizando uma quantidade menor de filtrado diluída em 100 mL.

Finalizada a filtração, o cadinho foi enxaguado com água quente e 10 mL de álcool etílico 96% e em seguida secado durante 30 min em estufa a $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para posteriormente, uma vez frio, pesá-lo.

A diferença de peso do filtro, antes e depois da filtração, corresponde ao óxido de cobre I formado e retido no mesmo, o qual é proporcional a lactose presente. As mg de Cu_2O foram convertidas em gramas de lactose anidra, mediante tabelas apropriadas, e o teor de lactose anidra presente nas amostras foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Lactose (\%)} = \frac{500 \times M \times 100}{V \times M_0} \times 0,99$$

M = massa, em g, de lactose anidra representada na tabela de equivalência

M_0 = massa, em g, da amostra analisada

V = volume, em mL, do filtrado utilizado

0,99 = fator de correção para compensar o erro volumétrico devido a presença de gordura e proteína na amostra

Para a obtenção da quantidade de lactose no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Lactose (\% EST)} = \frac{\% \text{ lactose}}{\% \text{ EST}} \times 100$$

3.6.4.8. Determinação do teor de Nitrogênio Total e Proteína

As determinações do teor de proteína nas amostras de coalhada e queijo foram realizadas quantificando o nitrogênio total pelo método Kjeldahl, segundo norma do Lanara (Brasil, 1981), em um equipamento Velp Scientifica (Itália) com unidade de digestão DK 20 e unidade de destilação UDK 130A.

Na digestão, pela ação do H_2SO_4 , o carbono é liberado como CO_2 e o hidrogênio como H_2O . O nitrogênio é transformado em NH_3 e fixado como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tronco, 1997). Nessa etapa usa-se uma mistura catalítica formada por CuSO_4 , que age como catalisador oxidante, e K_2SO_4 , que aumenta a temperatura de ebulição (Brasil, 1981). Na destilação, a solução concentrada de NaOH (em excesso) libera a NH_3 , que por arraste a vapor é coletada no

H_3BO_3 contendo algumas gotas do indicador Tashiro e posteriormente é titulada com HCl formando NH_4Cl (Tronco, 1997).

Procedimento:

Pesou-se em torno de 1g de amostra com precisão de ± 1 mg e introduziu-se em um tubo de digestão, adicionando-se em seguida 25 mL da solução ácida (apêndice 4). Colocou-se os tubos na unidade de digestão, onde foram aquecidos a $420^\circ C$ por 20 min ou até formação de vapores brancos e total clarificação do líquido.

Uma vez realizada a digestão, liberou-se o NH_3 do $(NH_4)_2SO_4$ mediante a alcalinização do meio com 50 mL da solução de NaOH 35%.

O NH_3 foi arrastado por uma corrente de vapor, durante 7 min, na unidade de destilação. Após foi recolhido sobre 25 mL de H_3BO_3 4% contendo de 3 a 4 gotas do indicador Tashiro (apêndice 4). Determinando-se em seguida o $(NH_4)_3BO_3$ resultante por titulação com HCl 0,1N até viragem do indicador. A solução, que inicialmente era verde, torna-se cinza azulada (pH 4,7) quando toda a amônia foi neutralizada pela solução ácida.

Realizou-se prova “em branco” usando todos os reagentes menos a amostra.

A porcentagem de nitrogênio total (NT) foi determinada mediante a seguinte fórmula:

$$NT (\%) = \frac{14,01 \times (V - V_0) \times N}{M \times 10}$$

V= volume, em mL, de HCl 0,1N gastos na determinação da amostra

V_0 =volume, em mL, de HCl 0,1N gastos na determinação do branco

M= massa, em g, da amostra

N= normalidade da solução de HCl

Para a obtenção da quantidade de NT no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$NT (\% EST) = \frac{\% NT}{\% EST} \times 100$$

Obtida então a quantidade de nitrogênio total, calcula-se a porcentagem de proteína, multiplicando-se por um fator apropriado. Para o caso do leite, o fator utilizado é 6,38, correspondente a uma quantidade média de nitrogênio, que nas proteínas do leite é de 15,65% (Tronco, 1997).

$$\% \text{ proteína} = \% NT \times 6,38$$

Para a obtenção da quantidade de proteína no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{Proteína} (\% EST) = \frac{\% \text{ proteína}}{\% EST} \times 100$$

3.6.4.9. Determinação do teor de Gordura

Para as determinações do teor de gordura no leite utilizou-se o Método de Gerber, segundo metodologia do Lanara (Brasil, 1981).

Esta análise fundamenta-se na destruição do estado globular da gordura e a dissolução da caseína pelo H_2SO_4 . O álcool isoamílico diminui a tensão na interface entre a camada lipídica e a mistura ácido-leite, auxiliando na separação da gordura durante a centrifugação, pois facilita a ascensão dos glóbulos menores (Brasil, 1981).

Procedimento:

Colocou-se no butirômetro de Gerber 10 mL de H_2SO_4 ($d=1,820$), 11 mL de leite e em seguida 1 mL de álcool isoamílico. Agitou-se invertendo várias vezes o butirômetro de modo que os 3 líquidos se misturassem.

A seguir transferiu-se o butirômetro durante 5 minutos para o banho de água (B. Braun Biotech International/Thermomix BM-S/Alemanha) a $65^{\circ}C$ e após levou-se à centrífuga de Gerber por 5 minutos a 1000-1200 rpm. Caso a coluna de gordura não estivesse bem definida essas 2 etapas eram repetidas.

Manejando-se a rolha colocava-se a camada de gordura dentro da escala do butirômetro. A leitura direta na escala corresponde ao percentual de gordura na amostra.

$$\% \text{ gordura} = \text{leitura}$$

Para as determinações do teor de gordura nas amostras de coalhada e queijo utilizou-se o método gravimétrico de Schmid-Bondzynski-Ratzlaff segundo a norma FIL-IDF 5B (1986).

Fundamenta-se na ação preliminar do HCl para dissolver as proteínas e liberar os lipídeos. Enquanto o álcool etílico quebra a emulsão gordura-caseína além de facilitar a mistura dos éteres com a parte aquosa. Já os éteres etílico e de petróleo dissolvem e extraem os lipídeos. O éter de petróleo reduz a solubilidade das substâncias não lipídicas solúveis no éter etílico (Brasil, 1981).

Após um tempo em repouso, no funil de separação, a mistura forma 2 fases perfeitamente visíveis: uma inferior, aquosa, e outra superior, etérea, que contém a gordura extraída. Pela evaporação do éter presente nessa camada obtém-se o teor de gordura na amostra.

Procedimento:

Um balão de fundo redondo de 250 mL foi mantido durante 30 min em estufa (Biomatic modelo 305/Brasil) a $100 \pm 2^{\circ}C$. Após esfriou-se num dessecador até temperatura ambiente e pesou-se com aproximação de $\pm 0,1$ mg.

Em um Erlenmeyer de 50 mL pesou-se de 1 a 3g da amostra com uma precisão de 0,1mg e adicionou-se de 8 a 10 mL de HCl 25%. A mistura foi colocada num banho (Biomatic modelo 1052 /Brasil) de água fervente por 30 min até a digestão total do queijo. À seguir, esfriou-se à temperatura ambiente e adicionou-se 10 mL de álcool etílico 96% agitando ligeiramente e transferiu-se para um funil de separação de 100 mL.

Posteriormente, adicionou-se 25 mL de éter etílico agitando vigorosamente durante 1 min e 25 mL de éter de petróleo, agitando suavemente durante 30 segundos. Em seguida o funil foi deixado em repouso até que a camada líquida superior estivesse completamente clara e separada da camada aquosa inferior.

A fase aquosa inferior foi retirada e a superior, com a gordura, foi transferida para o balão redondo, previamente pesado.

Retornou-se a camada aquosa para o funil e repetiu-se o procedimento de extração por mais 2 vezes, utilizando nesses casos somente 15 mL de éter etílico e 15 mL de éter de petróleo de cada vez.

Os solventes foram evaporados em um rotavapor (Fisatom modelo 802D/Brasil) e os balões foram colocados numa estufa a $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Ao final deste tempo, foram esfriados num dessecador até temperatura ambiente e pesados, repetindo-se as operações de aquecimento e esfriamento até alcançar um peso constante.

O conteúdo de gordura na amostra, expressado como porcentagem em peso, é dada pela seguinte expressão:

$$\text{Gordura (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_0} \times 100$$

M_1 = massa, em g, do balão com a gordura extraída

M_2 = massa, em g, do balão vazio

M_0 = massa, em g, da amostra ensaiada

Para a obtenção da quantidade de gordura no extrato seco total (EST) utiliza-se a seguinte fórmula:

$$\text{gordura (\% EST)} = \frac{\% \text{ gordura}}{\% \text{ EST}} \times 100$$

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do Pacote Estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 8.0.

No tratamento estatístico adotou-se o nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

A fim de verificar se houve variações significativas estatisticamente das composições químicas, características físico-químicas e contagens microbianas entre os Queijos Serranos processados no verão e no inverno utilizou-se para comparação das médias o teste t.

Todos os dados de características químicas, físico-químicas e microbiológicas foram submetidos a análise de variância (ANOVA) para captar diferenças entre as médias das etapas de elaboração e maturação. Após, onde observou-se diferenças significativas realizou-se o teste Tukey (quando a homogeneidade de variância estava satisfeita) ou o Dunnet T3 (quando não havia homogeneidade de variância entre os grupos) para comparações múltiplas de médias.

O coeficiente de correlação (r) de Pearson foi utilizado para determinar as correlações entre os resultados das características químicas, físico-químicas e os das contagens (log ufc/g) dos diferentes grupos microbianos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no verão e no inverno. Dessa forma, o coeficiente correlaciona o efeito que uma determinada propriedade físico-química tem sobre uma determinada população microbiana. Assim, os valores variam entre - 1 e + 1. Os valores positivos indicam uma relação diretamente proporcional, enquanto valores negativos indicam uma relação inversamente proporcional entre as variáveis.

4. Resultados e Discussão

4.1. Evolução das contagens dos grupos microbianos durante a elaboração e maturação do Queijo Serrano

Os resultados do trabalho serão apresentados de maneira ordenada, sob a forma de gráficos, com os dados obtidos dos 3 produtores, e de tabelas, contendo a média geral e outras informações estatísticas referentes ao trabalho. As Tabelas 6 e 7, essenciais para o entendimento das correlações entre as variáveis investigadas, são apresentadas no final desta seção.

Constatou-se um aumento de, aproximadamente, 1 unidade logarítmica (log), do leite para a coalhada, nas contagens dos distintos grupos microbianos investigados, exceto para os bolores (Tabelas 1 e 2). Esse incremento no número de microrganismos é um fenômeno normal na elaboração de queijos e se deve parcialmente à multiplicação microbiana durante a coagulação e parcialmente pela retenção física dos mesmos no cóagulo durante a drenagem do soro. A elevação observada na coalhada dos Queijos Serranos foi similar àquelas descritas por Medina et al. (1992) no queijo Gredos e por Tornadijo et al. (1995) no queijo Armada, ambos elaborados com leite cru de cabra por coagulação enzimática durante, respectivamente, 1,5 - 2,5 h e 7 h. Porém, Pouillet et al. (1991) no queijo de ovelha Casar de Cáceres, coagulado durante 40 - 60 min com extrato de *Cynara cardunculus* L, observaram aumentos notavelmente maiores (3 unidades log). Gómez et al. (1989), no queijo de cabra Majorero, verificaram aumentos ainda mais altos na contagem total de viáveis (3-5 unidades logarítmicas), porém, deve ser levado em conta que neste foi usado leite pasteurizado no qual uma cultura "starter" foi adicionada antes da coagulação.

Os baixos aumentos das contagens do Queijo Serrano podem ser explicados pelo curto período de tempo entre a coleta das amostras de leite e coalhada (aproximadamente 1,5 h), no qual a multiplicação microbiana é mínima. Esta possibilidade é suportada por Tatini et al. (1971) que concluíram que a retenção física dos microrganismos na coalhada é responsável

pelo aumento em 1 unidade log das contagens e o restante sendo devido à multiplicação microbiana.

As contagens máximas para a maioria dos grupos microbianos foram atingidas pelos queijos com sete dias, tanto no verão quanto no inverno (Tabelas 1 e 2), e, em geral, após a primeira semana de maturação, observou-se uma diminuição do número de ufc. A amplitude desse decréscimo variou entre as diferentes populações de microrganismos, bem como de uma estação climática para a outra. Nos lotes processados no inverno (Tabela 2), constatou-se uma diminuição média de, aproximadamente, 1 unidade log do 7^o para o 60^o dia de maturação. Já para os queijos do verão (Tabela 1) essa variação ao longo do processo foi mais pronunciada, as contagens dos diferentes grupos microbianos do último ponto amostrado foram, em média, 2 unidades log menores que as do queijo de 1 semana; a queda das contagens em VRBA (coliformes totais e fecais) foi particularmente notável, em torno de 5 unidades logarítmicas.

Os lactobacilos, enumerados no ágar Rogosa, não diminuíram a partir do 7^o dia, permanecendo constante durante os 60 dias, nas duas épocas do ano (Tabelas 1 e 2), sugerindo que eles poderiam desempenhar uma função importante na determinação das propriedades físico-químicas e organolépticas do Queijo Serrano.

Apenas nas contagens de halotolerantes (*Micrococcaceae*) e bolores, ao longo da elaboração e maturação dos Queijos Serranos, foram observadas diferenças significativas associadas ao período do ano (verão e inverno) (Tabela 3), mostrando que as condições ambientais durante a cura influenciaram na evolução desses dois grupos de microrganismos. Para os bolores o valor médio das contagens do verão foi de 2,9 (log ufc/g), enquanto no inverno foi de 1,9 (log ufc/g); esse aumento do número de microrganismos, nas bateladas do verão quando comparadas com as bateladas do inverno, foi provavelmente devido às menores temperaturas, que diminuíram a taxa de crescimento dessa população microbiana. Já os halotolerantes apresentaram contagens menores no verão, o que provavelmente deve-se a a_w , tendo em vista o coeficiente de correlação entre eles no verão ($r = 0,732$) (Tabela 6).

Uma outra característica das bateladas do inverno (Tabela 2) foi que, se a população microbiana parou de crescer, em geral, ela permaneceu nesse nível até o fim da maturação, em vez de diminuir como aconteceu com as amostras do verão (Tabela 1). Este fato é de grande importância para a saúde pública uma vez que os coliformes totais e fecais permaneceram no interior dos queijos de 60 dias maturados no inverno, com valores acima de 3 e 2 unidades log, respectivamente. Poulet et al. (1991) observaram um comportamento semelhante, para os distintos grupos microbianos, ao comparar as contagens dos queijos espanhóis Casar de Cáceres maturados no inverno e na primavera.

TABELA 1 : Variações nas contagens (log ufc/g) dos grupos microbianos do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no verão^a

Grupos Microbianos	Leite	Coalhada	Etapa de Maturação (dias)				
			7	14	28	42	60
Mesófilos	6,07 ^a	7,60 ^b	9,32 ^c	9,00 ^{bc}	8,57 ^{bc}	8,36 ^{bc}	7,71 ^b
Psicrotróficos	6,00 ^{ab}	7,35 ^{ab}	8,06 ^b	7,80 ^b	6,90 ^{ab}	6,72 ^{ab}	4,94 ^a
Proteolíticos	5,03 ^a	5,91 ^{ab}	7,12 ^{ab}	8,09 ^b	7,50 ^b	7,17 ^{ab}	7,10 ^{ab}
Lipolíticos	3,94 ^a	5,18 ^a	6,50 ^a	6,59 ^a	6,43 ^a	5,57 ^a	5,50 ^a
Lactococos	5,84 ^a	7,60 ^b	9,31 ^c	8,92 ^{bc}	8,42 ^{bc}	8,17 ^{bc}	8,00 ^{bc}
Lactobacilos	4,32 ^a	5,62 ^a	8,38 ^b	8,34 ^b	8,39 ^b	8,27 ^b	8,15 ^b
Halotolerantes	5,26 ^{ab}	6,42 ^b	6,52 ^b	5,72 ^{ab}	5,24 ^{ab}	4,63 ^a	4,64 ^a
Bolores	2,49 ^a	2,53 ^{ab}	4,70 ^b	3,67 ^{ab}	2,93 ^{ab}	1,20 ^a	1,94 ^a
Leveduras	3,03 ^a	4,42 ^{ab}	6,04 ^b	4,81 ^{ab}	4,80 ^{ab}	4,24 ^{ab}	3,72 ^a
Coliformes Totais	4,03 ^{ab}	5,57 ^b	5,76 ^b	5,45 ^b	4,07 ^{ab}	3,18 ^{ab}	0,57 ^a
Coliformes Fecais	3,13 ^{ab}	4,27 ^{ab}	5,59 ^b	5,29 ^b	4,00 ^{ab}	2,69 ^{ab}	< 1 ^a

* Os dados representam a média dos 3 produtores. ^{abc} Médias na mesma linha com diferentes expoentes diferem significativamente (P<0,05).

TABELA 2 : Variações nas contagens (log ufc/g) dos grupos microbianos do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no inverno^a

Grupos Microbianos	Leite	Coalhada	Etapa de Maturação (dias)				
			7	14	28	42	60
Mesófilos	5,70 ^a	7,40 ^{ab}	9,19 ^c	9,12 ^c	8,65 ^{bc}	7,98 ^{bc}	7,56 ^{bc}
Psicrotróficos	5,49 ^a	6,49 ^{ab}	8,26 ^c	8,15 ^c	8,10 ^c	7,64 ^{bc}	7,02 ^{abc}
Proteolíticos	4,88	5,97	7,09	9,05	8,67	7,82	7,86
Lipolíticos	4,94 ^a	6,15 ^a	6,16 ^a	6,26 ^a	5,13 ^a	5,30 ^a	4,68 ^a
Lactococos	5,63	7,32	9,14	9,07	8,29	7,70	7,68
Lactobacilos	3,46	4,16	7,24	7,77	7,98	7,91	7,92
Halotolerantes	4,55 ^a	6,13 ^b	6,74 ^b	6,37 ^b	6,09 ^b	6,15 ^b	6,02 ^b
Bolores	1,49 ^a	1,49 ^a	2,52 ^a	2,64 ^a	1,43 ^a	1,33 ^a	0,67 ^a
Leveduras	3,37 ^a	4,59 ^a	5,51 ^a	4,59 ^a	4,63 ^a	4,08 ^a	4,07 ^a
Coliformes Totais	3,54 ^a	4,84 ^a	4,98 ^a	3,65 ^a	3,13 ^a	2,74 ^a	3,01 ^a
Coliformes Fecais	1,75 ^a	3,09 ^a	3,92 ^a	2,44 ^a	2,34 ^a	2,08 ^a	2,18 ^a

* Os dados representam a média dos 3 produtores. ^{abc} Médias na mesma linha com diferentes expoentes diferem significativamente (P<0,05).

TABELA 3: Valores médios das contagens dos diferentes grupos microbianos para o período do verão e do inverno.

Grupos Microbianos	Período	Média ^A (log ufc/g)	Significância
Mesófilos	Verão	8,09	0,690
	Inverno	7,94	
Psicrotróficos	Verão	6,82	0,204
	Inverno	7,31	
Proteolíticos	Verão	6,84	0,279
	Inverno	7,33	
Lipolíticos	Verão	5,67	0,647
	Inverno	5,52	
Lactococos	Verão	8,03	0,585
	Inverno	7,83	
Lactobacilos	Verão	7,35	0,222
	Inverno	6,63	
Halotolerantes	Verão	5,49	0,047*
	Inverno	6,01	
Bolors	Verão	2,92	0,002*
	Inverno	1,94	
Leveduras	Verão	4,44	0,924
	Inverno	4,41	
Colif. Totais	Verão	4,14	0,556
	Inverno	3,77	
Colif. Fecais	Verão	3,66	0,081
	Inverno	2,64	

*Diferença significativa ($P < 0,05$) entre os dois períodos

^A Os valores são as médias dos sete pontos de amostragem para os três produtores

↙ valores em log ufc/g

4.1.1. Contagem Total de Aeróbios Mesófilos

As Figuras 6 e 7 mostram a evolução das contagens totais de aeróbios mesófilos durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno, respectivamente.

No leite cru usado para manufatura dos queijos obteve-se contagens médias de 6,07 e 5,70 (log ufc/g) (Figuras 6 e 7). Provavelmente, essas contagens altas são devido às condições de higiene deficientes durante a ordenha. Tais valores são similares a aqueles dos leites utilizados para a produção de outros queijos de vaca, tais como, o Ulloa (Ordóñez e Burgos, 1977), o Quartirolo di Monte (Paleari et al., 1993), o Arzúa (Centeno et al., 1994), o Peñamellera (Estepar et al., 1999) e o San Simón (Fontán et al., 2001); e menores que aqueles

determinados nos leites usados para a elaboração dos queijos Tafi (De Giori et al., 1983) e León (Medina et al., 1995).

O número de ufc aumentou aproximadamente 1,7 unidades logarítmicas, em relação aos valores da coalhada, durante a primeira semana de maturação (Figuras 6 e 7), atingindo contagens em torno de 9,2 – 9,3 (log ufc/g), que apesar de serem superiores às encontradas por Ordóñez e Burgos (1977) no queijo de Ulloa, estão em concordância com as de inúmeras variedades semelhantes elaboradas com leite de vaca, Tafi (De Giori et al., 1983), Arzúa (Centeno et al., 1994), San Simón (Fontán et al., 2001), León (Medina et al., 1995) e Cebreiro (Quinto et al., 1994; Centeno et al., 1996b). Segundo Kosikowski (1977) valores de 9 log (ufc/g) são normais em queijos produzidos com leite cru.

Para as três partidas elaboradas e maturadas no verão e no inverno observou-se aumentos constantes e significativos (Tabelas 1 e 2) na contagem total de microrganismos viáveis do leite até o queijo com 7 dias. Desse ponto para o 14^o dia houve diminuição significativa apenas para o período de altas temperaturas (verão), a partir do qual manteve contagens constantes até o 42^o dia e diminuindo significativamente no queijo com 2 meses. Já para os lotes processados no inverno houve um decréscimo do número de aeróbios mesófilos totais da 2^o para a 4^o semana, dessa etapa até o final do processo não foram detectadas diferenças.

Apesar de a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos no leite cru indicar o grau de contaminação, deve-se levar em conta que contagens elevadas durante a elaboração e as primeiras etapas da maturação dos queijos também são consequência da multiplicação da flora normal e desejável, majoritária em relação aos possíveis agentes patógenos e deteriorantes. Ao longo da maturação diminuiu gradualmente como consequência das condições físico-químicas, mais ou menos desfavoráveis, conforme o grupo microbiano que foi se instaurando durante o processo.

Os coeficientes de correlação obtidos entre os valores do pH e as contagens de aeróbios mesófilos totais no verão ($r = -0,819$) e no inverno ($r = -0,827$) (Tabelas 6 e 7) sugerem que esta flora possa estar principalmente constituída por microrganismos ácido-tolerantes. As correlações obtidas entre essas contagens e os valores de acidez titulável para as amostras do verão ($r = 0,607$) e para as do inverno ($r = 0,647$) estão de acordo com esta hipótese.

Aspecto higiênico
da produção → o que
materia

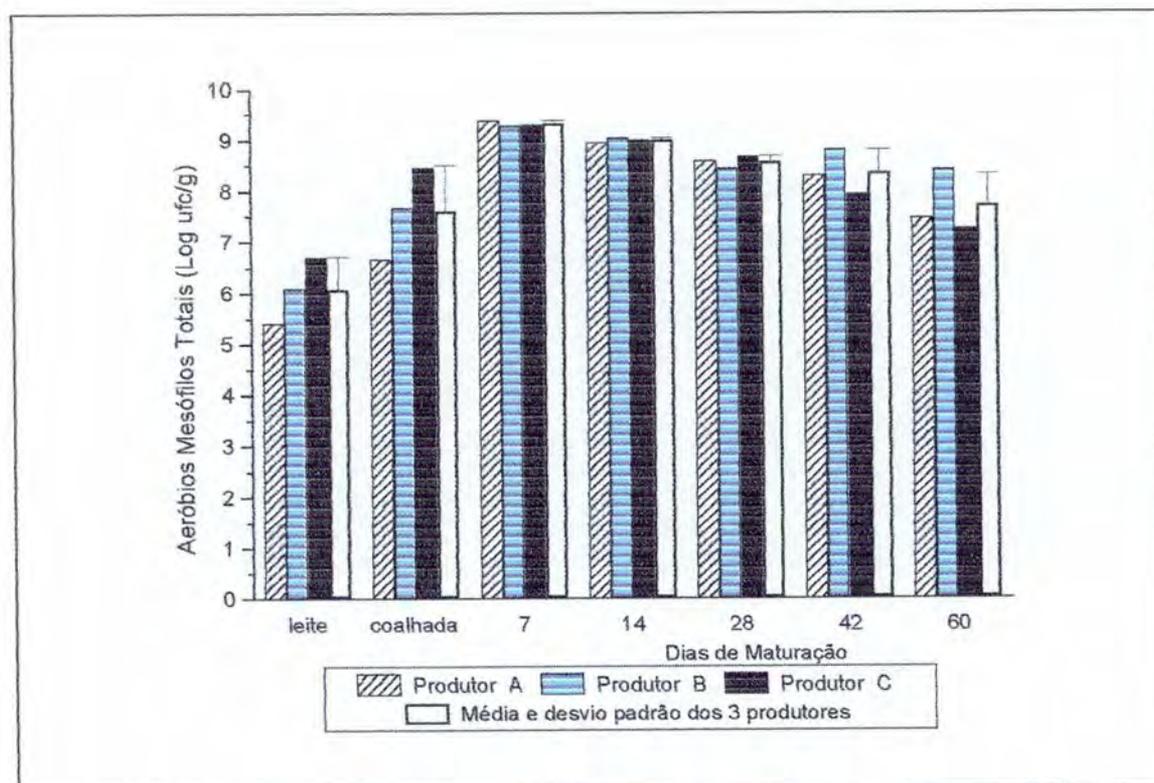


FIGURA 6 : Evolução das contagens totais de aeróbios mesófilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

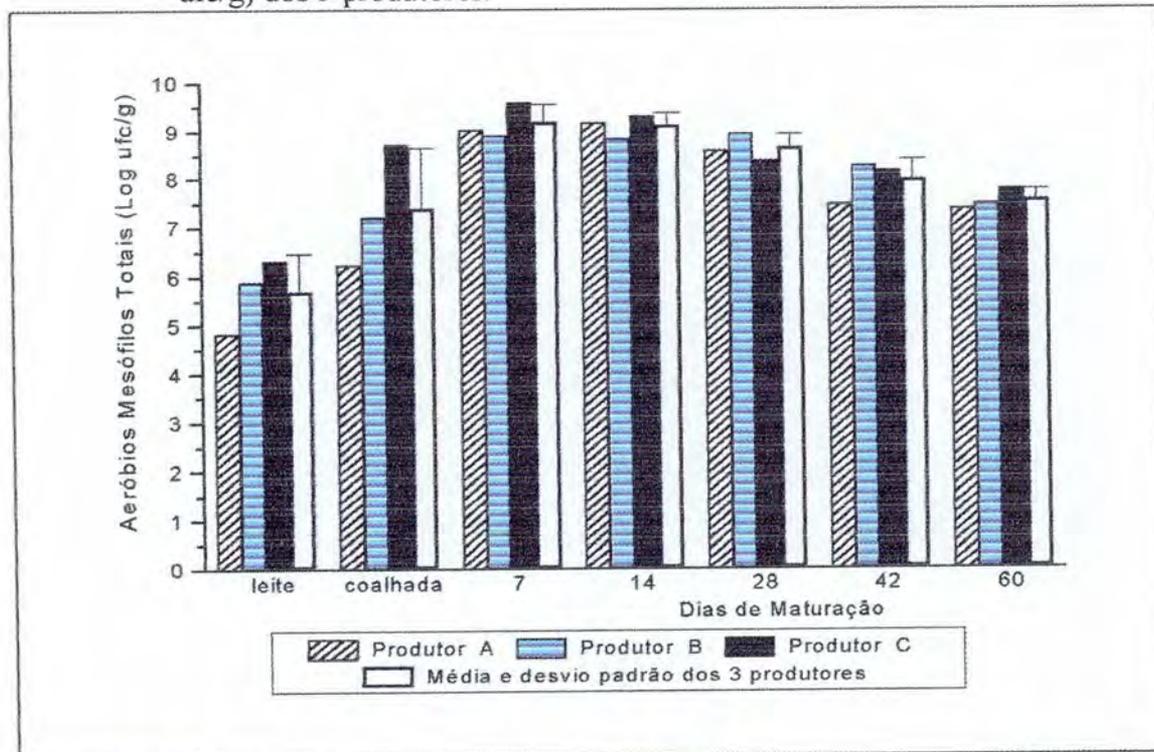


FIGURA 7 : Evolução das contagens totais de aeróbios mesófilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

4.1.2. Contagem Total de Aeróbios Psicrotróficos

As Figuras 8 e 9 mostram a evolução das contagens totais de aeróbios psicrotróficos durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno, respectivamente.

As contagens médias de microrganismos psicrotróficos no leite, 6,0 e 5,49 (log ufc/g) (Figuras 8 e 9), são similares aos dos utilizados para a elaboração de outros queijos de vaca, como o San Simón (Fontán et al., 2001) e o León (Medina et al., 1995). Nuñez et al. (1984) também encontraram valores médios semelhantes para o leite de ovelha, 4,92 (log ufc/g) para o grupo de 81 amostras provenientes de fazendas e 6,04 (log ufc/g) para o grupo de 60 amostras de laticínios.

Observou-se um aumento significativo (Tabelas 1 e 2) do número de ufc de psicrotróficos do leite até a primeira semana de maturação, atingindo valores em torno de 8,0 (log ufc/g), que são similares àqueles encontrados para outros queijos elaborados com leite de vaca, San Simón (Fontán et al., 2001) e León (Medina et al., 1995). Contagens inferiores, em torno de 3,90 (log ufc/g), foram verificadas nos queijos de ovelha Villalón (Santos et al., 1996) e Manchego (García et al., 1987), porém estes foram elaborados com leite pasteurizado.

A partir da contagem máxima atingida no 7^o dia observou-se um declínio constante até o final do período de 60 dias. Porém essa diminuição foi muito mais acentuada no verão (3 log) (Figura 8) em relação ao inverno (1 log) (Figura 9), devido, provavelmente, às condições ambientais do período de janeiro a março, que contribuíram para um decréscimo mais rápido dessa população microbiana, o que está de acordo com o coeficiente de correlação entre a a_w e esses microrganismos no verão ($r = 0,548$) (Tabela 6).

A alta quantidade de psicrotróficos, da ordem de $10^7 - 10^8$ ufc/g, registrada no queijo, principalmente na época de junho a agosto (inverno) (Figura 9), representa um risco potencial de deterioração desse produto; esse problema torna-se ainda mais grave pois a maioria dos queijos são vendidos com no máximo 30 dias e os consumidores os armazenam à temperatura de refrigeração.

Há uma diferença significativa para a contagem de psicrotróficos do queijo com 60 dias em relação a todos os anteriores, tanto no verão quanto no inverno (Tabelas 1 e 2), mostrando que o período de maturação de 2 meses foi fundamental para a redução da contagem desses microrganismos. Apesar desse grupo não ter sido muito afetado pelos efeitos inibitórios do pH e da concentração salina, o efeito combinado desses parâmetros com a atividade de água, pode ser responsável pela diminuição desse grupo microbiano.

A população de psicrotróficos do Queijo Serrano é constituída, no verão, principalmente, por coliformes totais ($r = 0,791$) e fecais ($r = 0,823$), lactococos ($r = 0,528$) e

mesófilos ($r = 0,578$). Já no inverno houve um predomínio de lactococos ($r = 0,838$), lactobacilos ($r = 0,730$) e mesófilos ($r = 0,895$) (Tabelas 6 e 7).

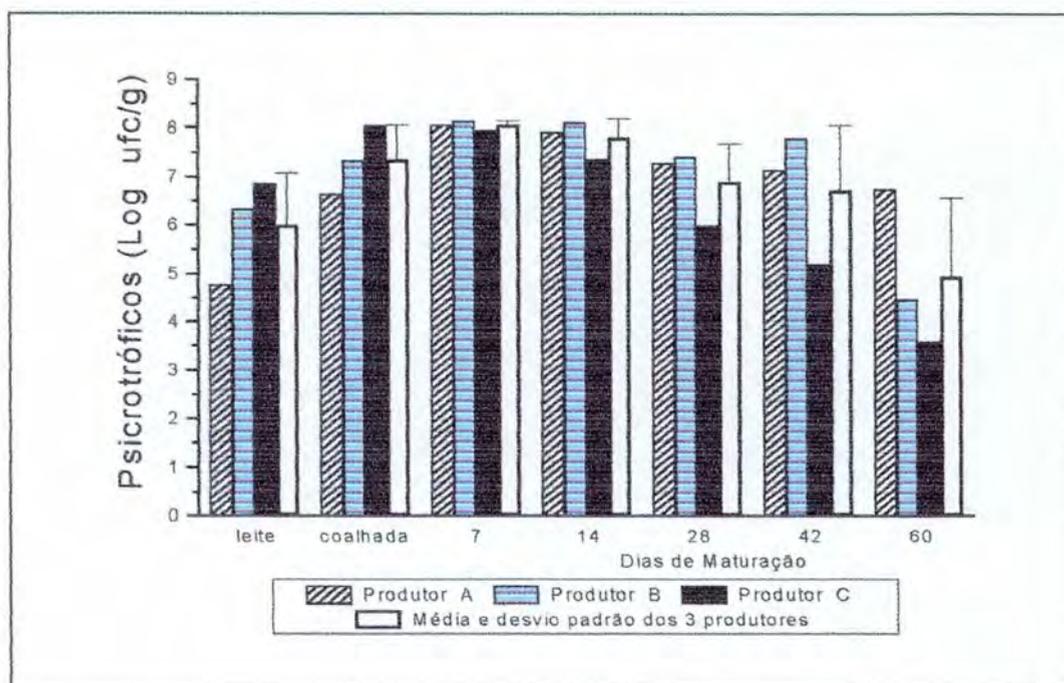


FIGURA 8 : Evolução das contagens totais de aeróbios psicrotróficos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

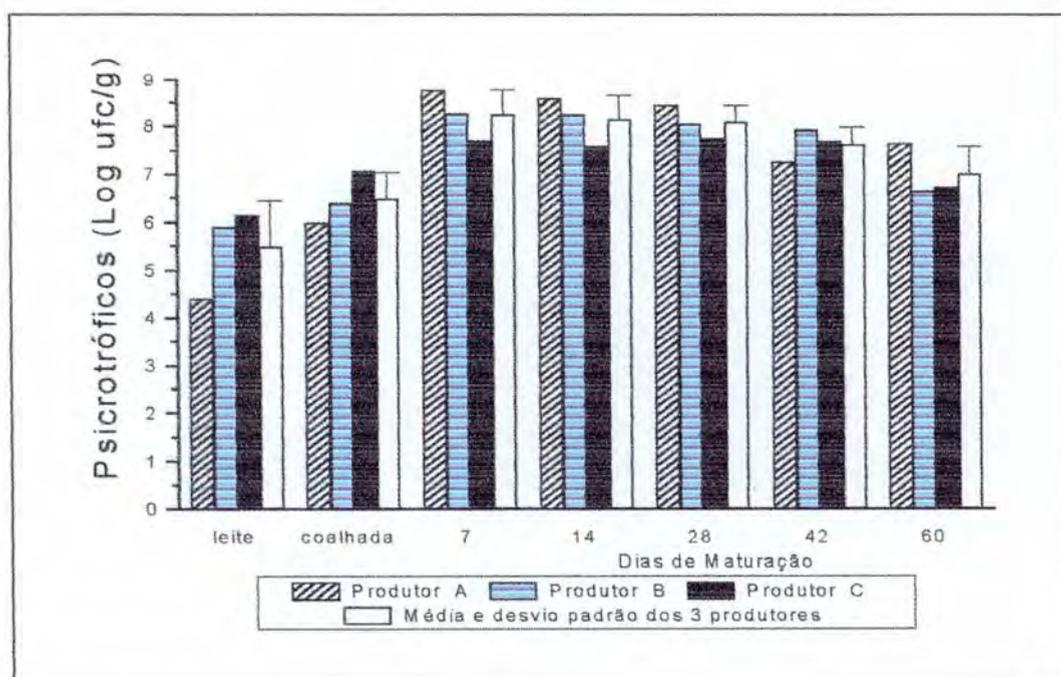


FIGURA 9 : Evolução das contagens totais de aeróbios psicrotróficos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

4.1.3. Contagem de Proteolíticos e Lipolíticos

As Figuras 10 a 13 mostram a evolução das contagens de proteolíticos e lipolíticos durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

As contagens médias, em torno de 5,0 (log ufc/g) para os microrganismos proteolíticos (Figuras 10 e 11), e de 10^4 - 10^5 ufc/g para os lipolíticos (Figuras 12 e 13), nesse leite, são inferiores aos valores médios, em torno, de 10^6 ufc/g para ambas as contagens, encontradas por Tavarina e Malcata (1998), em leite cru de ovelha.

Após, observou-se um aumento significativo (Tabelas 1 e 2) na população de proteolíticos até o 14^o dia, atingindo as contagens máximas de 8,0 e 9,0 (log ufc/g) para os queijos maturados no verão e no inverno, respectivamente. Em seguida, apresentaram um declínio constante até o queijo de 60 dias para ambos os períodos analisados. Os resultados observados ao longo da maturação do Queijo Serrano, 7,0 a 9,0 (log ufc/g), foram superiores aos encontrados em queijo Prato, elaborado com leite B, na região de Campinas (Martins et al., 1979), e em queijo Minas padronizado, elaborado com leite C (Gomes e Bonassi, 1996).

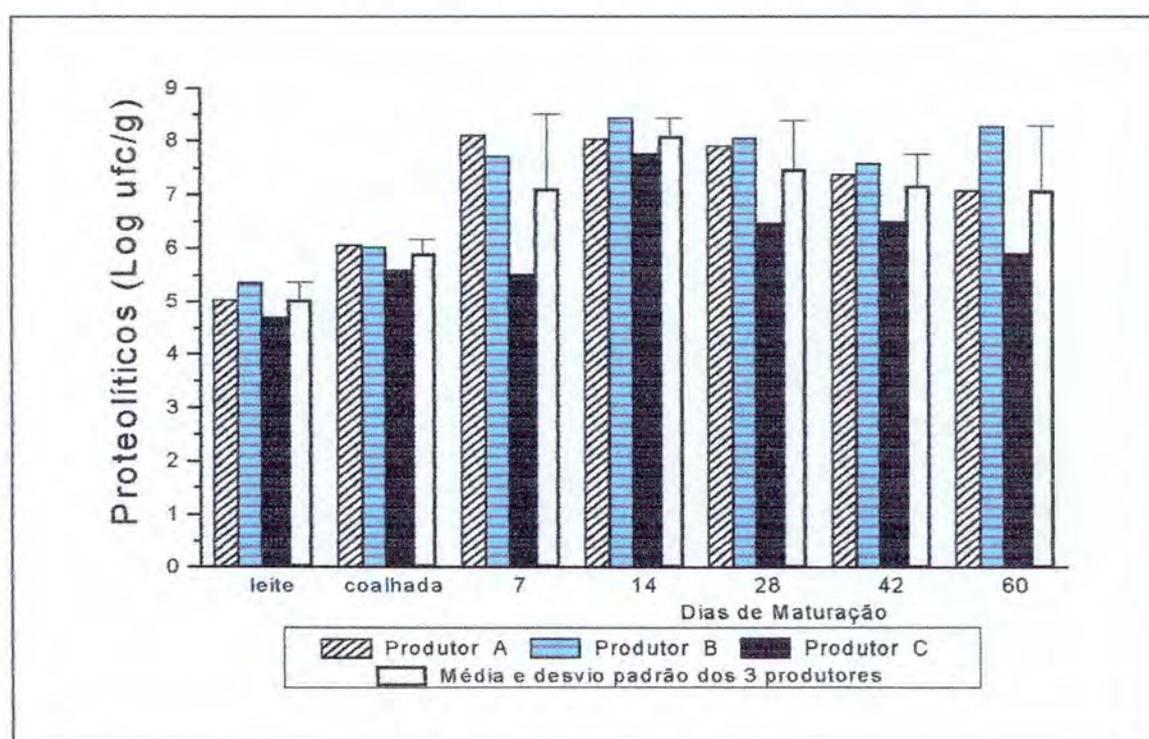


FIGURA 10: Evolução das contagens de proteolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

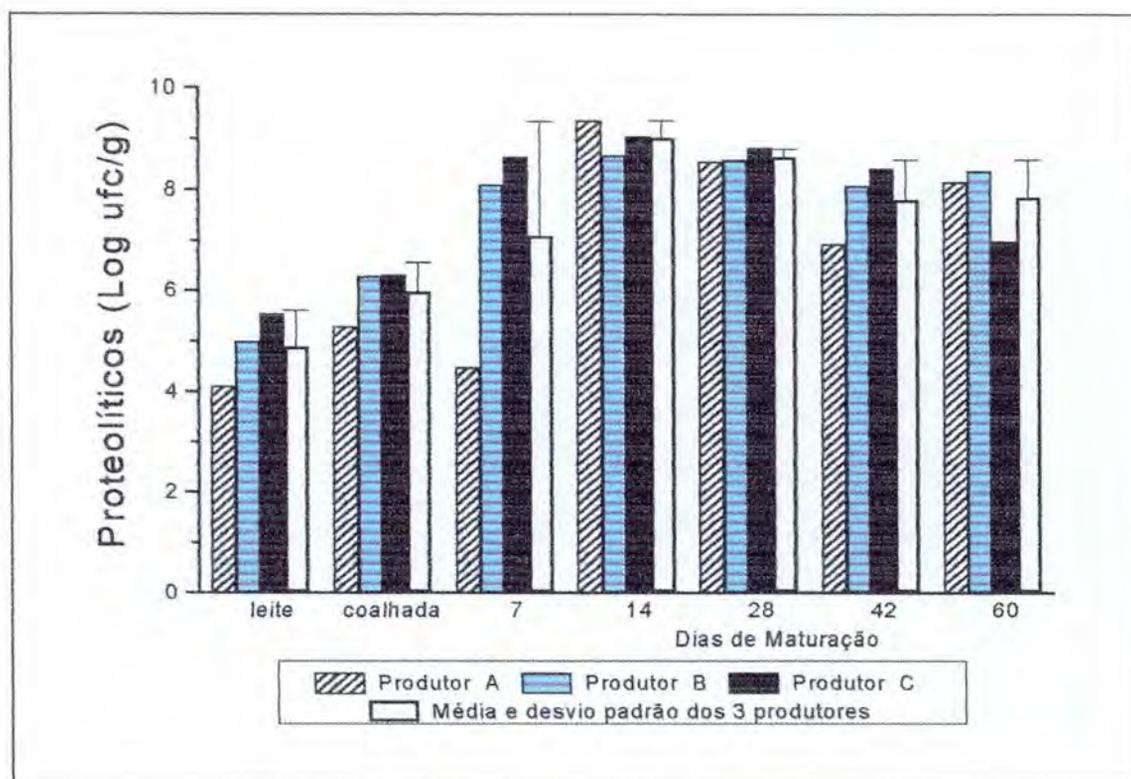


FIGURA 11: Evolução das contagens de proteolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

A população de lipolíticos manteve contagens constantes, em torno de 5-6 (log ufc/g), para os queijos maturados no verão e no inverno (Tabelas 1 e 2). Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados em queijo Minas padronizado, elaborado com leite C (Gomes e Bonassi, 1996), porém inferiores aos do queijo Minas prensado (Gomes e Bonassi, 1995).

As contagens de microrganismos proteolíticos foram maiores que aquelas de lipolíticos ao longo da elaboração e manufatura do Queijo Serrano, tanto no inverno quanto no verão (Figuras 10 a 13); isso pode ser um indicativo de que esse queijo apresenta uma maior atividade proteolítica do que lipolítica, o que é comum em queijos desse tipo, ou seja, com um período de maturação curto (2 meses). Hatzikamari et al. (1999) no queijo grego Anevato, elaborado com leite cru de cabra, também registraram uma maior população de microrganismos proteolíticos que de lipolíticos.

Os coeficientes de correlação obtidos entre os valores da acidez titulável e as contagens de proteolíticos no verão ($r=0,733$) e no inverno ($r=0,675$) sugerem que esta população possa estar principalmente constituída por microrganismos ácido-tolerantes. As correlações obtidas entre essas contagens e os valores do pH para as amostras do verão ($r=-0,758$) e para as do inverno ($r=-0,701$) estão de acordo com esta hipótese (Tabelas 6 e 7).

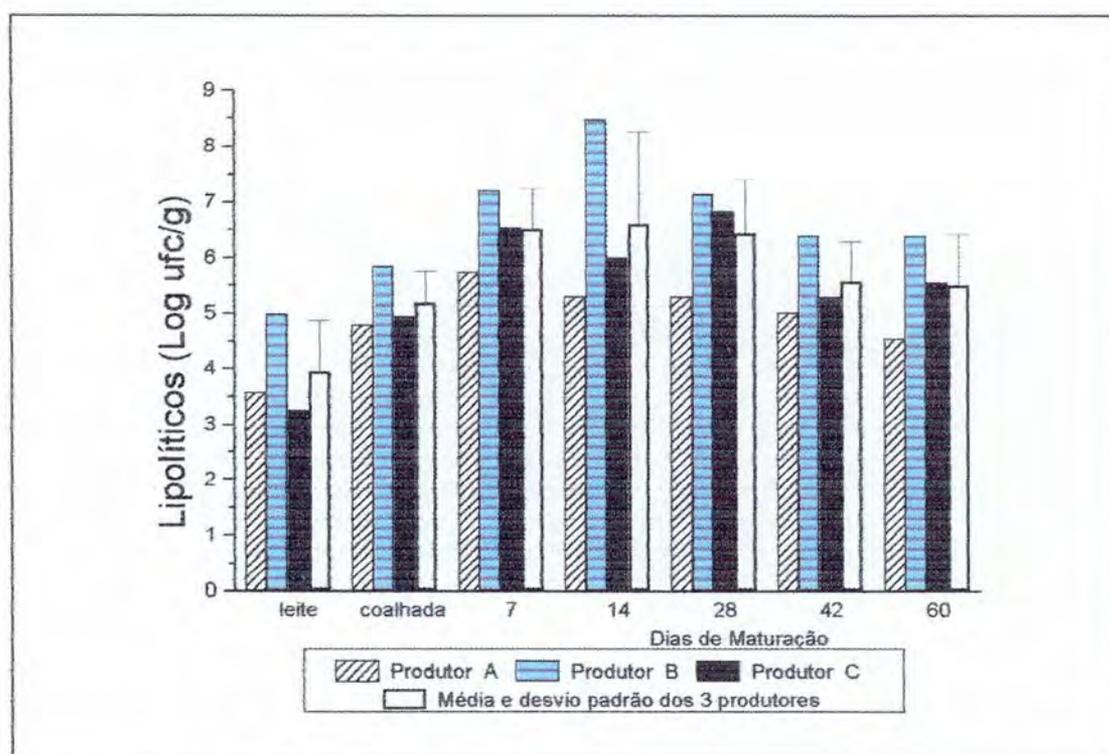


FIGURA 12: Evolução das contagens de lipolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

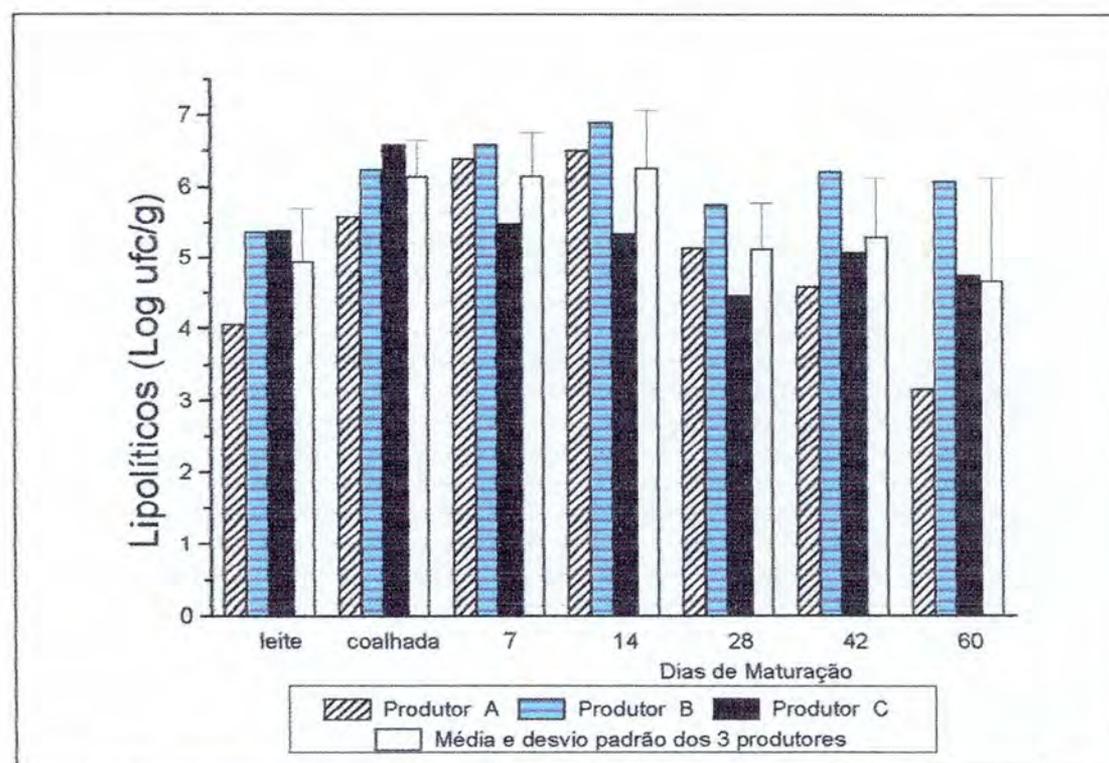


FIGURA 13: Evolução das contagens de lipolíticos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

4.1.4. Contagem de Lactobacilos e Lactococos

As Figuras 14 a 17 mostram a evolução das contagens de lactobacilos e lactococos durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

Estes grupos microbianos constituíram a microflora principal no leite, na coalhada e no queijo ao longo do seu processo de maturação, sugerindo que esta flora desempenhe um importante papel no desenvolvimento das características organolépticas do Queijo Serrano.

Nas contagens de bactérias lácticas em ágar Rogosa (lactobacilos) das amostras processadas no verão (Tabela 1) não houve variações significativas entre o leite e a coalhada, porém, um aumento significativo de 2,8 unidades logarítmicas foi registrado durante os 7 dias de maturação, a partir do qual permaneceu constante até o final do processo. A contagem de bactérias lácticas em ágar M17 (lactococos) aumentou de forma significativa e constante do leite até o queijo de 7 dias, onde essa população de microrganismos atingiu seu número máximo, 9,30 (log ufc/g); diminuindo significativamente para o queijo de 14 dias e após permaneceu constante do 14^o para o 60^o dia.

A população de lactobacilos e lactococos no inverno aumentou do leite até o 7^o dia e em seguida permaneceu constante até o final do período (Tabela 2).

Verificou-se que as contagens de lactococos, do leite até o queijo de 14 dias, foram de 10¹ até 10³ vezes maiores que as de lactobacilos (Figuras 14 a 17); e nas etapas seguintes ambas foram semelhantes, devido ao crescimento intenso da população de lactobacilos durante a fase final; de modo que esses atingiram uma contagem máxima no queijo com 28 dias de maturação. O mesmo foi observado por Fontán et al. (2001) no queijo San Simón, no qual a contagem máxima no meio de cultura Rogosa ocorreu na quarta semana do processo de cura.

Como no presente estudo, Ordóñez e Burgos (1977) observaram um aumento na proporção de lactobacilos durante a maturação do queijo Ulloa, elaborado com leite cru de vaca. Tornadijo et al. (1995) constataram que os lactobacilos foram o grupo microbiano dominante nos estágios finais da maturação do queijo Armada, elaborado artesanalmente com leite cru de cabra; vários outros autores observaram resultados similares em diferentes tipos de queijo, tais como o Tafi (De Giori et al., 1983), o La Serena (Fernandez del Pozo et al., 1988), o Gredos (Medina et al., 1992), o Afuega'l Pitu (Cuesta et al., 1996) e os queijos gregos Feta e Teleme (Tzanetakis e Litopoulou-Tzanetaki, 1992).

No queijo Minas padronizado elaborado com leite tipo C, Gomes e Bonassi (1996), observaram, a partir do 12^o dia, uma elevação da população de lactobacilos, de forma que aos 24 dias de cura o número de lactobacilos foi mais elevado que o de lactococos, adicionados

como cultura “starter”. O mesmo foi reportado por Fontán et al. (2001) no queijo espanhol San Simón, elaborado com leite cru de vaca sem cultura láctica, onde a população de *Lactobacillus* spp., inicialmente inferior a de lactococos, cresceu constantemente fazendo com que a partir da 4^ª semana seu número supera-se a contagem de *Lactococcus* spp.

Segundo Peterson et al. (1990) ao longo do processo fermentativo dos queijos formam-se metabólitos que são melhor aproveitados por alguns microrganismos, principalmente pelos lactobacilos, com decréscimo dos lactococos.

Apesar do grande número de bactérias de diferentes grupos microbianos, as lácticas, enumeradas no ágar Rogosa e M17, foram os principais componentes da microflora total ao longo da produção e maturação deste queijo, uma vez que as contagens em todos pontos amostrados foram semelhantes ou, até mesmo, superiores as de microrganismos aeróbios mesófilos (Tabelas 1 e 2). A predominância de bactérias lácticas está de acordo com o alto coeficiente de correlação entre essas contagens e as da flora total durante o processo de maturação.

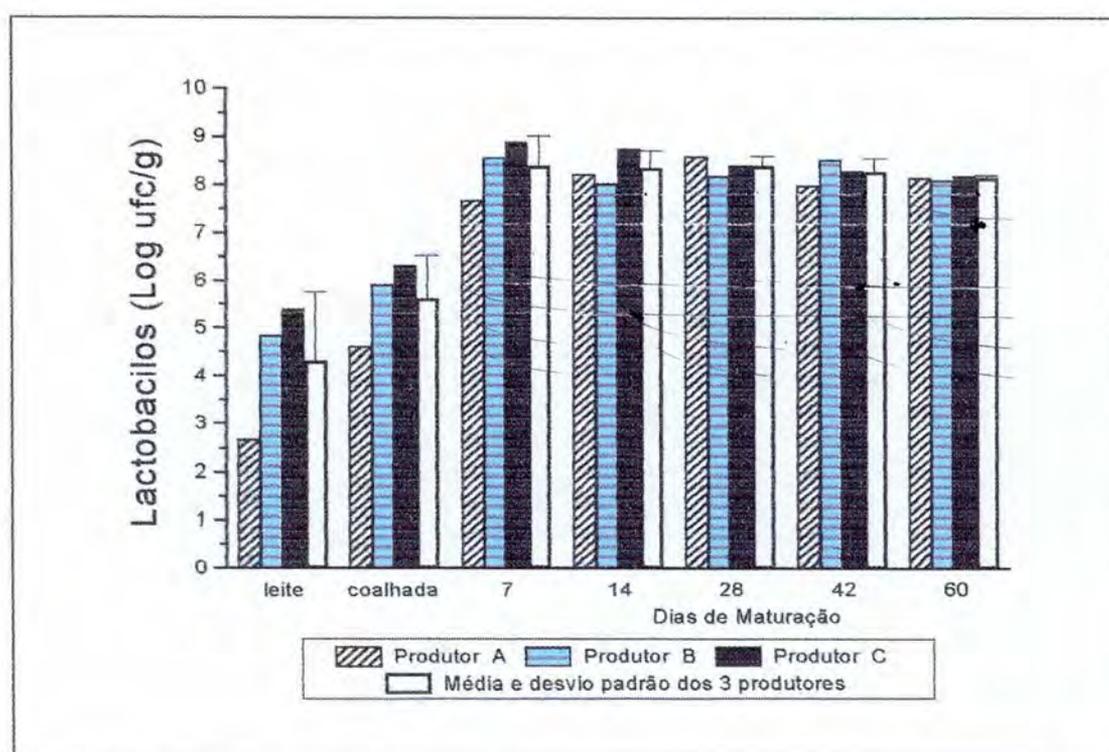


FIGURA 14: Evolução das contagens de lactobacilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores

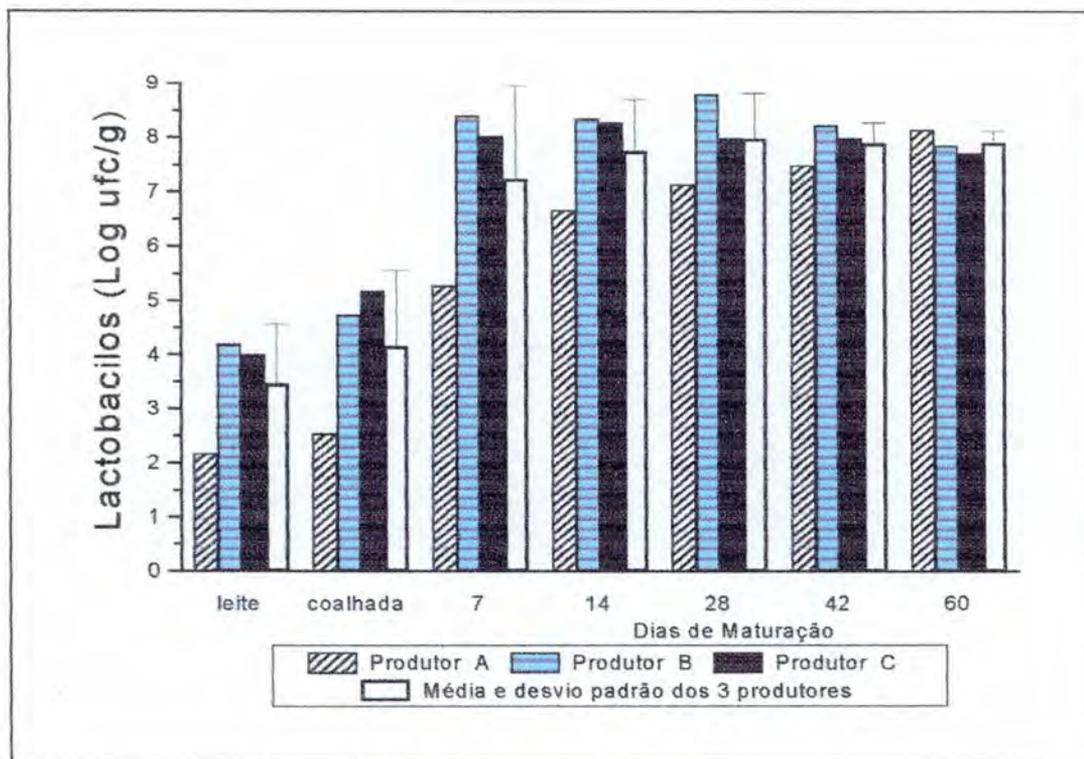


Figura 15: Evolução das contagens de lactobacilos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores

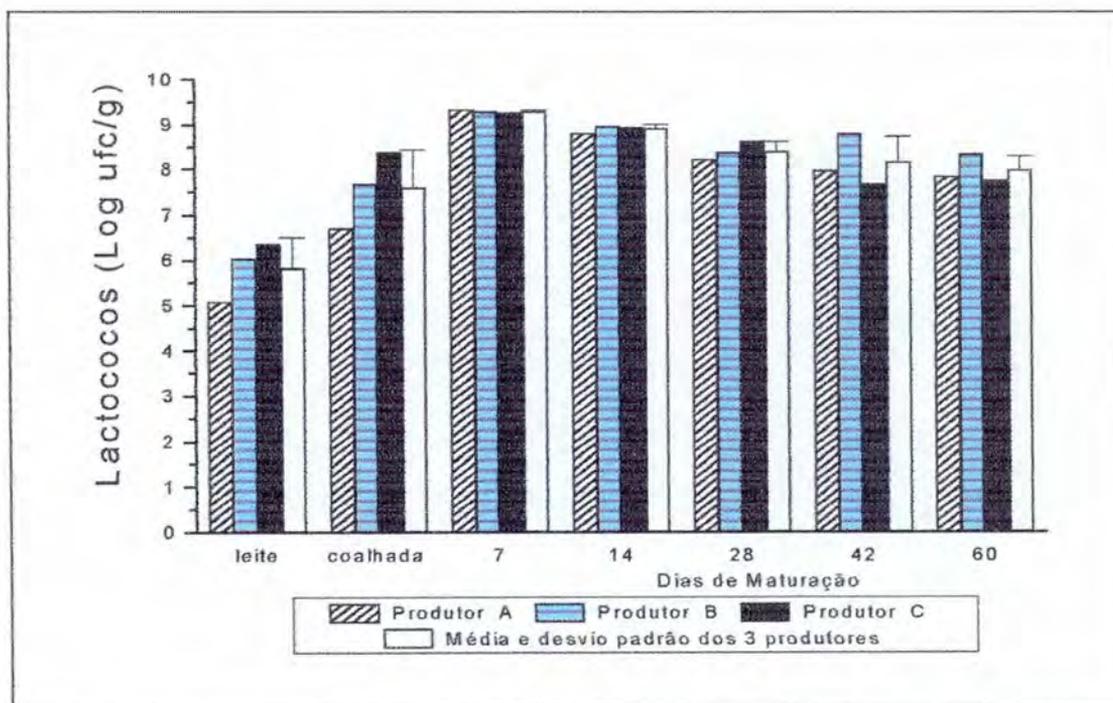


FIGURA 16: Evolução das contagens de lactococos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores

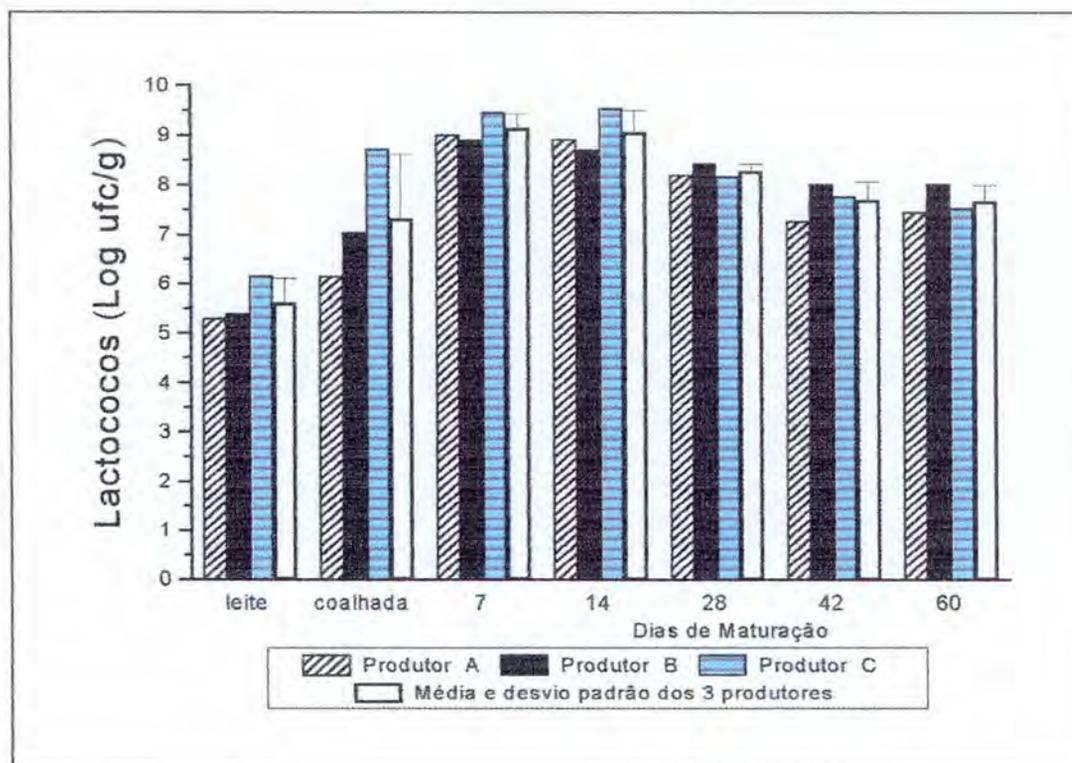


FIGURA 17 : Evolução das contagens de lactococos durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores

Os números de aeróbios mesófilos estão correlacionados com os números de microrganismos proteolíticos ($r = 0,704$ no verão; $r = 0,710$ no inverno), microrganismos lipolíticos ($r = 0,710$ no verão), lactococos ($r = 0,982$ no verão; $r = 0,977$ no inverno) e lactobacilos ($r = 0,849$ no verão; $r = 0,741$ no inverno); os números de microrganismos proteolíticos estão correlacionados com lactococos ($r = 0,691$ no verão; $r = 0,693$ no inverno) e lactobacilos ($r = 0,669$ no verão; $r = 0,870$ no inverno); e os números de microrganismos lipolíticos estão correlacionados com lactococos ($r = 0,735$ no verão) e lactobacilos ($r = 0,628$ no verão) (Tabelas 6 e 7). Portanto, isso indica que as bactérias lácticas constituíram-se na flora predominante durante a elaboração e maturação do Queijo Serrano e são, aparentemente, responsáveis pela maior parte das atividades lipolítica e, principalmente, proteolítica. Tavarina e Malcata (1998) obtiveram resultados semelhantes com o queijo português Serra da Estrela.

4.1.4.1. Evolução das bactérias lácticas

As Tabelas 4 e 5 apresentam as distribuições dos microrganismos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano, identificados nos meios de cultura M17 e Rogosa.

A Figura 18 ilustra a distribuição percentual, ao longo do processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano, das 431 bactérias lácticas identificadas.

Conforme mostram as Tabelas 4 e 5, no total foram obtidos 484 isolados, dos quais um era uma levedura, 16 não eram bactérias lácticas (Gram negativo e/ou catalase positiva) e 36 foram perdidos durante as etapas de purificação no meio MRS. No entanto, a maior parte (431) do número total de isolados foram classificadas como bactérias lácticas, pois apresentaram as seguintes características: Gram-positivo e catalase negativa; sendo, então, divididas em 4 gêneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*.

Dos isolados obtidos no ágar M17 (Tabela 4), 108 (46%) eram lactobacilos, 51 (21,6%) eram lactococos, 37 (16%) eram enterococos e 1 (0,4 %) era leuconostoc.

Sob estas condições muitos lactobacilos, enterococos e, provavelmente, outros tipos de bactérias foram contadas como lactococos, próprio da falta de seletividade do ágar M17 utilizado para o isolamento do último grupo. Vários autores têm demonstrado que o ágar M17 não é completamente seletivo para lactococos. Freitas et al. (1996) identificaram como enterococos 66% dos isolados obtidos desse meio. Centeno et al. (1996a), Menéndez et al. (2001) e Zárate et al. (1997) identificaram como lactococos, respectivamente, 55%, 50% e 42% das bactérias isoladas desse meio.

Segundo Tornadijo et al. (1995), somente 45,71% dos isolados obtidos desse meio foram classificados como lactococos, porém na coalhada e no queijo de 7 dias eles representaram 70% dos isolados do M17; já nas etapas finais de maturação os lactobacilos constituíram 57,5% dos isolados na 8^ª semana de maturação e 32,5% na 16^ª semana. Elortondo et al. (1998) identificou como *Lactococcus* spp. apenas 24% dos isolados obtidos do ágar M17, valor muito próximo ao obtido no Queijo Serrano.

No ágar Rogosa (Tabela 5), 212 (85%) eram lactobacilos, 17 (7%) eram enterococos, 2 (0,8%) eram lactococos e 3 (1,2%) eram leuconostoc.

O ágar Rogosa mostrou uma seletividade bastante elevada para o isolamento de lactobacilos. Característica semelhante foi observada por Tornadijo et al. (1995) que classificaram como tais, 86,07% dos isolamentos efetuados nesse meio. Apesar de o ágar Rogosa ser considerado um bom meio para a seleção de lactobacilos (Reuter, 1985), observou-se o crescimento de enterococos (17 isolados); mostrando a resistência destes microrganismos a ambientes ácidos (Sharpe, 1979). Já os lactococos foram isolados em

quantidade inferior, apenas 2 isolados, provavelmente devido ao pH (5,4) desse meio. No nosso estudo o ágar Rogosa mostrou uma seletividade maior que a observada por outros autores. Pouillet et al. (1993) identificaram como lactobacilos somente 39,3% dos isolamentos efetuados neste meio. Segundo López-Díaz et al. (2000), os enterococos representaram 77,5% dos isolados obtidos a partir desse meio. Há trabalhos mostrando que no ágar Rogosa podem crescer pediococos, leuconostoc e, às vezes, enterococos (Reuter, 1985). Kandler e Weiss (1986) relatam que, apesar dos lactobacilos crescerem bem no ágar Rogosa, este não é completamente seletivo e podem crescer nele outras bactérias lácticas como leuconostoc, pediococos, enterococos, bifidobactérias (em amostras intestinais) e inclusive leveduras.

O número de isolados perdidos do ágar Rogosa e M17 foi alto, especialmente nos dois primeiros pontos de amostragem (leite e coalhada) (Tabelas 4 e 5). Como todas essas perdas ocorreram durante a fase de purificação (cultivos alternados em caldo e ágar MRS) suspeita-se que, possivelmente, estes isolados não eram bactérias lácticas, tendo em vista a dificuldade que tiveram para crescer no meio MRS. Fato semelhante foi observado por Tornadijo et al. (1995) no queijo de Armada.

Segundo Reuter (1985) os meios MRS e M17 são eletivos enquanto o ágar Rogosa é um meio seletivo.

Como mostra a Figura 18 os lactobacilos foram o grupo microbiano mais abundante no Queijo Serrano, representando 74% das bactérias lácticas isoladas, seguido pelos enterococos e lactococos, cada um com, aproximadamente, 12,5% dos isolados. Os leuconostoc representaram apenas 1% das bactérias lácticas. Os lactobacilos dominaram ao longo de todo o processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano, principalmente nas etapas finais do processo, sugerindo que estes microrganismos desempenhem um importante papel na produção deste queijo e poderiam fazer parte da sua cultura láctica. Os lactobacilos podem, inclusive, participar do desenvolvimento do sabor e aroma do Queijo Serrano, devido as suas atividades lipolíticas e proteolíticas (López-Díaz et al., 2000).

Os *Lactobacillus* spp. também foram o gênero mais encontrado no queijo venezuelano Tipo-Palmita (Ocando et al., 1991). Segundo Centeno et al. (1996a) os lactobacilos homofermentativos mesófilos deveriam ser incluídos como "starter" para a elaboração do queijo Arzúa-Ulloa. Vários autores relatam que o queijo é um meio ideal para o crescimento de lactobacilos mesófilos (Laleye et al., 1990; Peterson e Marshall, 1990).

Talvez a baixa proporção de lactococos e leuconostoc nos isolados lácticos do Queijo Serrano seja função da adição de sal já no leite, durante a preparação dos queijos, inibindo o

crescimento desses microrganismos que são sensíveis ao sal. Os lactobacilos são mais resistentes ao NaCl que os lactococos e os leuconostoc (Sharpe, 1979; López e Mayo, 1997).

Talvez a pouca seletividade observada nesse trabalho para o isolamento de lactococos no M17, seja uma consequência destes já estarem em quantidades inferiores aos *Lactobacillus* spp. no Queijo Serrano, deste as etapas iniciais; pois segundo Fox et al. (2000) este meio de cultura é seletivo para lactococos nas primeiras fases da maturação, quando estas bactérias são os microrganismos mais numerosos, porém à medida que o queijo matura essa população tende a diminuir e o M17 torna-se, então, menos seletivo.

A pouca quantidade de *Leuconostoc* spp. e lactobacilos heterofermentativos corrobora com a hipótese do item 4.1.7, de que o grande número de olhaduras desse queijo seja decorrência da sua alta contagem de coliformes totais e fecais.

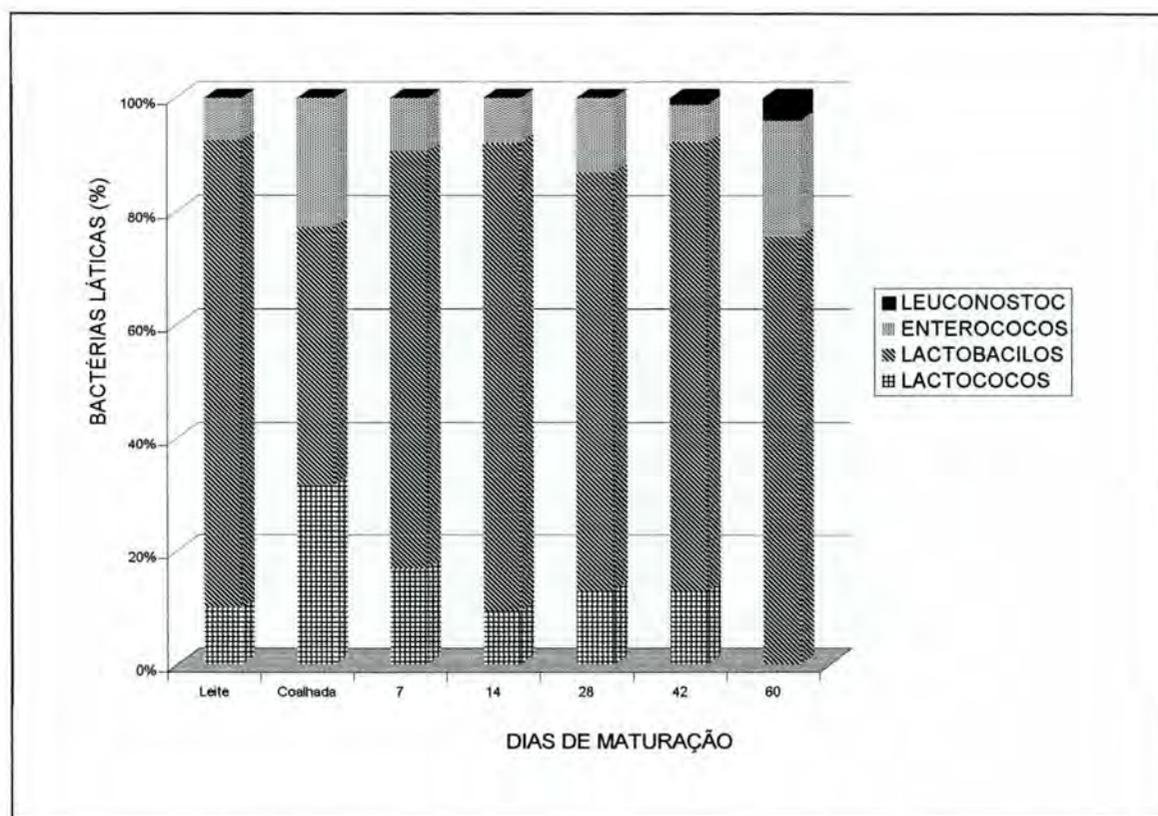


FIGURA 18: Evolução dos gêneros de bactérias lácticas (431 isolados) durante a elaboração e maturação do Queijo Serrano. Porcentagem de cada gênero isolado dos dois meios de cultura (M17 e Rogosa) em cada estágio.

TABELA 4: Distribuição dos microrganismos isolados do meio de cultura M17 ao longo do processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano (3 bateladas do verão e 3 bateladas do inverno)

Microrganismos	Leite		Coalhada		Etapa de Maturação (dias)										Total	
					7		14		28		42		60			
	Nº de isolados	(%)	No de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)
Lactococos	4	13	12	40	9	30	6	20	10	26	10	26	-	-	51	21,6
Lactobacilos	7	23	4	13	14	47	15	50	19	50	24	61	23	59	106	45
Lb. Heterofer.	-	-	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	1	2,5	2	1
Enterococos	2	7	5	17	1	3	2	7	8	21	5	13	14	36	37	16
Leuconostoc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	1	0,4
Bact. não lácticas	3	10	3	10	4	13	1	3	1	3	-	-	-	-	12	5
Leveduras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isolados Perdidos	14	47	6	20	2	7	5	17	-	-	-	-	-	-	27	11
Total	30	100	30	100	30	100	30	100	38	100	39	100	39	100	236	100

TABELA 5 : Distribuição dos microrganismos isolados do meio de cultura Rogosa ao longo do processo de elaboração e maturação do Queijo Serrano (3 bateladas do verão e 3 bateladas do inverno)

Microrganismos	Leite		Coalhada		Etapa de Maturação (dias)										Total	
					7		14		28		42		60			
	Nº de isolados	(%)	No de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)	Nº de isolados	(%)
Lactococos	-	-	2	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,8
Lactobacilos	24	80	16	53	25	78	36	92	34	87	36	92,5	31	80	202	81
Lb. Heterofer.	2	7	-	-	-	-	-	-	3	8	1	2,5	4	10	10	4
Enterococos	1	3	5	17	4	13	3	8	2	5	-	-	2	5	17	7
Leuconostoc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2,5	2	5	3	1,2
Bact. não lácticas	-	-	1	3	2	6	-	-	-	-	1	2,5	-	-	4	1,6
Leveduras	-	-	-	-	1	3	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,4
Isolados Perdidos	3	10	6	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	4
Total	30	100	30	100	32	100	39	100	39	100	39	100	39	100	248	100

4.1.5. Contagem de Halotolerantes (*Micrococcaceae*)

As Figuras 20 e 21 mostram a evolução das contagens de halotolerantes durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno, respectivamente.

As contagens médias, em torno de 5,0 (log ufc/g), de microrganismos halotolerantes nesse leite (Figuras 20 e 21) são similares às encontradas por Fontán et al. (2001) em leite cru de vaca e por Tornadijo et al. (1995) em leite cru de cabra.

Observou-se um aumento significativo (Tabelas 1 e 2) do número de ufc até a coalhada, atingindo valores em torno de 6,0 (log ufc/g). Porém a partir dessa etapa a evolução desse grupo microbiano foi diferente para os dois períodos analisados. No inverno a contagem se manteve constante até o final da maturação (Tabela 2), enquanto que no verão (Tabela 1) foram observadas diferenças ao longo do processo; a contagem da coalhada foi semelhante ao do queijo de 7 dias e, após atingir a contagem máxima no 7^o dia, houve um declínio constante até o final do período de 60 dias. Essa diminuição mais acentuada provavelmente é decorrente das condições ambientais do período de janeiro a março, que contribuíram para um decréscimo mais rápido dessa população microbiana, o que está de acordo com o alto coeficiente de correlação entre a a_w e esses microrganismos no verão ($r = 0,732$) (Tabela 6).

Os altos níveis encontrados de halotolerantes, entre 10^5 - 10^6 ufc/g (Figuras 20 e 21), no Queijo Serrano foram semelhantes aos de outros tipos de queijos, tais como, o Casar de Cáceres (Poulet et al., 1991), o Arzúa (Centeno et al., 1994), o Tetilla (Menéndez et al., 2001) e o San Simón (Fontán et al., 2001). Já nos queijos León (Medina et al., 1995), Cebreiro (Centeno et al., 1996b), Afuega'l Pitu (Cuesta et al., 1996) e Anevato (Hatzikamari et al., 1999) foram verificadas contagens para esse grupo microbiano de 2 a 3 unidades logarítmicas menores. Provavelmente o que influenciou nessa diferença de contagem foi o pH dos queijos ao longo da maturação, uma vez que esses microrganismos são ácido sensíveis; pois, nos queijos em que a população de halotolerantes esteve presente em alta quantidade, o pH se manteve em torno de 5,0, facilitando o desenvolvimento desses microrganismos. Já os que tiveram uma menor quantidade de halotolerantes apresentaram um pH de aproximadamente 4,0.

Segundo Tornadijo (1995) os valores de pH, em torno de 4,0, observados nas primeiras semanas de maturação do queijo Armada, poderiam ter contribuído para o decréscimo de algumas espécies desta família, refletindo na diminuição do número de micrococáceas. Além disso, Cuesta et al. (1996) relataram um redução desse grupo microbiano durante a primeira semana de maturação do queijo Afuega'l Pitu como uma consequência do baixo pH durante este período. Já González de Llano et al. (1992)

registraram uma maior contagem a partir do 30^o dia, o que, segundo ele, ocorreu devido ao aumento do pH, que facilitou o desenvolvimento desses microrganismos. Gómez et al. (1989) registraram contagens de 10^2 - 10^3 ufc/g para o queijo Majorero, cujo pH é de aproximadamente 5,0, porém este foi elaborado com leite pasteurizado, o que reduz o nível de microrganismos.

Como os halotolerantes foram encontrados em níveis significativos no Queijo Serrano, talvez eles tenham alguma contribuição para o processo de maturação, através de suas atividades lipolíticas e proteolíticas, influenciando na modificação da textura e no desenvolvimento do aroma, como acontece em outras variedades (Gobbetti et al., 1997a; Sablé et al., 1997; Zárate et al., 1997). A influência dessa população, através de suas capacidades lipolíticas e proteolíticas, pode ter sido mais importante nos queijos maturados no inverno, tendo em vista os coeficientes de correlação de 0,540 e 0,530 entre as contagens de halotolerantes e de microrganismos proteolíticos e lipolíticos, respectivamente (Tabela 7).

Porém, como microrganismos halotolerantes incluem principalmente a família *Micrococcaceae*, que compreende os gêneros *Micrococcus* e *Staphylococcus*, deve-se ficar atento para esse resultado, pois há um perigo potencial para a saúde dos consumidores caso isso signifique alto nível de *Staphylococcus aureus* coagulase positivo produtores de toxina.

Micrococcus
Staphylococcus
aureus

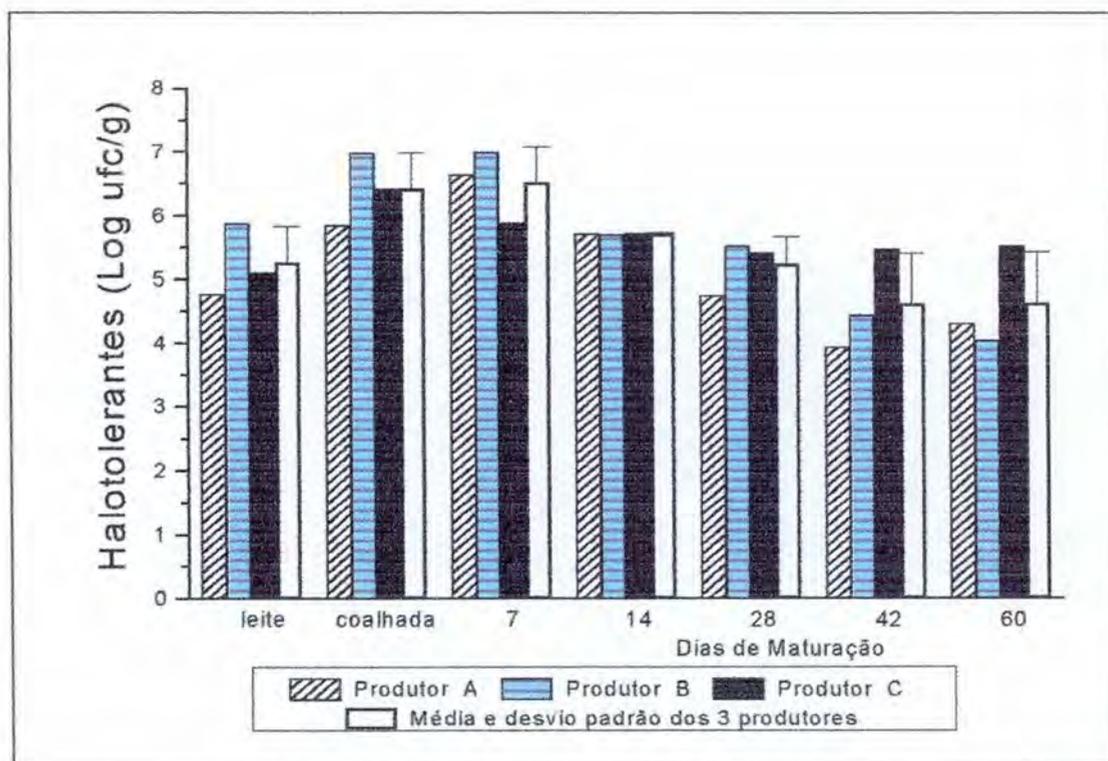


FIGURA 20 : Evolução das contagens de halotolerantes durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

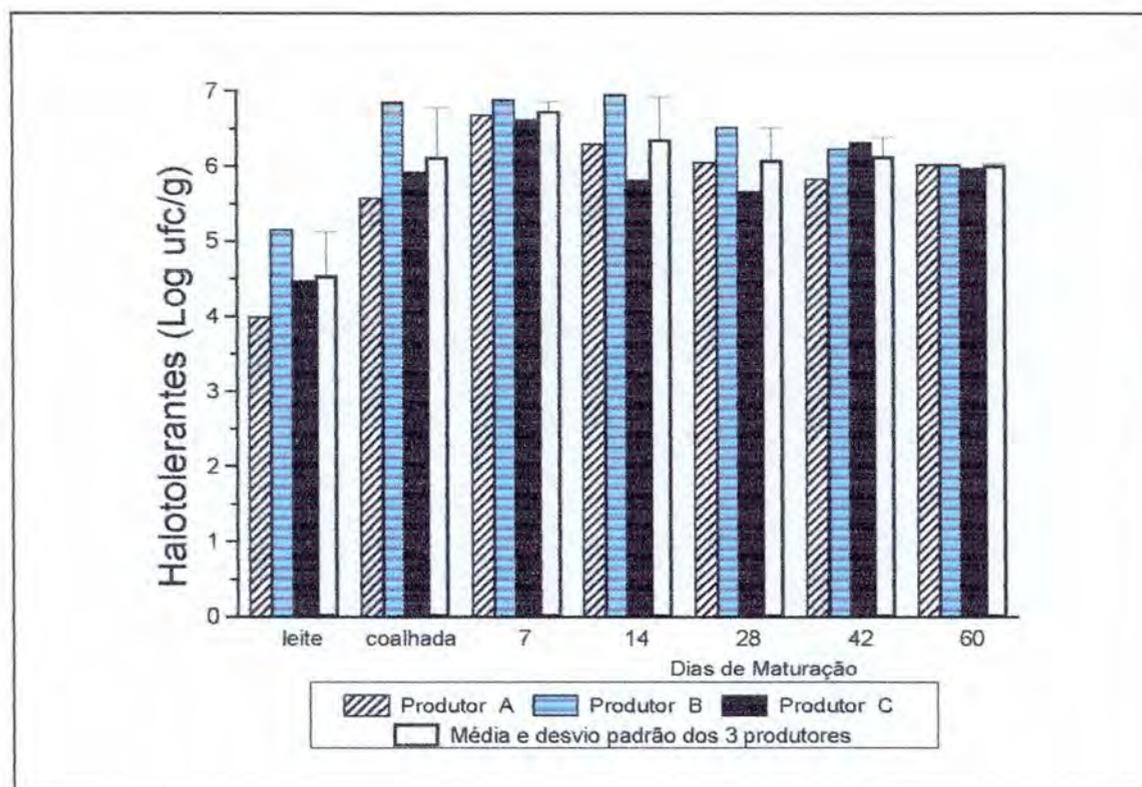


FIGURA 21: Evolução das contagens de halotolerantes durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

4.1.6. Contagem de Bolores e Leveduras

As Figuras 22 a 25 mostram a evolução das contagens de bolores e leveduras durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

A contagem de bolores para alguns produtores estava abaixo do limite mínimo de detecção da análise, <2 (log ufc/g), por isso a média nesses pontos representa as contagens de apenas um ou dois produtores.

Observou-se que não houve variações significativas tanto para as contagens de bolores como para as contagens de leveduras ao longo do processo de elaboração e maturação dos Queijos Serranos no inverno (Tabela 2). Porém, no verão, observou-se um aumento significativo (Tabela 1) para os dois grupos de microrganismos, do leite para o queijo de 7 dias, onde foram registrados os níveis máximos de 6,04 (log ufc/g) para o número de leveduras e de 4,7 (log ufc/g) para o número de bolores. Após isso houve um decréscimo constante e significativo até o queijo de 2 meses para ambas as populações microbianas.

Os números médios de bolores, 2-3 (log ufc/g), e de leveduras, 4 (log ufc/g), ao longo da maturação do Queijo Serrano, foram semelhantes aos encontrados em outras variedades de

queijos artesanais, como o Tetilla (Menéndez et al., 2001) e o Arzúa (Centeno et al., 1994), elaborados com leite cru de vaca. Logicamente as contagens de bolores encontradas nesse queijo são menores que aquelas encontradas em queijos maturados por fungos, tais como o Gamonedo (González de Llano et al., 1992) e o Gorgonzola (Gobbetti et al., 1997b).

As amostras foram coletadas do interior dos queijos, o que explica os baixos níveis de crescimento de bolores e leveduras. À medida que transcorre o tempo de maturação há um aumento da compactação da matriz do queijo, o que reduz a difusão de oxigênio requerido para a multiplicação dessas populações microbianas.

A flora dos queijos contém leveduras que se desenvolvem principalmente na superfície (Macedo et al., 1996). A dificuldade destes microrganismos em crescer no interior da massa pode ser a causa de sua baixa multiplicação no interior dos queijos espanhóis León (Medina et al., 1995) e Majorero (Gómez et al., 1989). Na comparação da microflora interna e externa do queijo artesanal Serra da Estrela Macedo et al. (1996) observaram que o número de leveduras diminuiu no interior e aumentou na superfície do queijo ao longo do período de maturação de 35 dias. Também no queijo grego Kopanisti, segundo Kaminarides e Anifantakis (1989), e no queijo espanhol La Serena, segundo Fernandez del Pozo et al. (1988), o número de bolores e leveduras foi significativamente maior na superfície.

Além disso a lavagem periódica da superfície dos queijos ao longo da maturação pode ter contribuído para que a população de bolores fosse baixa. Freitas et al. (1996) também relataram que a limpeza dos queijos foi provavelmente a principal razão para a ausência de bolores nas amostras do interior do queijo Picante.

Apesar dos números de leveduras terem sido em torno de 10^3 - 10^4 vezes menores que dos grupos de microrganismos dominantes no Queijo Serrano, elas podem, eventualmente, contribuir para o processo de maturação pela metabolização do ácido láctico e pelo desenvolvimento do sabor e aroma, através de suas enzimas lipolíticas e proteolíticas. A atividade metabólica das leveduras que consomem ácido láctico resulta em um aumento no pH e um decréscimo na acidez titulável. Em nosso caso, o aumento do pH e a diminuição da acidez titulável não foram muito visíveis durante o processo de maturação, o que permite-nos deduzir que a atividade de leveduras metabolizadoras de ácido láctico não é muito intensa durante a maturação.

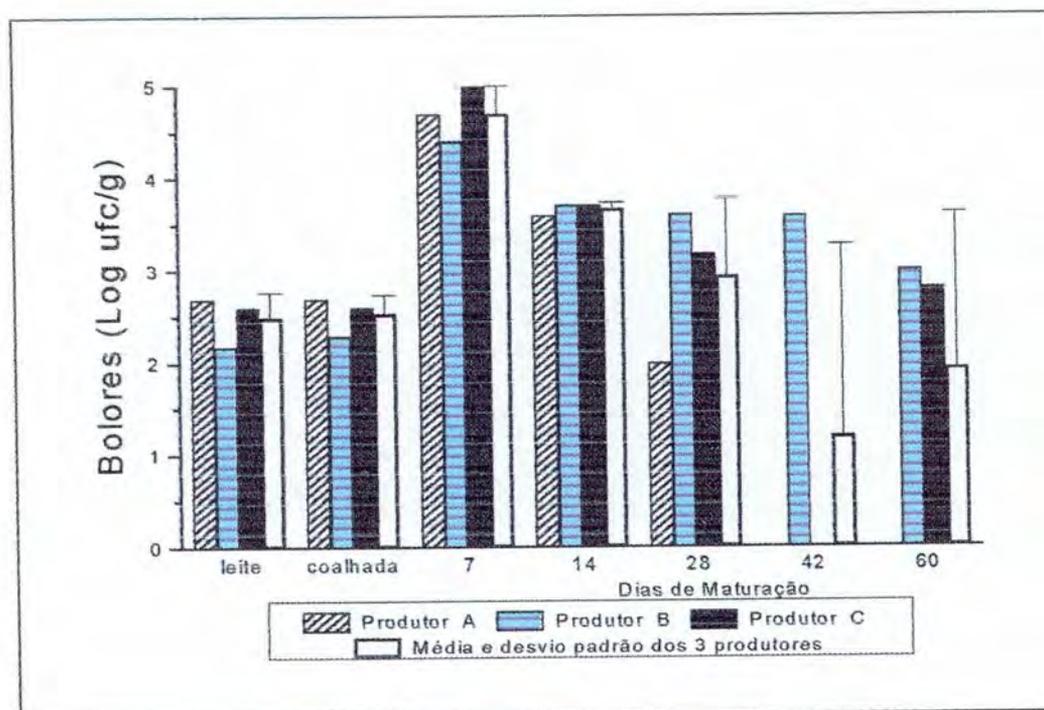


FIGURA 22: Evolução das contagens de bolores durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

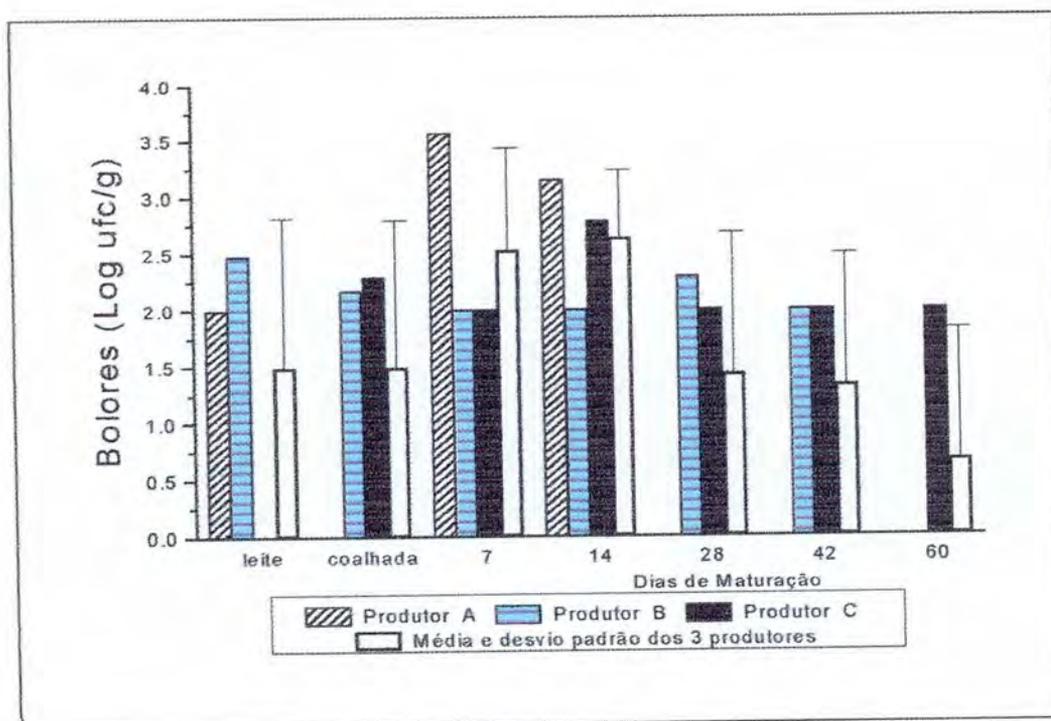


FIGURA 23: Evolução das contagens de bolores durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

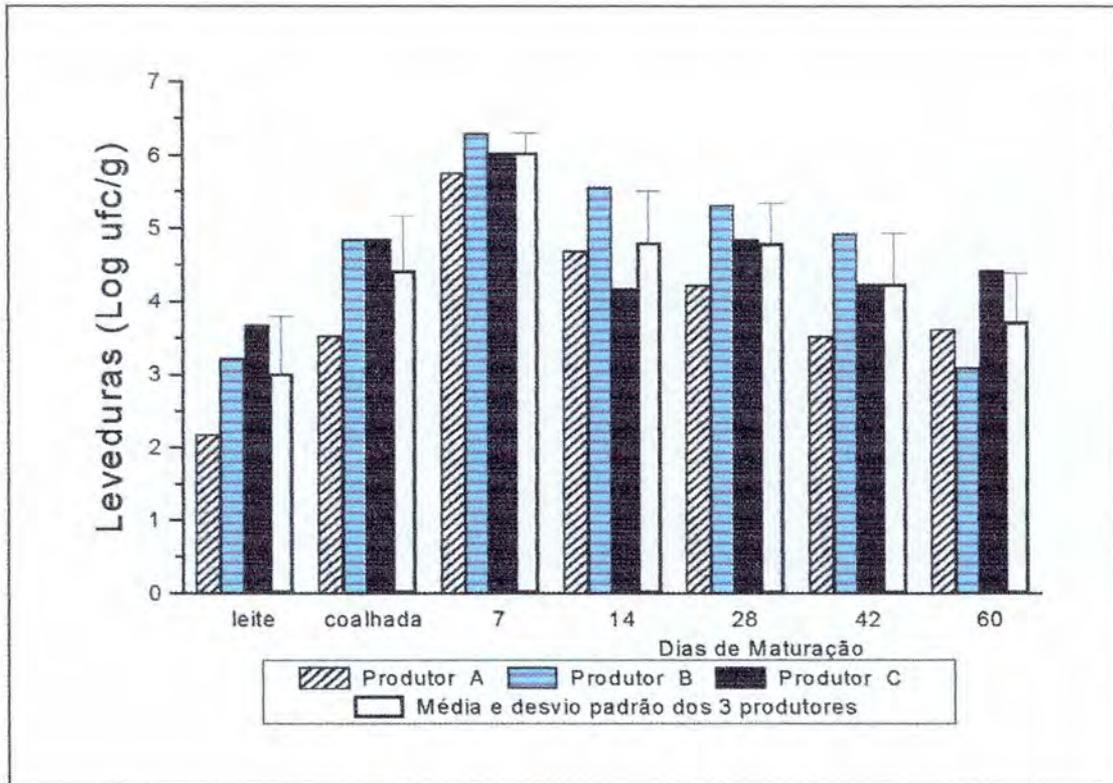


FIGURA 24 : Evolução das contagens de leveduras durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

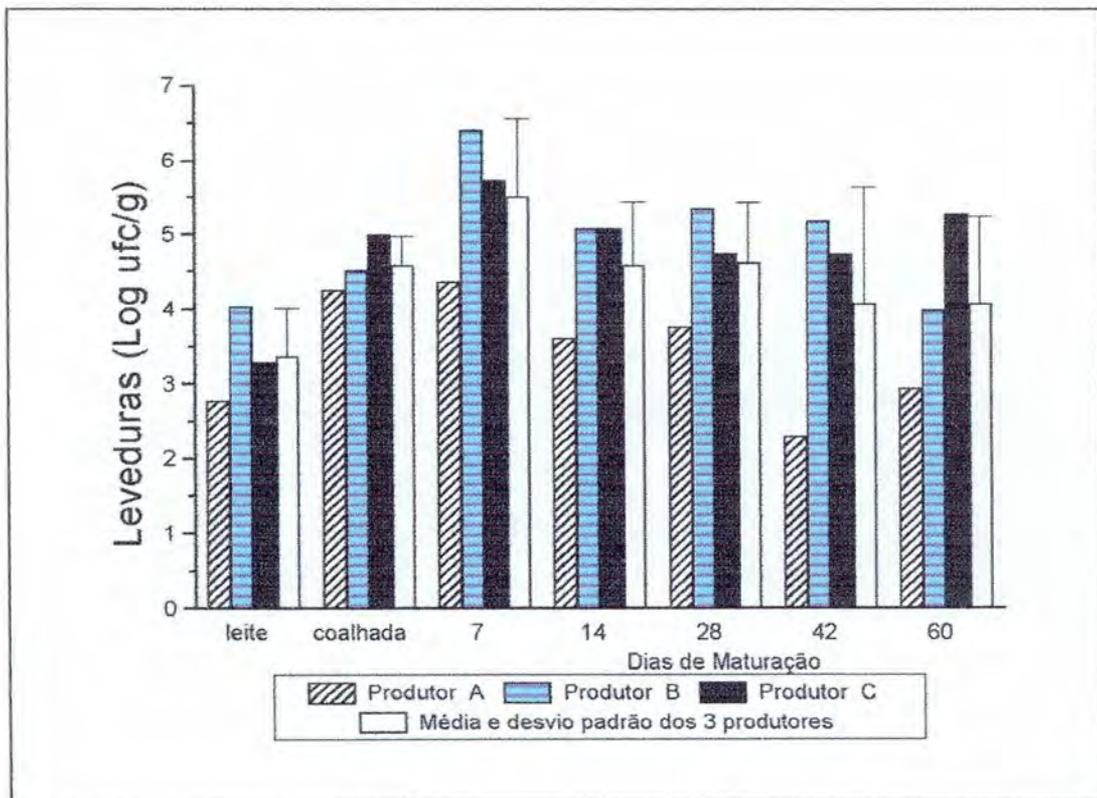


FIGURA 25: Evolução das contagens de leveduras durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

4.1.7. Contagem de Coliformes Totais e Fecais

As Figuras 26 a 29 mostram a evolução das contagens de coliformes totais e fecais durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

A contagem de coliformes totais e fecais para alguns produtores estava abaixo do limite mínimo de detecção da análise, <1 (log ufc/g), por isso a média nesses pontos representa as contagens de apenas um ou dois produtores.

As contagens de coliformes fecais e totais não tiveram variações significativas ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no período de temperaturas baixas (inverno) (Tabela 2).

No verão observou-se um aumento significativo (Tabela 1), de 1,7 log para a contagem de coliformes totais e 2,5 log na de coliformes fecais, do leite para o queijo com uma semana, onde se detectou a contagem máxima de 5,76 (log ufc/g) e 5,59 (log ufc/g), respectivamente. Do 7^o para o 42^o dia ambos os grupos reduziram significativamente e, diminuíram, ainda mais, no queijo com 2 meses. O tempo de maturação no verão teve uma influência significativa nas contagens dessas populações, de forma que os 60 dias de maturação foram importantes para a redução do número de coliformes totais e fecais. Uma característica importante, sob o aspecto higiênico-sanitário, é a ausência de coliformes fecais no final do processo para as três amostras de Queijos Serranos do verão (Figura 28).

A contagem de coliformes fecais no leite utilizado para a elaboração do Queijo Serrano (Figuras 28 e 29) foi superior ao 1,62 (log ufc/g) do leite cru de vaca do queijo Arzúa (Centeno et al., 1994), porém nesse queijo com 45 dias (último ponto amostrado) a contagem de 4,61 (log ufc/g) é maior que os 2 - 3 (log ufc/g) registrado no Queijo Serrano.

O número de coliformes totais do leite cru de vaca do queijo Afuega'l Pitu, 5,51 (log ufc/g) foi superior ao do leite do Queijo Serrano, porém eles desapareceram após 30 dias de maturação; provavelmente o baixo pH, em torno de 4,3, ao longo da maturação foi o responsável pelo contínuo decréscimo desses microrganismos (Cuesta et al., 1996).

As altas contagens de viáveis totais e de coliformes totais e fecais detectados no leite cru são um indicativo da pouca qualidade higiênica da matéria-prima usada na elaboração desta variedade de queijo.

Um comportamento semelhante ao da contagem de coliformes totais do Queijo Serrano, durante a primeira semana, foi observado por Estepar et al. (1999) no queijo espanhol Peñamellera, elaborado com leite cru de vaca sem adição de cultura "starter", no qual os coliformes cresceram até o 7^o dia, atingindo a contagem máxima de $6,5 \times 10^6$ ufc/g.

O que observamos que com o tempo a contagem de coliformes diminui.

Fontán et al. (2001) também obtiveram as máximas contagens de coliformes, em torno de 7 log, no queijo de leite cru de vaca San Simón, após uma semana de maturação.

Os números de microrganismos indicadores da qualidade microbiológica (coliformes totais e fecais) foram altos no Queijo Serrano, principalmente nas etapas iniciais da maturação, sugerindo considerável contaminação dos leites, que pode ocorrer durante a ordenha e manipulação antes da elaboração dos queijos (Fontecha et al., 1990), e/ou falta de higiene ao longo do processo de manufatura dos mesmos. A presença desses microrganismos pode indicar problemas de manuseio, uma vez que os materiais utilizados para a fabricação dos queijos, tais como tanque de coagulação, panos, formas e prensa, bem como a própria manipulação pelos produtores, podem atuar como importantes meios de contaminação. As condições higiênico-sanitárias das queijarias e a higiene pessoal também devem ser controladas, para que não interfiram na qualidade do produto final. Além dessas, uma outra possível causa de contaminação é a proximidade das queijarias dos estábulos.

O declínio destes microrganismos nos Queijos Serranos elaborados no verão (Figuras 26 e 28) pode ser atribuído ao desenvolvimento de condições desfavoráveis ao crescimento deles no queijo ao longo da maturação como, por exemplo, a inibição por metabólitos de bactérias lácticas, o ácido láctico que causa um decréscimo no pH (Zárate et al., 1997) ou outras substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (Caplice e Fitzgerald, 1999). Uma redução significativa na contagem de coliformes totais e fecais, após 30 e 60 dias de maturação do queijo Manchego, devido à adição de cultura "starter" e a consequente diferença de 0,2 unidades no valor do pH foi demonstrado por Gaya et al. (1983).

Além disso os coeficientes de correlação entre as contagens de coliformes totais e a a_w ($r = 0,527$) e a umidade ($r = 0,569$) (Tabela 6), mostram que esses parâmetros influenciaram na diminuição dessa população do Queijo Serrano; provavelmente de maneira bem mais efetiva que o pH, cujo valor foi, em média, 0,4 unidades maior no verão que no inverno. Segundo De Giori et al. (1983) os coliformes totais não foram detectados no queijo Tafi, elaborado com leite cru de vaca, após 30 dias de maturação por causa da baixa a_w .

As maiores temperaturas da sala de maturação no verão também podem ter exercido alguma influência sob a população de coliformes. Segundo Nuñez et al. (1985) foi observada uma maior mortalidade de coliformes totais e fecais em altas temperaturas de maturação (em queijo Manchego após 60 dias de cura); os queijos maturados a 10°C tiveram uma contagem média de 2,07 (log ufc/g) para coliformes totais e de 2,24 (log ufc/g) para os coliformes fecais, já nos queijos maturados a 20°C ambas as populações não foram detectadas. Fernandez del Pozo et al. (1988) também reportaram que os coliformes totais tiveram uma taxa de morte

maior nos queijos espanhóis La Serena maturados na primavera ($16,9^{\circ}\text{C}$) que nos maturados no inverno ($13,6^{\circ}\text{C}$).

Porém, a presença destes grupos microbianos nas últimas etapas da maturação do Queijo Serrano no inverno sugere que a evolução dos parâmetros físico-químicos desse período não parece ter um efeito muito significativo sobre os coliformes, de forma que a diminuição do pH, cujo valor médio foi 0,4 unidades menor que o do verão, da a_w e da umidade não foi suficientemente intensa para provocar uma forte inibição destes microrganismos. Isso é confirmado pelos baixos coeficientes de correlação entre o logaritmo das contagens de coliformes totais e fecais e os valores do pH, da a_w e da umidade (Tabela 2).

Quinto et al. (1994) observaram que o baixo pH (4,5) em combinação com alta a_w (0,983) não foi suficiente para controlar o crescimento de microrganismos patogênicos, entre eles a *E. coli*, no queijo Cebrero, elaborado com leite cru de vaca sem cultura "starter".

Estes altos níveis de coliformes totais e fecais podem ser a principal causa da formação de olhaduras no interior do Queijo Serrano, que se desenvolvem em aproximadamente 48h. Os lactobacilos heterofermentativos não têm a capacidade de fazer isso em um intervalo de tempo tão curto (Ocando et al., 1991).

Além disso, a alta população de coliformes fecais e totais observada é a causa do estufamento precoce do Queijo Serrano, principal defeito que esse queijo apresenta, segundo seus produtores.

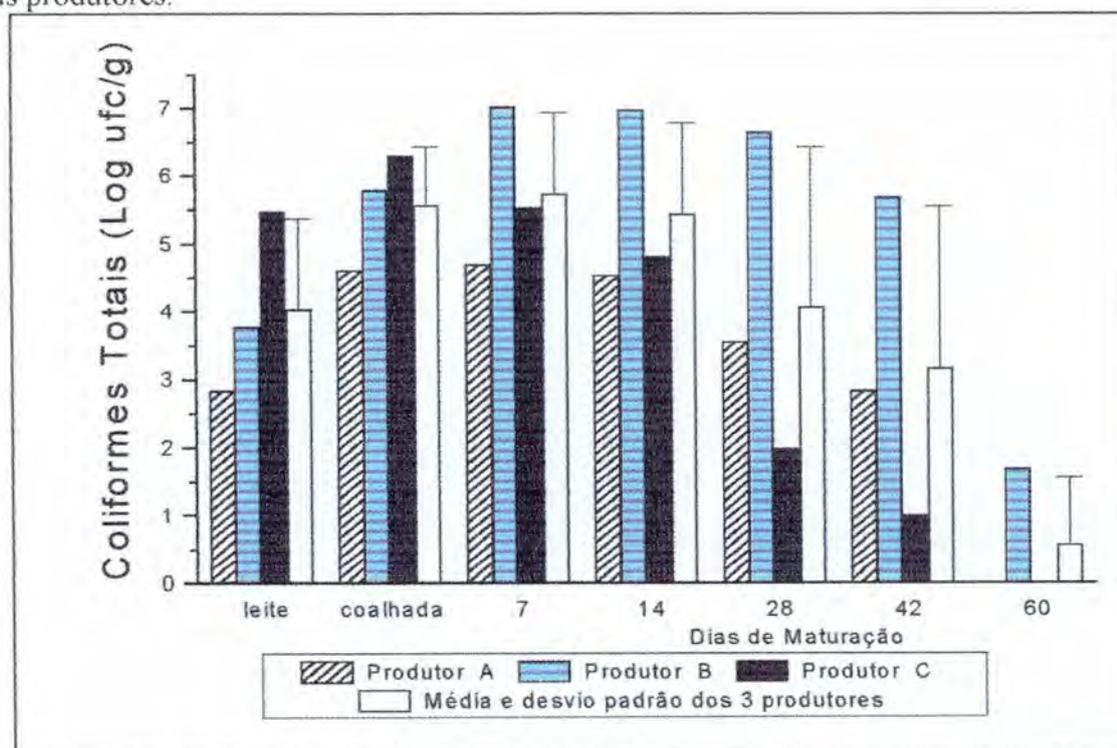


FIGURA 26: Evolução das contagens de coliformes totais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

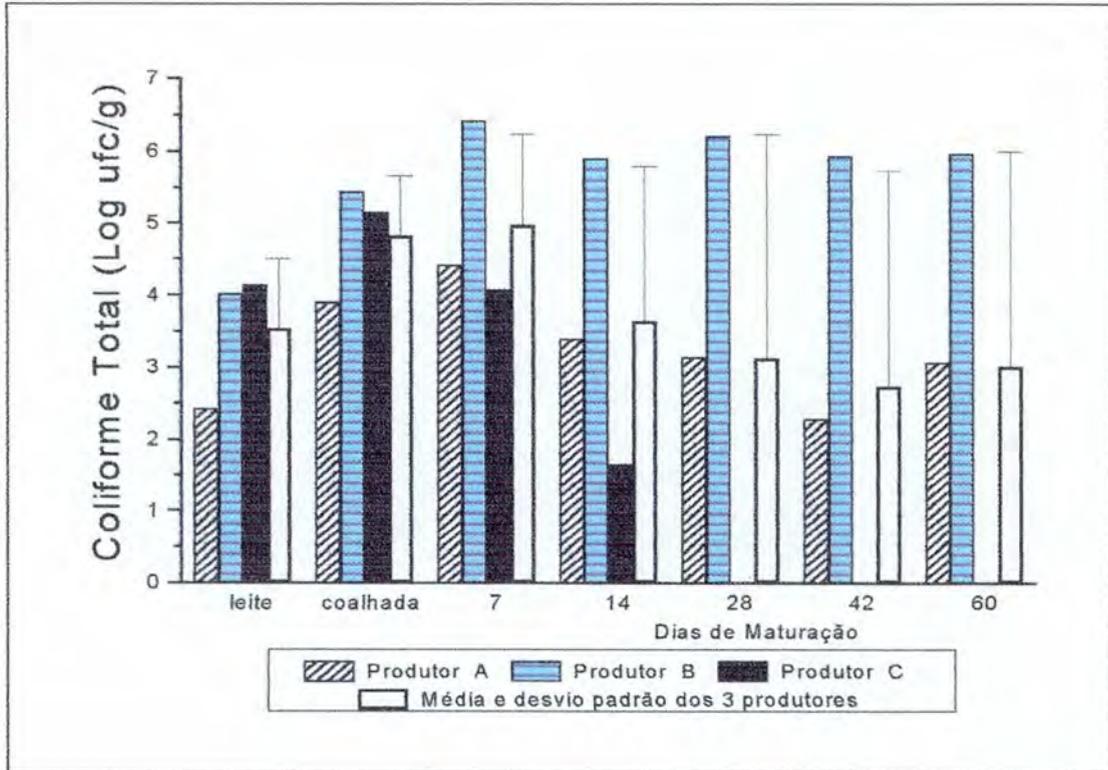


FIGURA 27 : Evolução das contagens de coliformes totais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

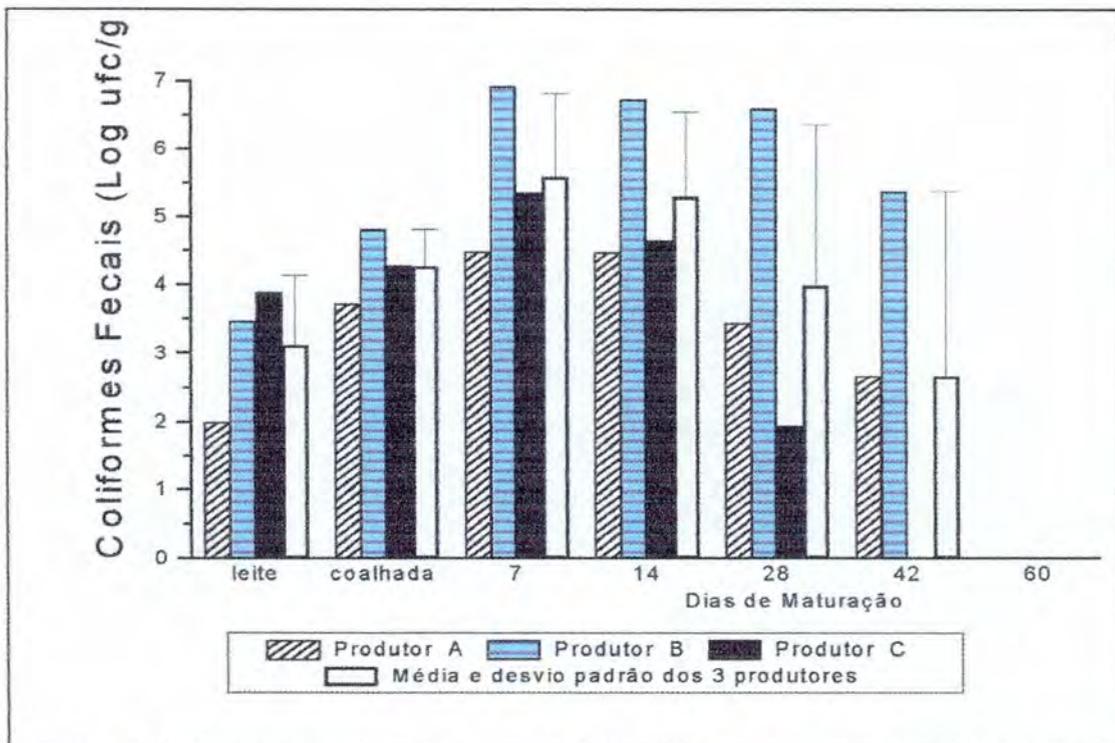


FIGURA 28: Evolução das contagens de coliformes fecais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

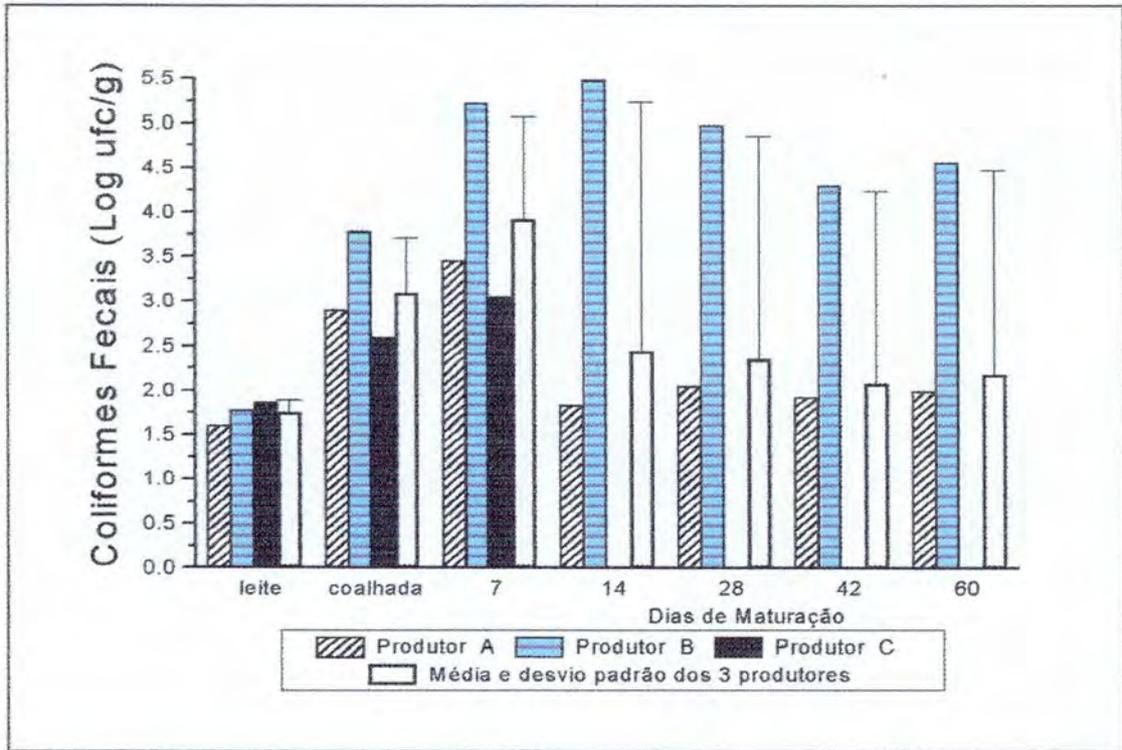


Figura 29: Evolução das contagens de coliformes fecais durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão (log ufc/g) dos 3 produtores.

*Sempre
B
proseguir
inclusive
aumento*

TABELA 6: Coeficientes de correlação entre os parâmetros químicos e físico-químicos e as contagens (log ufc/g) dos diferentes grupos microbianos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no período do verão

	Mesófilos	Psicrotróficos	Proteolíticos	Lipolíticos	Lactococos	Lactobacilos	Halotolerantes	Bolores	Leveduras	Colif. Totais	Colif. Fecais
Mesófilos	1	0,578*	0,704*	0,710*	0,982*	0,849*	0,204	0,523*	0,788*	0,353	0,450*
Psicrotróficos	0,578*	1	0,324	0,307	0,528*	0,246	0,398	0,404	0,629*	0,791*	0,823*
Proteolíticos	0,704*	0,324	1	0,623*	0,691*	0,669*	-0,131	0,239	0,358	0,129	0,263
Lipolíticos	0,710*	0,307	0,623*	1	0,735*	0,628*	0,260	0,538*	0,706*	0,371	0,495*
Lactococos	0,982*	0,528*	0,691*	0,735*	1	0,875*	0,232	0,531*	0,809*	0,297	0,407
Lactobacilos	0,849*	0,246	0,669*	0,628*	0,875*	1	-0,088	0,237	0,601*	-0,042	0,109
Halotolerantes	0,204	0,398	-0,131	0,260	0,232	-0,088	1	0,475*	0,610*	0,543*	0,530*
Bolores	0,523*	0,404	0,239	0,538*	0,531*	0,237	0,475*	1	0,656*	0,590*	0,645*
Leveduras	0,788*	0,629*	0,358	0,706*	0,809*	0,601*	0,610*	0,656*	1	0,573*	0,666*
Colif. Totais	0,353	0,791*	0,129	0,371	0,297	-0,042	0,543*	0,590*	0,573*	1	0,963*
Colif. Fecais	0,450*	0,823*	0,263	0,495*	0,407	0,109	0,530*	0,645*	0,666*	0,963*	1
pH	-0,819*	-0,398	-0,758*	-0,541*	-0,839*	-0,837*	0,113	-0,374	-0,533*	-0,069	-0,227
Ac. Tit. (%ác.lático)	0,607*	0,067	0,733*	0,488*	0,633*	0,773*	-0,471*	0,147	0,241	-0,156	-0,031
a _w	0,033	0,548*	-0,404	-0,170	-0,010	-0,606*	0,732*	0,242	0,313	0,527*	0,438
Umidade (%)	-0,024	0,433	-0,482*	-0,056	-0,066	-0,658*	0,739*	0,300	0,323	0,569*	0,447
NaCl (%EST)	0,107	-0,060	0,112	0,654*	0,134	0,065	0,165	0,267	0,301	0,390	0,355
NaCl (% na umid.)	0,053	-0,402	0,355	0,526*	0,110	0,401	-0,371	0,062	-0,026	-0,078	-0,056
Cinza (%EST)	0,100	-0,063	0,171	0,745*	0,126	0,084	0,118	0,247	0,289	0,364	0,344
Lactose (%EST)	-0,405	0,197	-0,560*	-0,338	-0,431	-0,905*	0,525*	-0,096	-0,031	0,335	0,151
Nitr. total (%EST)	-0,171	0,188	-0,041	-0,004	-0,137	-0,524*	0,359	0,276	0,015	0,228	0,191
Proteína (%EST)	-0,168	0,194	-0,042	-0,005	-0,135	-0,526*	0,366	0,279	0,019	0,235	0,197
Gordura (%EST)	-0,049	-0,304	0,221	-0,197	-0,046	0,498*	-0,643*	-0,277	-0,339	-0,579*	-0,442

* correlação é significativa ao nível de 5% (P<0,05)

Continuação da Tabela 6

	pH	Ac.Tit. (%ác.lático)	a _w	Umidade (%)	NaCl (%EST)	NaCl (% na umid.)	Cinza (%EST)	Lactose (%EST)	Nitr. total (%EST)	Proteína (%EST)	Gordura (%EST)
Mesófilos	-0,819*	0,607*	0,033	-0,024	0,107	0,053	0,100	-0,405	-0,171	-0,168	-0,049
Psicrotróficos	-0,398	0,067	0,548*	0,433	-0,060	-0,402	-0,063	0,197	0,188	0,194	-0,304
Proteolíticos	-0,758*	0,733*	-0,404	-0,482*	0,112	0,355	0,171	-0,560*	-0,041	-0,042	0,221
Lipolíticos	-0,541*	0,488*	-0,170	-0,056	0,654*	0,526*	0,745*	-0,338	-0,004	-0,005	-0,197
Lactococos	-0,839*	0,633*	-0,010	-0,066	0,134	0,110	0,126	-0,431	-0,137	-0,135	-0,046
Lactobacilos	-0,837*	0,773*	-0,606*	-0,658*	0,065	0,401	0,084	-0,905*	-0,524*	-0,526*	0,498*
Halotolerantes	0,113	-0,471*	0,732*	0,739*	0,165	-0,371	0,118	0,525*	0,359	0,366	-0,643*
Bolores	-0,374	0,147	0,242	0,300	0,267	0,062	0,247	-0,096	0,276	0,279	-0,277
Leveduras	-0,533*	0,241	0,313	0,323	0,301	-0,026	0,289	-0,031	0,015	0,019	-0,339
Colif. Totais	-0,069	-0,156	0,527*	0,569*	0,390	-0,078	0,364	0,335	0,228	0,235	-0,579*
Colif. Fecais	-0,227	-0,031	0,438	0,447	0,355	-0,056	0,344	0,151	0,191	0,197	-0,442
pH	1	-0,830*	0,292	0,476*	0,250	-0,069	0,223	0,689*	0,117	0,119	-0,382
Ac. Tit. (%ác.lático)	-0,830*	1	-0,760*	-0,830*	0,018	0,577*	0,104	-0,763	-0,232	-0,238	0,379
a _w	0,292	-0,760*	1	0,910*	-0,247	-0,800*	-0,288	0,750*	0,473*	0,479*	-0,533*
Umidade (%)	0,476*	-0,830*	0,910*	1	0,075	-0,577*	-0,011	0,820*	0,435	0,442	-0,554*
NaCl (%EST)	0,250	0,018	-0,247	0,075	1	0,735*	0,951*	0,016	-0,097	-0,096	-0,282
NaCl (% na umid.)	-0,069	0,577*	-0,800*	-0,577*	0,735*	1	0,761*	-0,458	-0,296	-0,300	0,053
Cinza (%EST)	0,223	0,104	-0,288	-0,011	0,951*	0,761*	1	-0,051	0,005	0,003	-0,324
Lactose (%EST)	0,689*	-0,763*	0,750*	0,820*	0,016	-0,458	-0,051	1	0,398	0,402	-0,617*
Nitr. total (%EST)	0,117	-0,232	0,473*	0,435	-0,097	-0,296	0,005	0,398	1	1*	-0,461
Proteína (%EST)	0,119	-0,238	0,479*	0,442	-0,096	-0,300	0,003	0,402	1*	1	-0,464
Gordura (%EST)	-0,382	0,379	-0,533*	-0,554*	-0,282	0,053	-0,324	-0,617*	-0,461	-0,464	1

* correlação é significativa ao nível de 5% (P<0,05)

TABELA 7 : Coeficientes de correlação entre os parâmetros químicos e físico-químicos e as contagens (log ufc/g) dos diferentes grupos microbianos ao longo da elaboração e maturação do Queijo Serrano no período do inverno

	Mesófilos	Psicrotróficos	Proteolíticos	Lipolíticos	Lactococos	Lactobacilos	Halotolerantes	Bolores	Leveduras	Colif. Totais	Colif. Fecais
Mesófilos	1	0,895*	0,710*	0,444*	0,977*	0,741*	0,773*	0,417	0,602*	0,127	0,219
Psicrotróficos	0,895*	1	0,667*	0,350	0,838*	0,730*	0,766*	0,311	0,392	0,133	0,250
Proteolíticos	0,710*	0,667*	1	0,089	0,693*	0,870*	0,540*	-0,038	0,363	-0,037	0,081
Lipolíticos	0,444*	0,350	0,089	1	0,436*	0,044	0,530*	0,428	0,528*	0,683*	0,645*
Lactococos	0,977*	0,838*	0,693*	0,436*	1	0,719*	0,733*	0,399	0,574*	0,149	0,242
Lactobacilos	0,741*	0,730*	0,870*	0,044	0,719*	1	0,635*	0,016	0,437*	-0,008	0,167
Halotolerantes	0,773*	0,766*	0,540*	0,530*	0,733*	0,635*	1	0,285	0,590*	0,367	0,525*
Bolores	0,417	0,311	-0,038	0,428	0,399	0,016	0,285	1	0,378	0,022	-0,012
Leveduras	0,602*	0,392	0,363	0,528*	0,574*	0,437*	0,590*	0,378	1	0,284	0,361
Colif. Totais	0,127	0,133	-0,037	0,683*	0,149	-0,008	0,367	0,022	0,284	1	0,932*
Colif. Fecais	0,219	0,250	0,081	0,645*	0,242	0,167	0,525*	-0,012	0,361	0,932*	1
pH	-0,827*	-0,810*	-0,701*	-0,002	-0,828*	-0,806*	-0,562*	-0,206	-0,285	0,249	0,080
Ac. Tit.(%ác.lático)	0,647*	0,655*	0,675*	-0,260	0,639*	0,730*	0,374	0,066	0,110	-0,527*	-0,355
a _w	-0,071	-0,098	-0,461	0,243	-0,057	-0,734*	-0,038	0,083	-0,155	0,267	0,116
Umidade (%)	-0,023	-0,267	-0,401	0,490*	-0,003	-0,677*	0,211	0,220	0,183	0,421	0,271
NaCl (%EST)	0,059	-0,160	0,313	0,187	0,040	0,395	0,498*	0,040	0,570*	0,190	0,302
NaCl (% na umid.)	0,022	-0,105	0,384	-0,048	0,002	0,598*	0,177	-0,069	0,458	-0,102	0,052
Cinza (%EST)	0,078	-0,174	0,330	0,277	0,092	0,389	0,494*	0,050	0,556*	-0,320	0,399
Lactose(%EST)	-0,420	-0,608*	-0,593*	0,319	-0,401	-0,852*	-0,075	-0,028	0,031	0,264	0,120
Nitr. total (%EST)	0,174	-0,193	0,185	-0,094	0,216	0,070	-0,418	0,189	0,247	-0,528*	-0,573*
Proteína (%EST)	0,173	-0,193	0,185	-0,095	0,214	0,069	-0,426	0,182	0,244	-0,530*	-0,575*
Gordura (%EST)	-0,355	0,045	-0,234	-0,065	-0,376	-0,197	0,064	-0,287	-0,569*	0,260	0,223

* correlação é significativa ao nível de 5% (P<0,05)

Continuação da Tabela 7

	pH	Ac. Tit. (%ác.lático)	a _w	Umidade (%)	NaCl (%EST)	NaCl (% na umid.)	Cinza (%EST)	Lactose (%EST)	Nitr. total (%EST)	Proteína (%EST)	Gordura (%EST)
Mesófilos	-0,827*	0,647*	-0,071	-0,023	0,059	0,022	0,078	-0,420	0,174	0,173	-0,355
Psicrotróficos	-0,810*	0,655*	-0,098	-0,267	-0,160	-0,105	-0,174	-0,608*	-0,193	-0,193	0,045
Proteolíticos	-0,701*	0,675*	-0,461	-0,401	0,313	0,384	0,330	-0,593*	0,185	0,185	-0,234
Lipolíticos	-0,002	-0,260	0,243	0,490*	0,187	-0,048	0,277	0,319	-0,094	-0,095	-0,065
Lactococos	-0,828*	0,639*	-0,057	-0,003	0,040	0,002	0,092	-0,401	0,216	0,214	-0,376
Lactobacilos	-0,806*	0,730*	-0,734*	-0,677*	0,395	0,598*	0,389	-0,852*	0,070	0,069	-0,197
Halotolerantes	-0,562*	0,374	-0,038	0,211	0,498*	0,177	0,494*	-0,075	-0,418	-0,426	0,064
Bolores	-0,206	0,066	0,083	0,220	0,040	-0,069	0,050	-0,028	0,189	0,182	-0,287
Leveduras	-0,285	0,110	-0,155	0,183	0,570*	0,458	0,556*	0,031	0,247	0,244	-0,569*
Colif. Totais	0,249	-0,527*	0,267	0,421	0,190	-0,102	0,320	0,264	-0,528*	-0,530*	0,260
Colif. Fecais	0,080	-0,355	0,116	0,271	0,302	0,052	0,399	0,120	-0,573*	-0,575*	0,223
pH	1	-0,928*	0,457	0,647*	0,193	-0,154	0,229	0,818*	-0,232	-0,235	0,175
Ac. Tit. (%ác.lático)	-0,928*	1	-0,484*	-0,712*	-0,196	0,178	-0,287	-0,773*	0,298	0,302	-0,176
a _w	0,457	-0,484*	1	0,852*	-0,510*	-0,894*	-0,466	0,744*	-0,175	-0,177	0,172
Umidade (%)	0,647*	-0,712*	0,852*	1	-0,035	-0,566*	0,021	0,857*	-0,050	-0,056	-0,057
NaCl (%EST)	0,193	-0,196	-0,510*	-0,035	1	0,788*	0,960*	-0,131	0,055	0,050	-0,369
NaCl (% na umid.)	-0,154	0,178	-0,894*	-0,566*	0,788*	1	0,745*	-0,466	0,242	0,242	-0,380
Cinza (%EST)	0,229	-0,287	-0,466	0,021	0,960*	0,745*	1	-0,083	0,107	0,101	-0,416
Lactose (%EST)	0,818*	-0,773*	0,744*	0,857*	-0,131	-0,466	-0,083	1	0,042	0,040	0,030
Nitr. total (%EST)	-0,232	0,298	-0,175	-0,050	0,055	0,242	0,107	0,042	1	1*	-0,810*
Proteína (%EST)	-0,235	0,302	-0,177	-0,056	0,050	0,242	0,101	0,040	1*	1	-0,806*
Gordura (%EST)	0,175	-0,176	0,172	-0,057	-0,369	-0,380	-0,416	0,030	-0,810*	-0,806*	1

* correlação é significativa ao nível de 5% (P<0,05)

4.2. Evolução dos parâmetros físico-químicos e das características químicas durante a elaboração e maturação do Queijo Serrano

A evolução dos principais parâmetros físico-químicos que pudessem estar envolvidos com a variação da microflora dos Queijos Serranos é apresentada nas Tabelas 8 e 9.

Provavelmente o progressivo desaparecimento dos microrganismos no Queijo Serrano não é consequência da influência de um único parâmetro físico-químico, mas de um efeito combinado desses, pois nos queijos a microflora está simultaneamente exposta à várias situações de stress e o efeito combinado desses fatores no crescimento e sobrevivência dos microrganismos pode ser aditivo ou sinérgico (Fleet, 1999).

TABELA 8 : Variações das características químicas e físico-químicas do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no verão*

Parâmetros	Leite	Coalhada	Etapa de Maturação (dias)				
			7	14	28	42	60
pH	6,71 ^c	6,36 ^{bc}	5,33 ^a	5,52 ^a	5,80 ^{ab}	5,75 ^{ab}	5,66 ^a
pH ext	-	-	5,68 ^a	6,02 ^a	5,58 ^a	5,71 ^a	5,68 ^a
pH int	-	6,18 ^b	4,85 ^a	5,02 ^a	5,72 ^{ab}	5,77 ^{ab}	5,76 ^{ab}
Acidez Tit. (% ác. láctico)	0,2 ^a	0,2 ^a	1,1 ^b	1,1 ^b	0,9 ^{ab}	1,3 ^b	1,4 ^b
a_w	-	0,987 ^c	0,970 ^{bc}	0,962 ^b	0,953 ^{ab}	0,939 ^a	0,935 ^a
Umidade (%)	-	50,78 ^d	40,52 ^c	36,85 ^{bc}	36,63 ^{bc}	29,56 ^{ab}	27,57 ^a
NaCl (%EST)	-	1,4 ^a	1,2 ^a	1,3 ^a	1,6 ^a	1,4 ^a	1,4 ^a
NaCl (% na umid.)	-	1,4 ^a	1,9 ^a	2,3 ^a	2,6 ^a	3,1 ^a	3,4 ^a
Cinza (%EST)	-	5,4 ^a	5,2 ^a	5,3 ^a	5,7 ^a	5,4 ^a	5,4 ^a
Lactose (%EST)	-	4,1 ^b	0,6 ^a	nd	nd	nd	nd
Nitrogênio total (%EST)	-	7,5 ^a	7,4 ^a	7,21 ^a	6,6 ^a	6,7 ^a	7,1 ^a
Proteína (%EST)	-	48,2 ^a	47,6 ^a	46,2 ^a	42,3 ^a	42,6 ^a	45,2 ^a
Gordura (%EST)	-	40,6 ^a	43,4 ^{ab}	43,6 ^{ab}	47,9 ^b	45,3 ^{ab}	46,5 ^b

* Os dados representam a média dos 3 produtores

^{abcd} Médias na mesma linha com diferentes expoentes diferem significativamente (P<0,05)

nd = não detectado

TABELA 9 : Variações das características químicas e físico-químicas do Queijo Serrano ao longo da sua elaboração e maturação no inverno*

Parâmetros	Leite	Coalhada	Etapa de Maturação (dias)				
			7	14	28	42	60
PH	6,66	6,29	5,1	5,20	5,24	5,30	5,30
pH ext	-	-	5,11 ^a	5,09 ^a	5,17 ^a	5,18 ^a	5,18 ^a
pH int	-	6,24 ^b	4,98 ^a	5,04 ^a	5,17 ^a	5,15 ^a	5,15 ^a
Acidez Tit. (% ác. láctico)	0,2 ^a	0,3 ^{ab}	0,9 ^{bc}	0,9 ^c	1,0 ^c	0,9 ^{bc}	1,0 ^c
a_w	-	0,984 ^b	0,970 ^{ab}	0,967 ^{ab}	0,966 ^{ab}	0,957 ^a	0,954 ^a
Umidade (%)	-	57,30 ^d	45,37 ^c	43,34 ^{bc}	39,81 ^{bc}	36,80 ^{ab}	32,98 ^a
NaCl (%EST)	-	1,3 ^a	1,6 ^a	1,3 ^a	1,5 ^a	1,7 ^a	1,5 ^a
NaCl (% na umid.)	-	0,9 ^a	1,8 ^a	1,7 ^a	2,2 ^a	2,8 ^a	3,1 ^a
Cinza (%EST)	-	5,8 ^a	6,0 ^a	5,9 ^a	5,7 ^a	6,2 ^a	6,0 ^a
Lactose (%EST)	-	5,1	0,5	0,5	nd	nd	nd
Nitrogênio total (%EST)	-	7,6 ^a	7,4 ^a	7,6 ^a	7,4 ^a	7,6 ^a	7,52 ^a
Proteína (%EST)	-	48,3 ^a	47,2 ^a	48,8 ^a	47,4 ^a	48,6 ^a	48,0 ^a
Gordura (%EST)	-	41,2 ^a	40,3 ^a	40,2 ^a	40,5 ^a	41,1 ^a	42,4 ^a

* Os dados representam a média dos 3 produtores

^{abcd} Médias na mesma linha com diferentes expoentes diferem significativamente (P<0,05)

nd = não detectado

Apenas o pH_{ext} , a umidade, o teor de nitrogênio total, o teor de proteína e o teor de gordura variaram significativamente entre os dois períodos analisados (Tabela 10).

TABELA 10 : Valores médios das características químicas e físico-químicas para o período do verão e do inverno.

Parâmetros	Período	Média ^A	Significância
pH	Verão	5,88	0,104
	Inverno	5,58	
pH_{ext}	Verão	5,73	0,000*
	Inverno	5,15	
pH_{int}	Verão	5,55	0,151
	Inverno	5,29	
Acidez Titul. (% ác. láctico)	Verão	0,9	0,389
	Inverno	0,7	
a_w	Verão	0,958	0,115
	Inverno	0,966	
Umidade (%)	Verão	36,98	0,047*
	Inverno	42,60	
NaCl (%EST)	Verão	1,4	0,684
	Inverno	1,5	
NaCl (% na umidade)	Verão	2,4	0,402
	Inverno	2,1	
Cinza (%EST)	Verão	5,4	0,059
	Inverno	6,0	
Lactose (%EST)	Verão	0,9	0,713
	Inverno	1,1	
Nitrogênio total (%EST)	Verão	7,1	0,008*
	Inverno	7,5	
Proteína (%EST)	Verão	45,4	0,008*
	Inverno	48,0	
Gordura (%EST)	Verão	44,6	0,001*
	Inverno	40,9	

* Diferença significativa ($P < 0,05$) entre os dois períodos

^A Os valores são as médias dos sete pontos de amostragem para os três produtores

4.2.1. Determinação dos pHs e da acidez titulável

As Figuras 30 a 37 mostram a variação dos pHs e da acidez titulável durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

Os valores dos pHs desses leites (6,71 e 6,66) estão de acordo com os reportados por Tronco (1997) para leite fresco (6,6 a 6,8). Já o valor da acidez titulável pode variar de 0,12 a 0,23% ácido láctico (Tronco, 1997), de forma que os encontrados para o leite do Queijo Serrano (0,2% ácido láctico) também estão dentro desse intervalo.

Apesar de não ter sido detectada uma variação significativa no pH e na acidez titulável entre os dois períodos analisados (Tabela 10), observou-se que ao longo do período de maturação, principalmente no verão (Tabela 1), esses parâmetros físico-químicos variaram significativamente.

O pH, em torno de 6,7, do leite cru (Figuras 30 e 31) usado para manufatura do Queijo Serrano é similar aqueles dos leites utilizados para a produção de outros queijos de vaca, tais como o Arzúa (Centeno et al., 1994), o León (Medina et al., 1995), o Afuega'l Pitu (Cuesta et al., 1996), o Peñamellera (Estepar et al., 1999) e o San Simón (Fontán et al., 2001).

O valor do pH da coalhada (6,3 - 6,4) do Queijo Serrano corresponde ao de um queijo obtido por coagulação enzimática (Fox et al., 2000). Durante o processo de coagulação o pH do leite baixou e continuou a diminuir significativamente durante a primeira semana de maturação, onde atingiu os menores valores de todo o processo, 5,3 no verão e 5,1 no inverno (Tabelas 8 e 9). Esse decréscimo, em torno, de 1,5 unidades é uma consequência do ácido láctico produzido pela atividade das bactérias lácticas, naturalmente presentes no leite, que metabolizam a lactose e resulta num aumento significativo da acidez titulável (Figuras 36 e 37) do leite até o queijo de uma semana. Valor maior de pH para os queijos maturados em temperaturas mais altas foi também observado por outros autores; Nuñez et al. (1985), obtiveram pHs de 5,07 e de 5,28 para os queijos Manchego maturados a 10 e 20°C, respectivamente.

O queijo Peñamellera também atingiu um valor mínimo de pH no 7^o dia de maturação (Estepar et al., 1999). Um declínio lento no pH, similar ao do Queijo Serrano, foi observado em outros queijos sem "starter" (Fontecha et al., 1990; Estepar et al., 1999; Nhuch, 2000).

Apesar dos leites do queijo León (Medina et al., 1995) e do Afuega'l Pitu (Cuesta et al., 1996) terem um pH semelhante ao do leite utilizado no Queijo Serrano (Figuras 30 e 31) e também serem elaborados sem a adição de cultivos iniciadores a diminuição que eles apresentaram ao longo da primeira semana de maturação foram mais intensas, de forma que atingiram um valor mínimo de pH de, aproximadamente, 4,2.

Os significativos aumento do pH e diminuição da acidez titulável da primeira para a quarta semana de maturação no verão (Tabela 8) são o resultado da atividade metabólica dos bolores e das leveduras que utilizam o ácido láctico como uma fonte de carbono e/ou do processo de proteólise que libera grandes quantidades de compostos nitrogenados alcalinos (aminoácidos e amônia) (Fox, 1993; Tornadijo et al., 1995; Estepar et al., 1999). A baixa degradação do ácido láctico ao longo da maturação é usual em queijos maturados por bactérias, em contraste com aqueles maturados por bolores que, juntamente com as leveduras, são os

principais microrganismos consumidores de ácido lático durante a maturação desses queijos (Prieto et al., 2000).

Os valores dos pHs durante a maturação do Queijo Serrano, principalmente, no verão, favorecem a ação das proteases microbianas, que nos queijos apresentam atividades máximas no intervalo de pH entre 5,5-6,5 (Fox, 1993), sendo, portanto, a fração protéica a principal responsável pelas características de sabor, aroma e textura desse queijo.

No inverno o pH não apresentou grandes variações (Tabela 9) após o 7^o dia de maturação. Provavelmente as menores temperaturas desse período tenham diminuído a intensidade das reações bioquímicas, resultando num pH constante até o final do processo. Segundo Paleari et al. (1993) a menor temperatura do inverno causou uma redução das velocidades dos processos proteolíticos e lipolíticos do queijo Quartirolo di Monte.

O pH externo (pH_{ext}) foi maior que o pH interno (pH_{int}) no queijo de 7 e 14 dias (Figuras 32 a 35), provavelmente por causa dos bolores e leveduras que metabolizam o ácido lático e, normalmente, apresentam contagens superiores na superfície externa dos queijos, devido à disponibilidade de oxigênio (Kaminarides e Anifantakis, 1989; González de Llano et al., 1992; Centeno et al., 1994; Gobbetti et al., 1997). No queijo Picante da Beira Baixa o pH_{ext} foi maior que o pH_{int} ao longo dos 180 dias de maturação (Freitas et al., 1996). Para o pH_{int} não observou-se variações entre as duas estações do ano. Já o valor médio do pH_{ext} foi significativamente maior no verão que no inverno (Tabela 10). Isso, provavelmente, é consequência da menor temperatura dessa estação, que diminui a atividade metabólica da população de bolores, conforme já foi relatado anteriormente no item 4.1.6 (contagem de bolores).

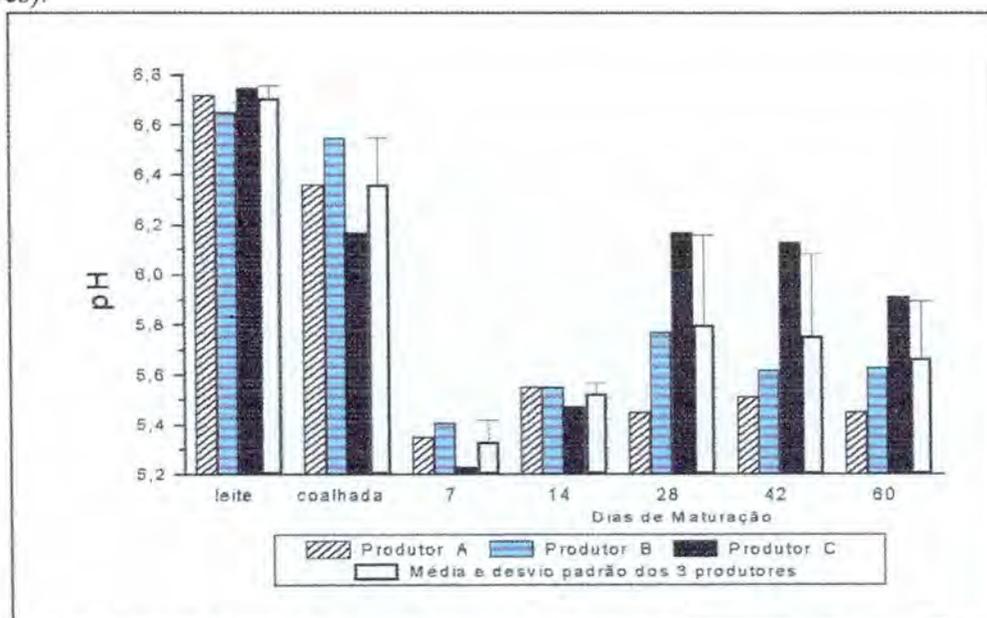


FIGURA 30: Variação do pH durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no verão e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

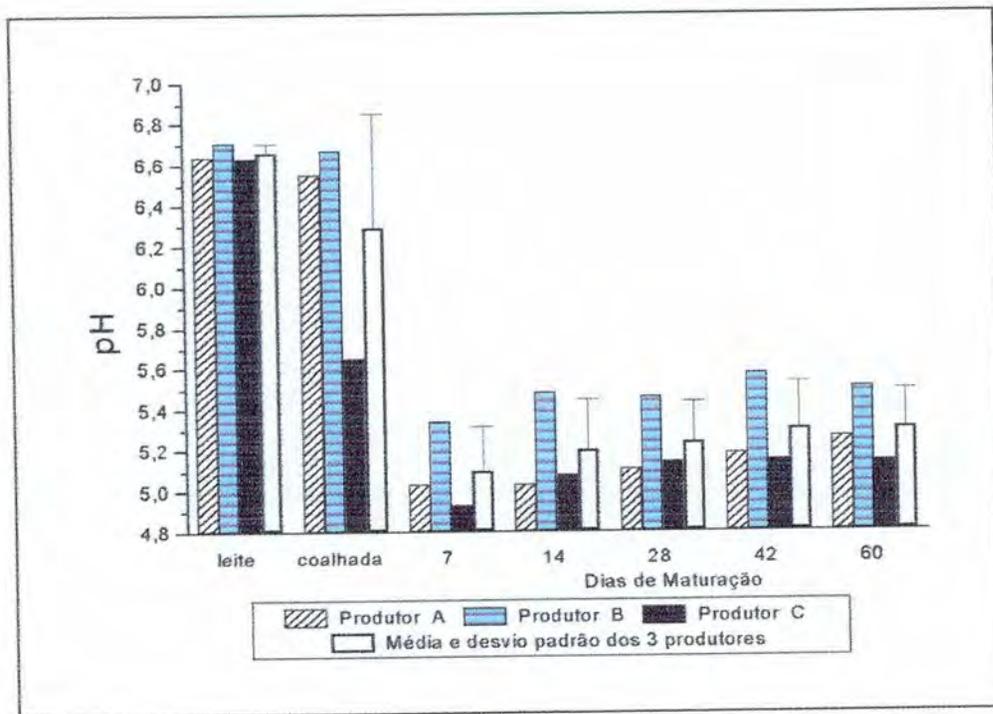


FIGURA 31: Variação do pH durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

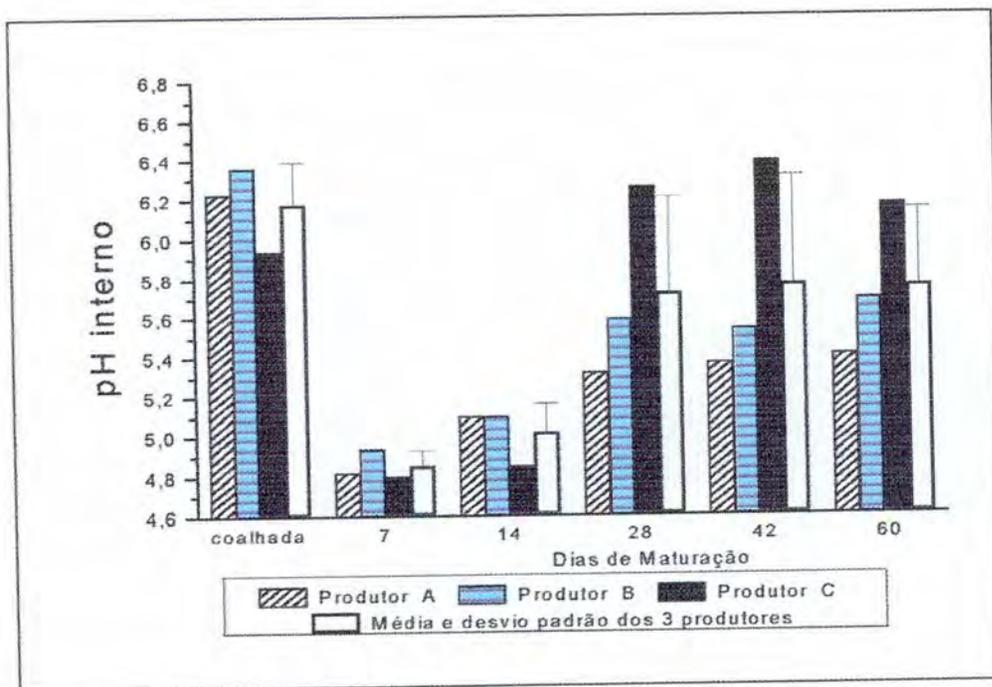


FIGURA 32 : Variação do pH interno durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

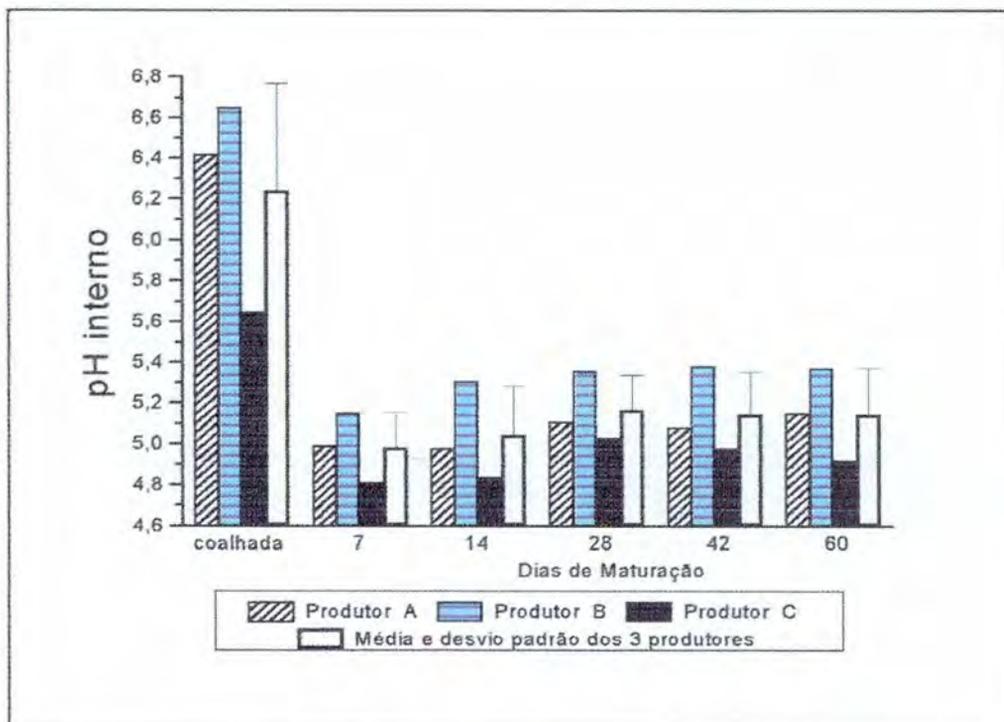


FIGURA 33: Variação do pH interno durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

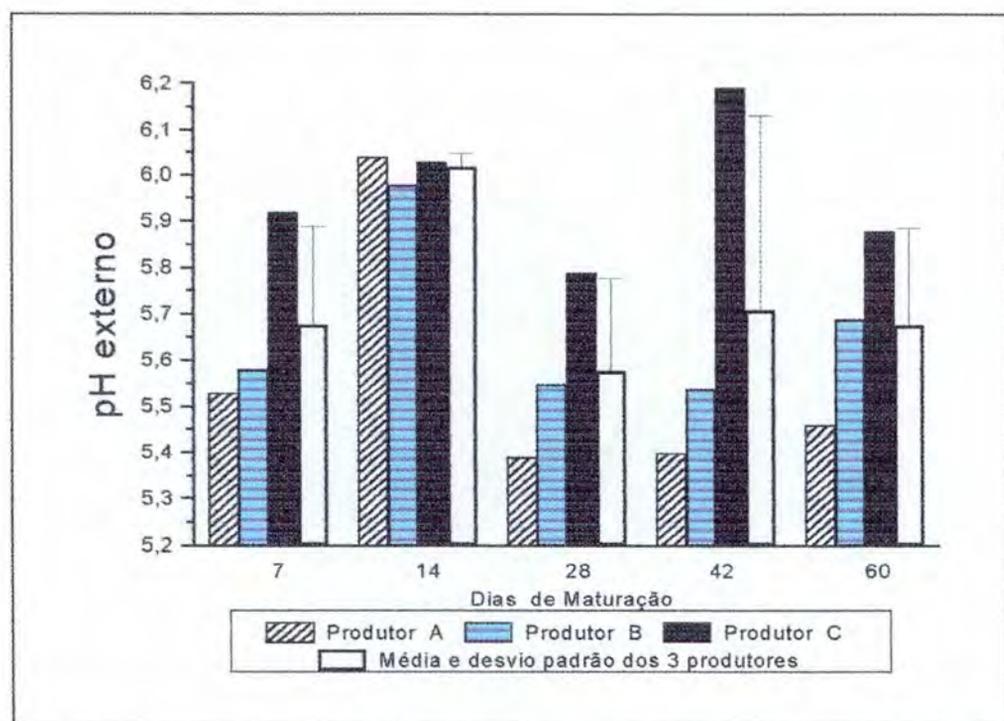


FIGURA 34 : Variação do pH externo durante a maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

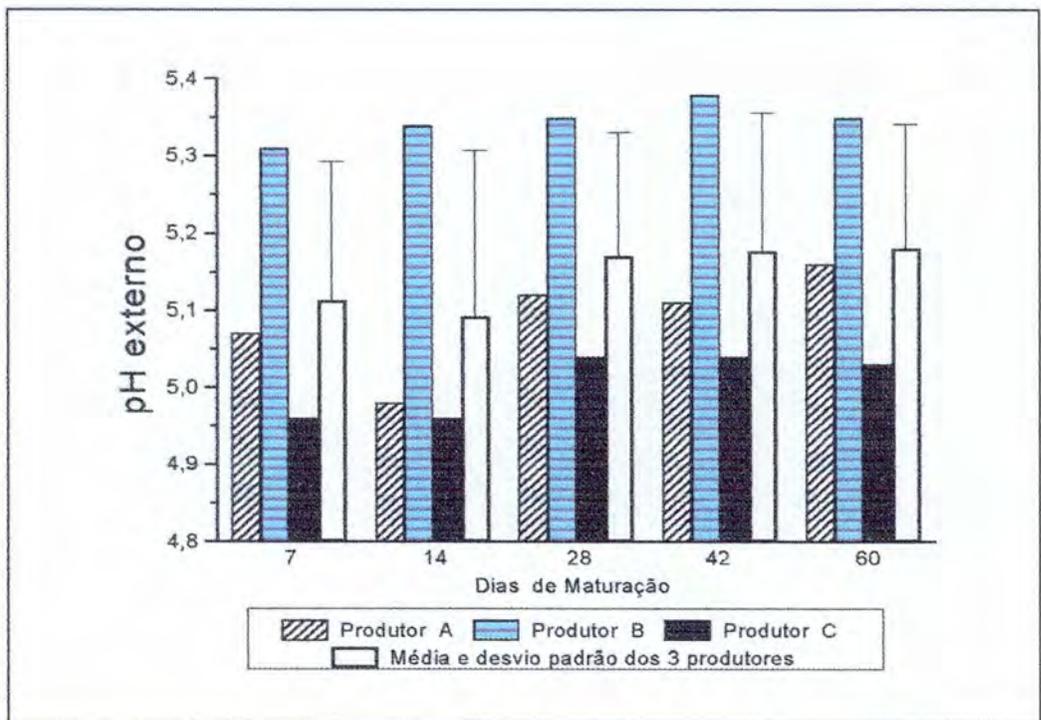


FIGURA 35 : Variação do pH externo durante a maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

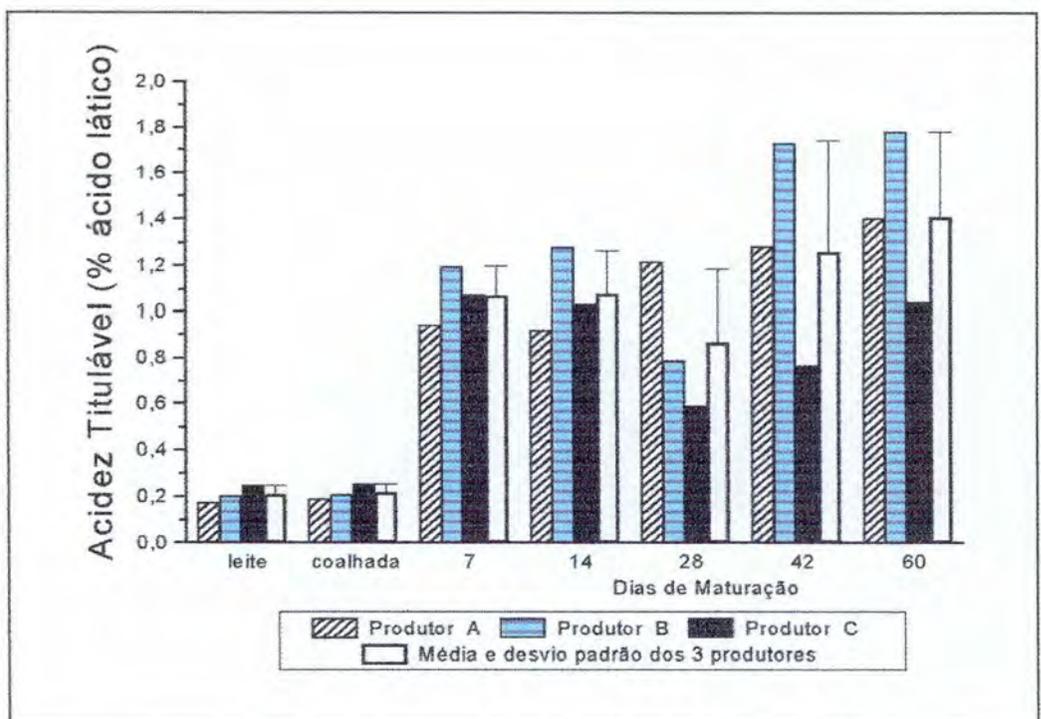


FIGURA 36: Variação da acidez titulável durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

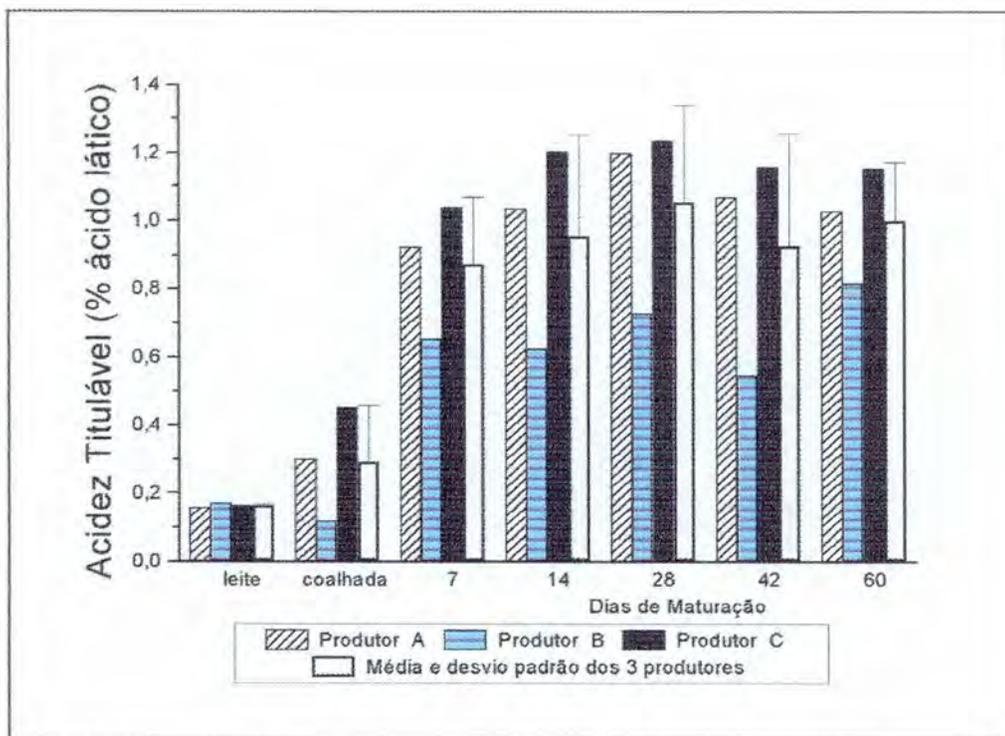


FIGURA 37: Variação da acidez titulável durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

4.2.2. Determinação da atividade de água e da umidade

As Figuras 38 a 41 mostram a variação da atividade de água e da umidade durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

Todos os queijos perdem certa quantidade de água durante o seu processo de elaboração e maturação, sendo as maiores perdas durante a dessoragem e prensagem.

No verão (Tabela 8) a a_w apresentou um declínio constante e significativo ao longo das primeiras seis semanas de maturação e permanecendo constante do 42^o para o 60^o dia de maturação. Já no inverno (Tabela 9) a diminuição não foi tão intensa, de forma que da primeira para a quarta semana a a_w ficou constante, diminuindo significativamente do 28^o para o 42^o dia, a partir do qual permaneceu constante até o final do processo. A diminuição mais acentuada da a_w no verão deve-se, provavelmente, à maior evaporação da água e à hidrólise mais intensa das proteínas durante a maturação dos Queijos Serranos no período de temperaturas altas (verão).

Os valores médios da a_w no final da maturação (0,935 no verão e 0,954 no inverno) (Figuras 38 e 39) não tornaram-se baixos o suficiente para exercer qualquer controle significativo no crescimento da maioria dos grupos microbianos analisados. Apenas para os queijos maturados no verão a a_w interferiu sobre os coliformes totais, halotolerantes e

psicrotróficos, conforme o coeficiente de correlação entre as contagens desses microrganismos e a_w (Tabela 6).

Tornadijo et al. (1995) observaram um decréscimo mais acentuado na a_w nos lotes de queijo Armada do verão em relação aos maturados no outono.

Não foi detectada uma variação significativa da a_w entre as bateladas do verão e do inverno (Tabela 10).

Já a umidade variou significativamente entre os dois períodos (Tabela 10), de forma que a diminuição foi mais evidente nas bateladas maturadas no verão, devido às temperaturas mais elevadas e a umidade relativa do ar mais baixa das salas de maturação nesta época do ano, que causam uma extensiva desidratação. Resultados similares foram observados por Pouillet et al. (1991) ao comparar a maturação dos queijos Casar de Cáceres na primavera e no inverno.

O conteúdo de umidade dos queijos diminuíram contínua e intensamente ao longo do processo, no inverno e no verão (Tabelas 8 e 9), como consequência da evaporação da água. Essa perda é muito rápida devido ao pequeno tamanho dos queijos, que aumenta a relação superfície/volume, e ao não controle da temperatura e da umidade relativa do ar das salas de maturação, o que favorece a perda de umidade (Prieto et al., 1994). O valor médio (27,6%) da umidade dos queijos de 60 dias no verão (Figura 40) é muito baixo e é igual ao do queijo Afuega'l Pitu (Cuesta et al., 1996) no mesmo estágio de maturação.

Margolles et al. (1996) analisaram o efeito das condições climáticas das diferentes estações do ano sobre as características de pH, NaCl (%), umidade (%) e a_w de alguns queijos espanhóis, observando que apenas esta última variou significativamente, de forma que os valores mais altos foram detectados no inverno e os menores no verão.

A a_w tende a diminuir com a umidade e com o aumento do conteúdo de NaCl na fase aquosa. As Tabelas 6 e 7 mostram que a relação entre a_w e umidade dos Queijos Serranos foi positiva, tanto no inverno ($r = 0,852$) quanto no verão ($r = 0,910$); e a correlação entre a atividade de água e o conteúdo de NaCl na fase aquosa também foi alta, mas inversamente ($r = -0,894$ no inverno e $r = -0,800$ no verão). Marcos et al. (1983) obtiveram fatores de correlação de 0,556 entre a_w e umidade e de $-0,808$ entre a_w e concentração de NaCl da fase aquosa.

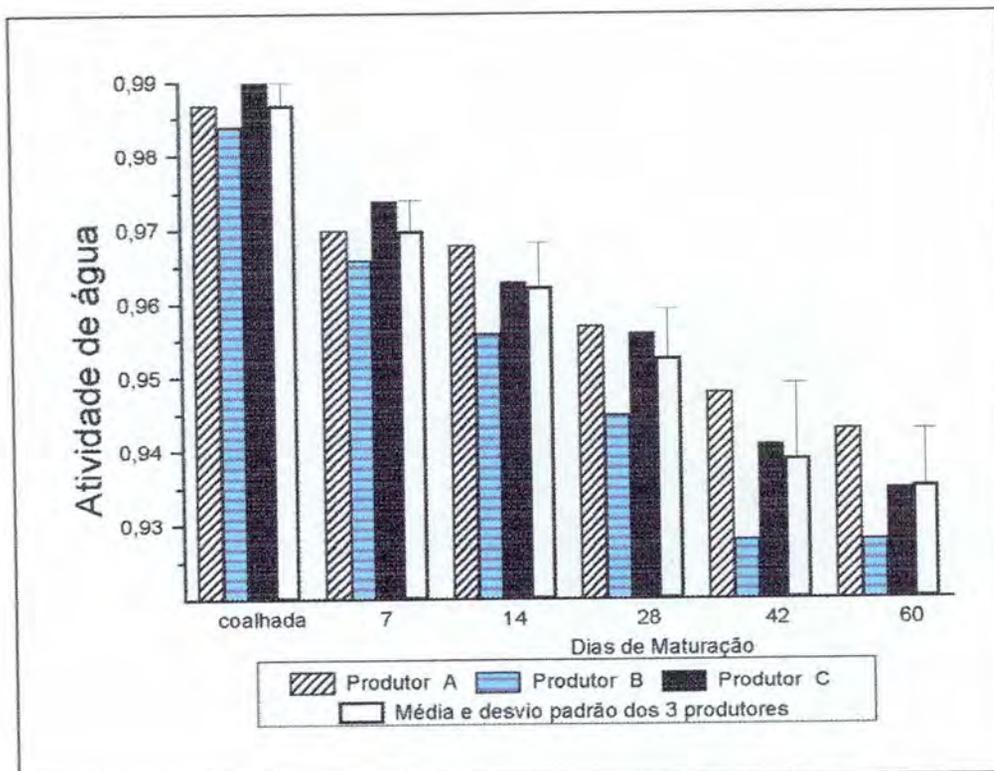


FIGURA 38 : Variação da atividade de água durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

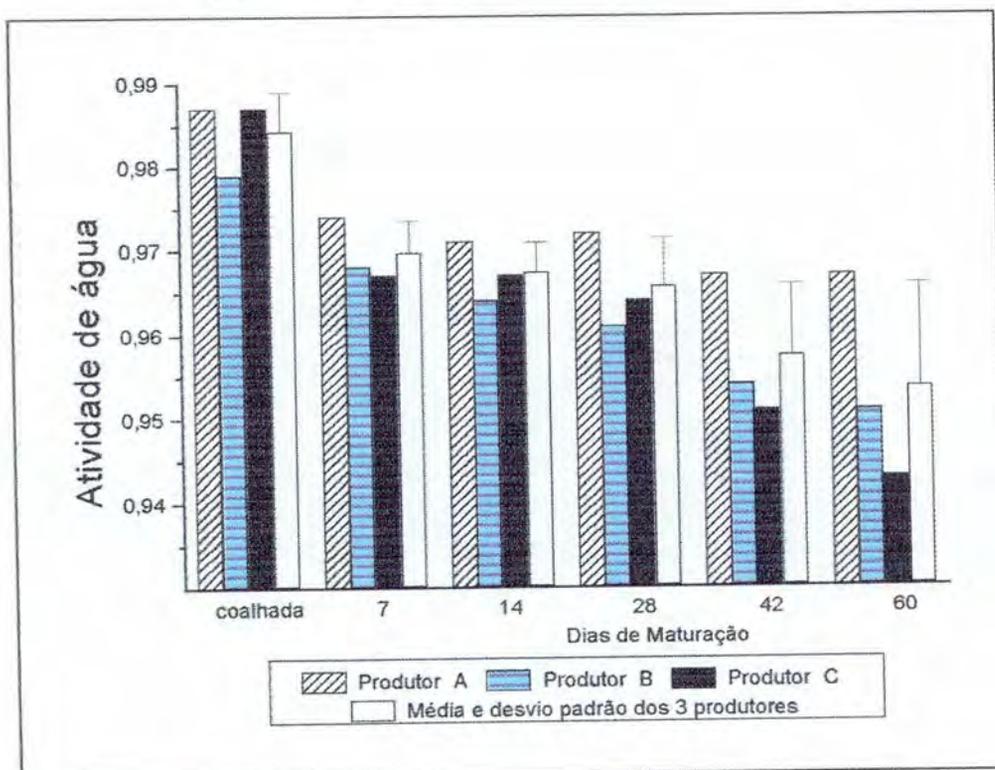


FIGURA 39 : Variação da atividade de água durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

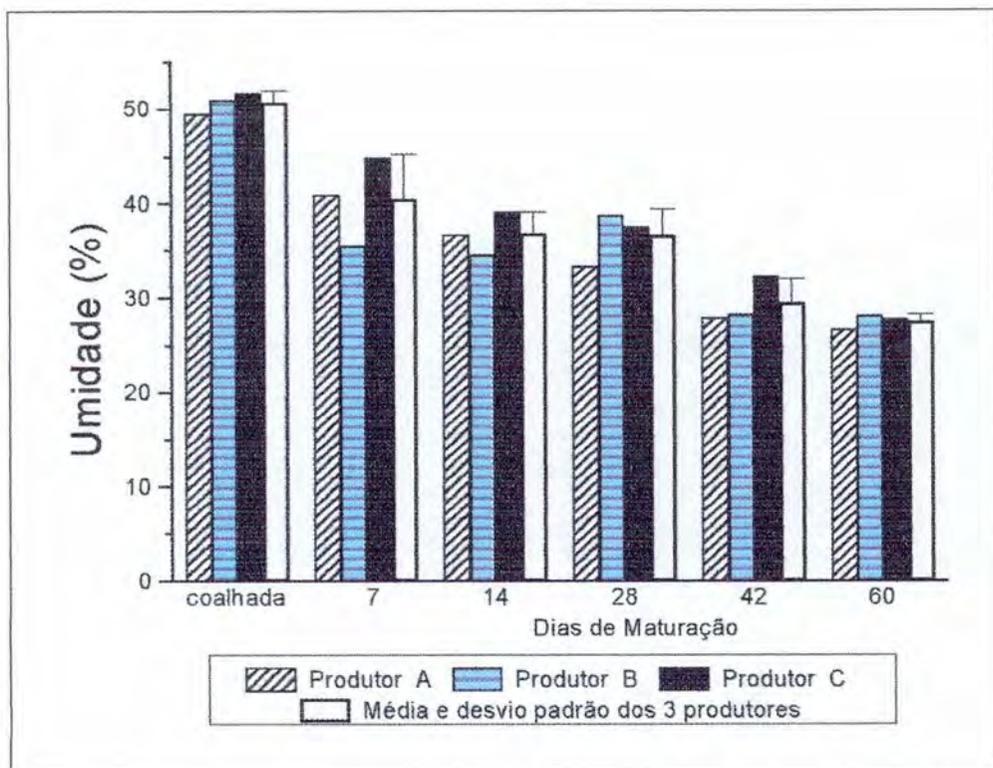


FIGURA 40: Variação da umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

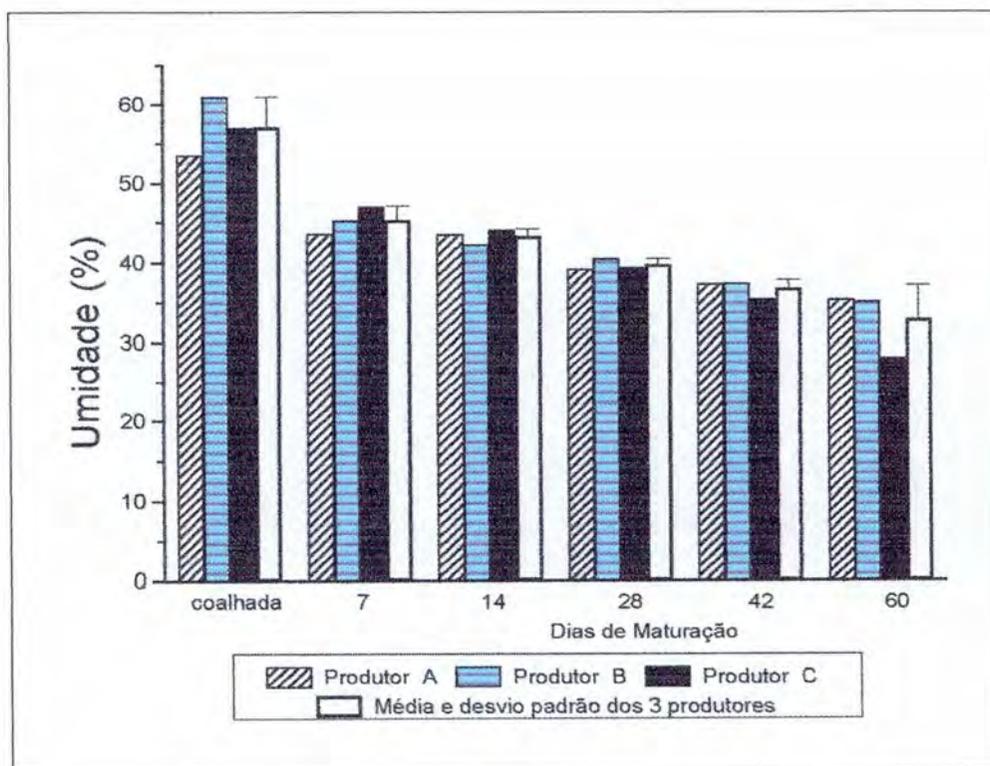


FIGURA 41: Variação da umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

4.2.3. Determinação do teor de sal e de cinzas

As Figuras 42 a 47 mostram a variação do teor de sal (% EST), da concentração de sal na umidade (% na umidade) e do teor de cinzas (% EST) durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

No processo de elaboração do Queijo Serrano o sal é adicionado ao leite, antes da coagulação. Esse método de salga inibe o crescimento de bactérias lácticas e, portanto, torna mais lenta a formação de ácido (Tornadijo et al., 2001). Além disso, isto favorece a distribuição de sal na coalhada e a retração do coágulo (Tornadijo et al., 2001).

O teor de sal (% EST), a concentração salina na fase aquosa (% na umidade) e o teor de cinzas dos queijos permaneceram constante ao longo do processo de elaboração e maturação nos dois períodos analisados (Tabelas 8 e 9). Provavelmente, isso deve-se ao método de adição de sal do Queijo Serrano, permitindo que o NaCl se distribua de forma homogênea desde a massa da coalhada. Ao contrário daqueles onde o sal é esfregado na superfície ou são imersos em salmoura, de forma que a concentração de NaCl no interior da massa aumenta progressivamente devido a sua difusão (Pouillet et al., 1991; González de Llano et al., 1992; Medina et al., 1995; Cuesta et al., 1996).

O conteúdo de NaCl (%EST) seguiu uma evolução paralela ao de cinzas ao longo dos dois meses de maturação, tanto no inverno quanto no verão (Figuras 42, 43, 46 e 47); o que está de acordo com os coeficientes de correlação entre eles ($r = 0,951$ no verão e $r = 0,960$ no inverno) (Tabelas 6 e 7). No queijo Afuega'l Pitu vermelho o conteúdo de sal na fase aquosa foi maior que no Afuega'l Pitu branco, de forma que a variedade vermelha desse queijo também apresentou um maior teor de cinzas (Cuesta et al., 1996). No queijo San Simón, elaborado artesanalmente, o conteúdo de cinzas (%EST) e de NaCl (%EST) permaneceu constante durante os 60 dias de maturação (Nhuch, 2000).

Apesar do aumento linear da concentração de NaCl na umidade ao longo do processo de maturação (Figuras 44 e 45), provavelmente, devido à perda de água dos queijos, essa variação não foi significativa estatisticamente (Tabelas 8 e 9). Também não foram detectadas variações significativas para a concentração de NaCl (%EST e % na umidade) e de cinzas entre os Queijos Serranos maturados no verão e o inverno (Tabela 10).

O baixo conteúdo de NaCl observado no Queijo Serrano pode ser devido à perda de sal durante a drenagem do soro. A concentração de NaCl na fase aquosa (valor médio de 2,4% no verão e 2,1% no inverno) das amostras de queijo ao longo do processo de maturação (Tabela 10) não foi suficiente para inibir o crescimento dos grupos microbianos, o que se confirma pelos valores dos coeficientes de correlação entre as contagens dos microrganismos

e a concentração de NaCl na umidade (Tabelas 6 e 7). No queijo Sán Simón o conteúdo de sal na fase aquosa, cujos valores máximos foram obtidos no fim do processo de maturação (1,71% no interior e 2,65% na superfície), não foi um obstáculo para o crescimento microbiano (Fontán et al.; 2001) e para *Enterobacteriaceae* (Tornadijo et al.; 2001).

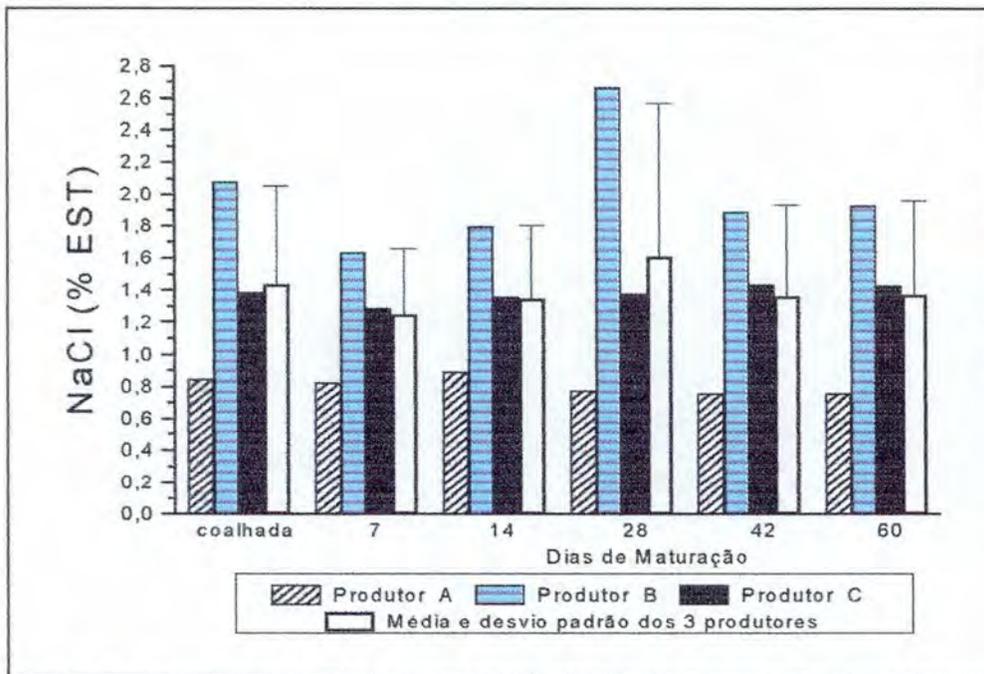


FIGURA 42: Variação da concentração de NaCl durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

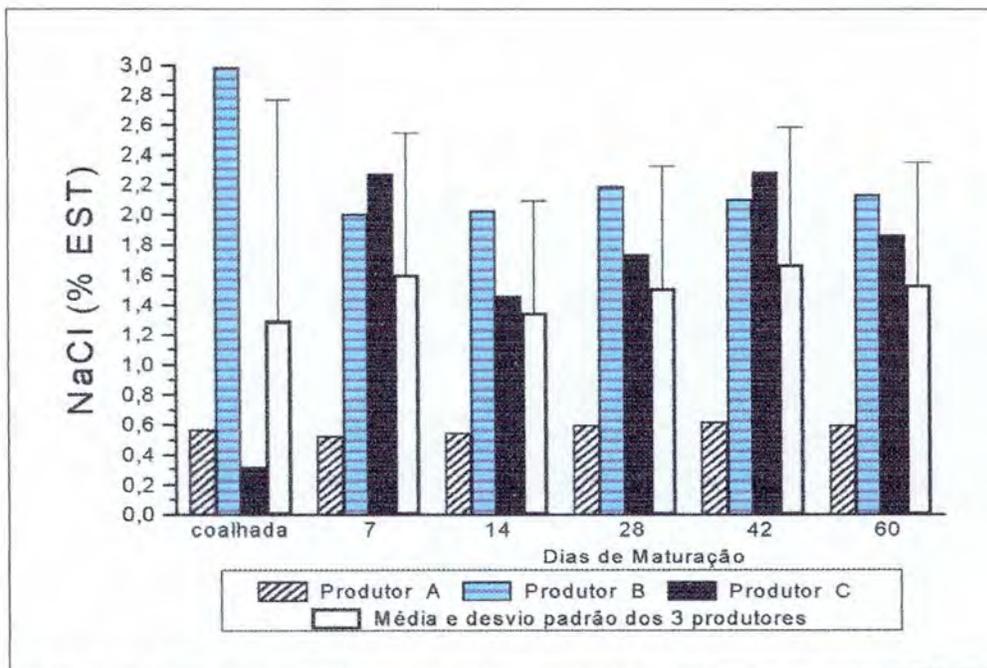


FIGURA 43: Variação da concentração de NaCl durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

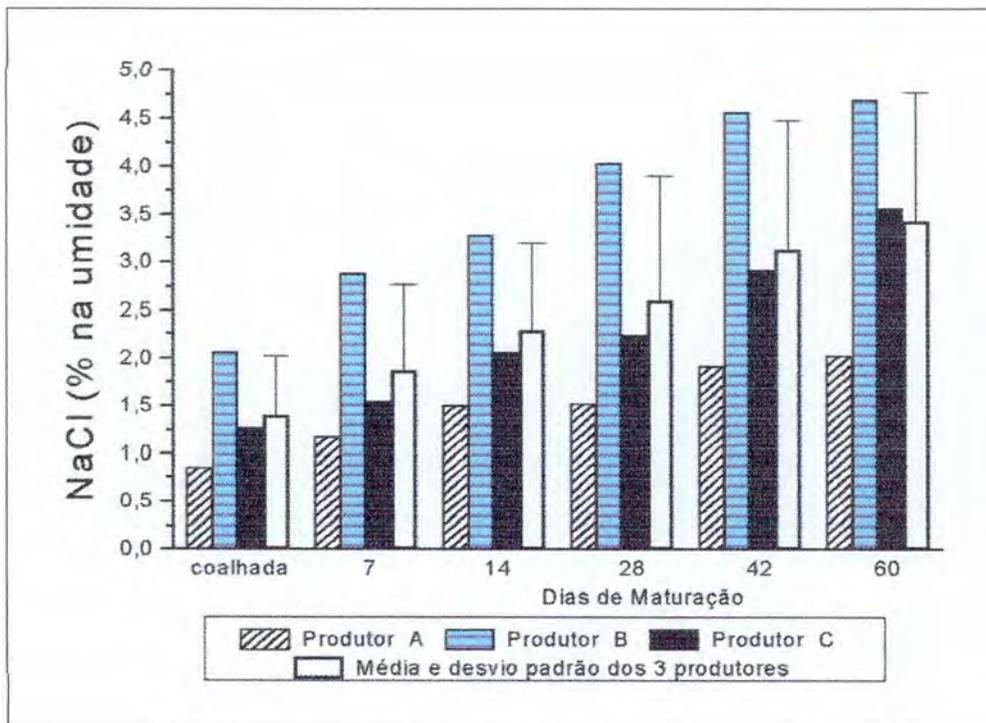


FIGURA 44 : Variação da concentração de NaCl na umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

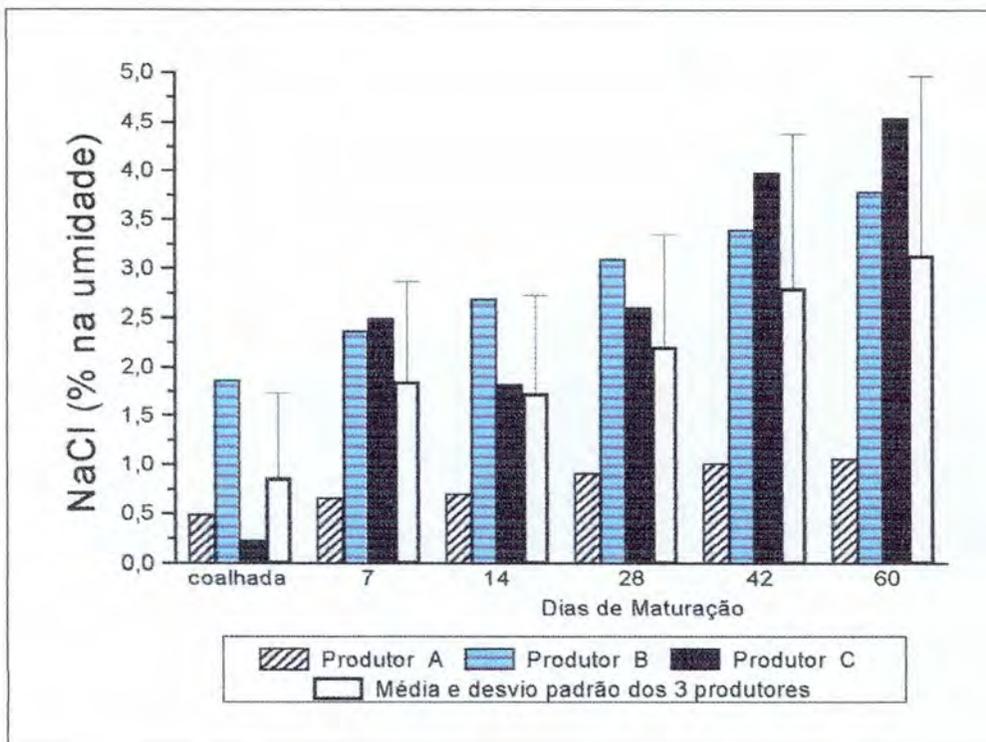


FIGURA 45: Variação da concentração de NaCl na umidade durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

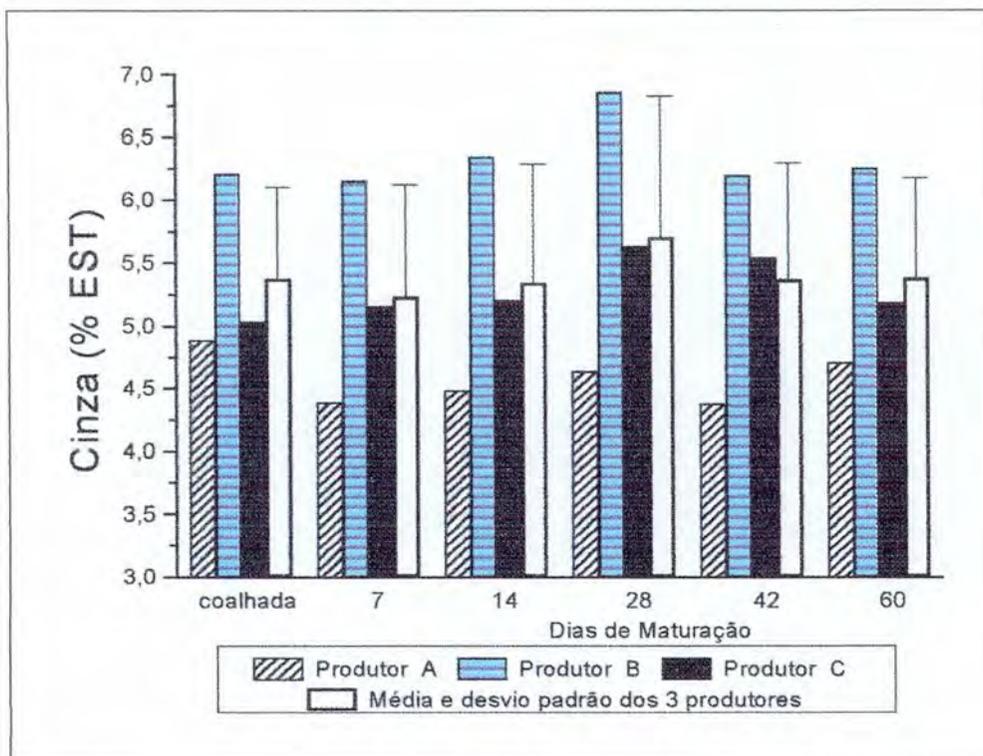


FIGURA 46: Variação do teor de cinzas durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

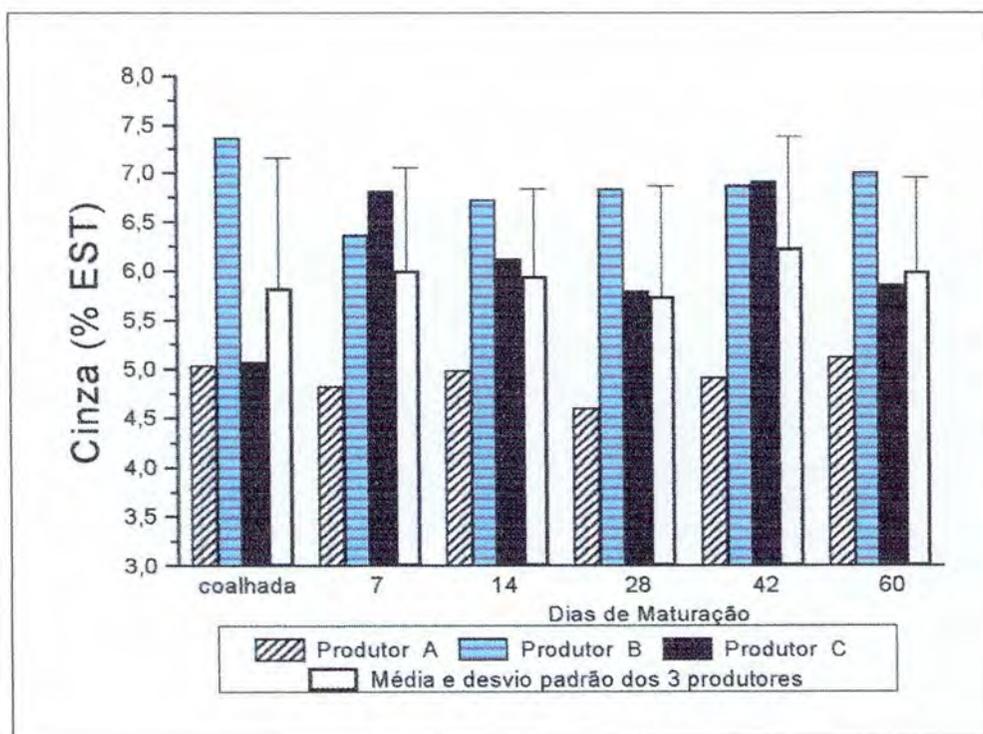


FIGURA 47: Variação do teor de cinzas durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

O conteúdo de sal é distinto para os três produtores pois cada um deles adiciona uma determinada quantidade, que não é pesada, conforme seu gosto próprio; além disso é também provável que a perda de NaCl com o soro, durante a drenagem e prensagem, seja diferente para cada um dos produtores. Olarte et al. (1999) observaram que a concentração de sal foi o único parâmetro químico que variou significativamente ($P < 0,001$) entre os produtores do queijo Cameros.

4.2.4. Determinação do teor de lactose

As Figuras 48 e 49 mostram a variação da concentração de lactose (%EST) durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno.

A lactose, no Queijo Serrano, sofre uma rápida degradação durante os primeiros 7 dias de maturação e desaparece completamente aos 14 dias, no verão (Figura 48), e aos 28 dias no inverno (Figura 49). Esta diminuição ocorre devido ao metabolismo das bactérias lácticas, que fermentam a lactose do leite a ácido láctico ocasionando um aumento da acidez titulável (Figuras 36 e 37) e um decréscimo do pH (Figuras 30 e 31); conforme mostra os coeficientes de correlação (Tabelas 6 e 7) entre a concentração de lactose e a acidez ($r = -0,763$ no verão e $r = -0,773$ no inverno) e o pH ($r = 0,689$ no verão e $r = 0,818$ no inverno).

Também do queijo San Simón, elaborado artesanalmente, Nhuch (2000) observou uma degradação rápida da lactose ao longo dos primeiros 15 dias de maturação, de forma que esta não foi mais detectada a partir do 30^o dia.

O rápido declínio da lactose no Queijo Serrano pode ser devido a uma intensa dessoragem e ao acentuado crescimento da flora láctica nas primeiras fases da maturação. Além disso o decréscimo mais lento no inverno, em relação ao verão, provavelmente seja decorrência das menores temperaturas registradas nesse período, que diminuem a velocidade das reações bioquímicas, entre elas a fermentação da lactose pelas bactérias lácticas.

O Queijo Serrano, maturado por no mínimo 30 dias, pode ser consumido pelas pessoas que sofrem de intolerância à lactose (deficiência da enzima lactase no intestino), pois não apresenta tal açúcar em sua composição.

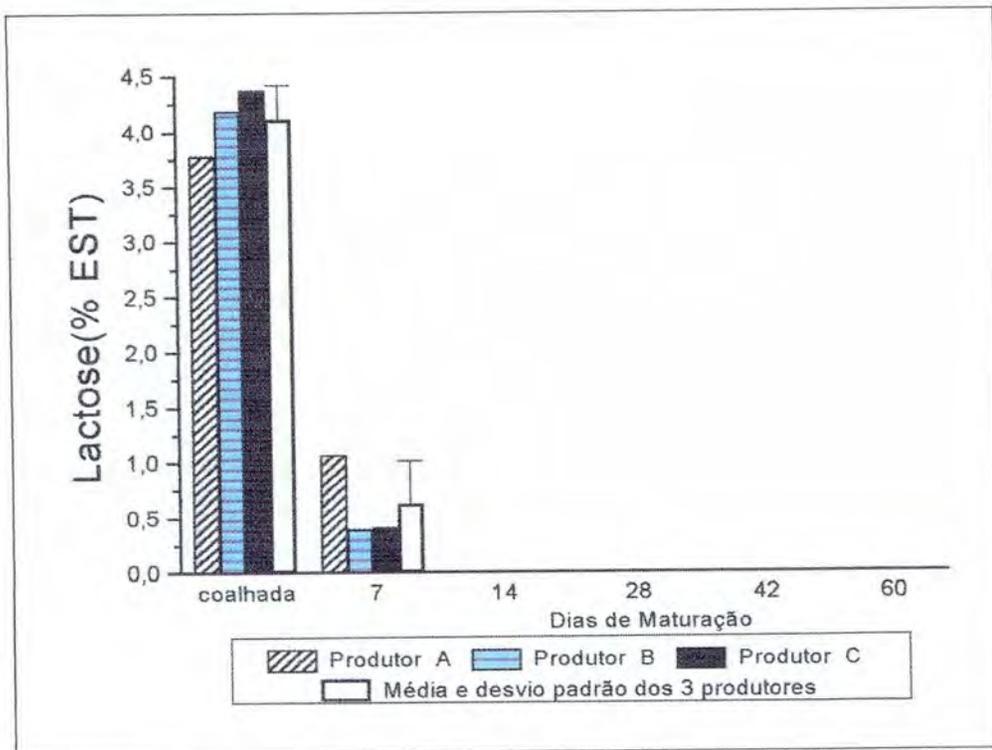


FIGURA 48: Variação do teor de lactose durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

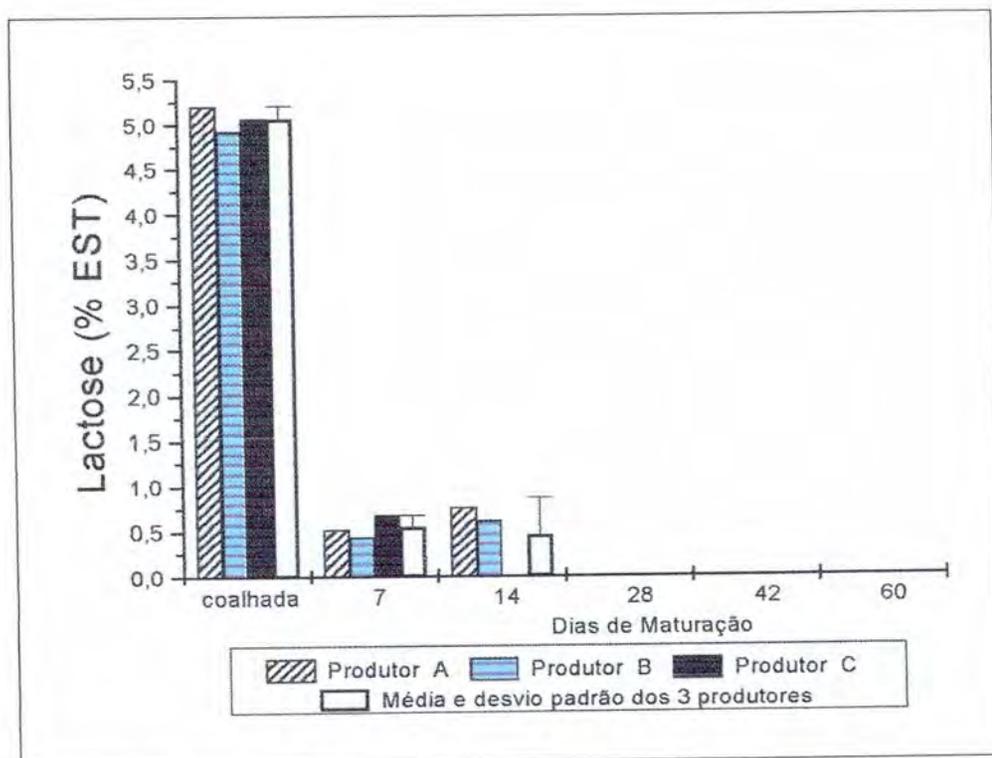


FIGURA 49 : Variação do teor de lactose durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

4.2.5. Determinação do teor de nitrogênio total, de proteínas e de gordura

As Figuras 50 a 55 mostram a variação da concentração de nitrogênio total (% EST), proteína (% EST) e gordura (% EST) durante a elaboração e maturação dos queijos no verão e no inverno. A Tabela 11 apresenta o teor de gordura (%) dos leites utilizados para a elaboração dos Queijos Serranos nas duas estações do ano.

O Queijo Serrano de 60 dias apresentou 45,2% EST de proteína e 46,5% EST de gordura no verão (Figuras 52 e 54) e 48,0% EST de proteína e 42,4% EST de gordura no inverno (Figuras 53 e 55); valores semelhantes ao do queijo de leite de vaca Afuega'l Pitu, no mesmo estágio da maturação (Cuesta et al., 1996).

A concentração de nitrogênio total e proteína, expressadas como porcentagem de sólidos totais, não mostraram variações significativas durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos, tanto no verão quanto no inverno (Tabelas 8 e 9).

A concentração de gordura (%EST) permaneceu constante do início ao fim da maturação no inverno, porém, no verão apresentou pequenas variações (Tabelas 8 e 9).

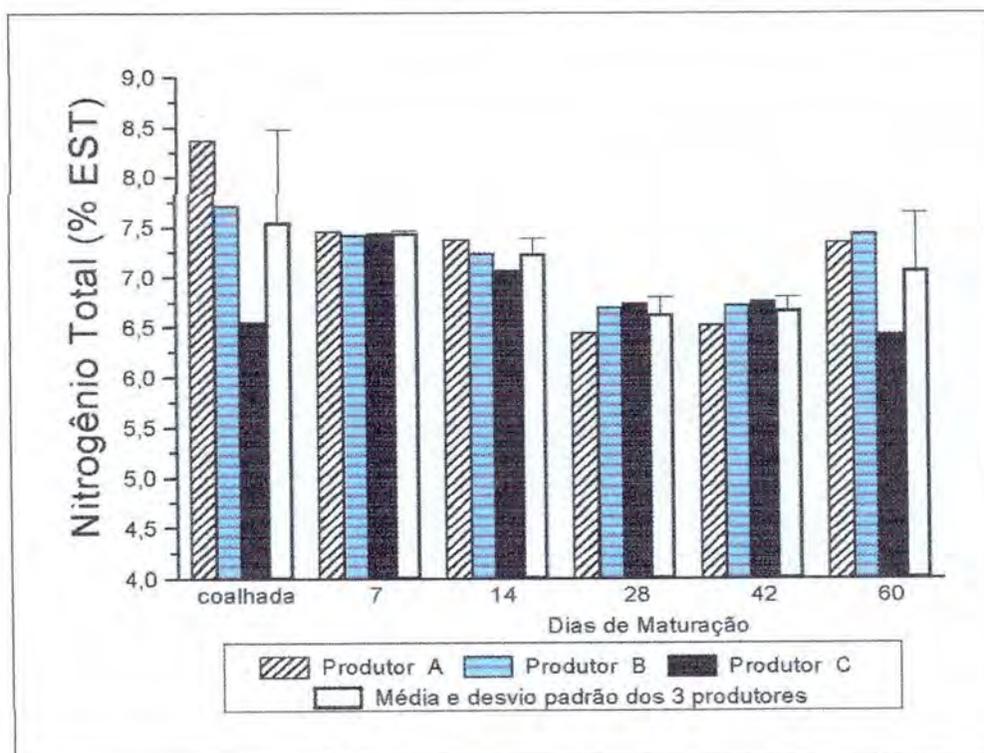


FIGURA 50 : Variação do teor de nitrogênio total durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

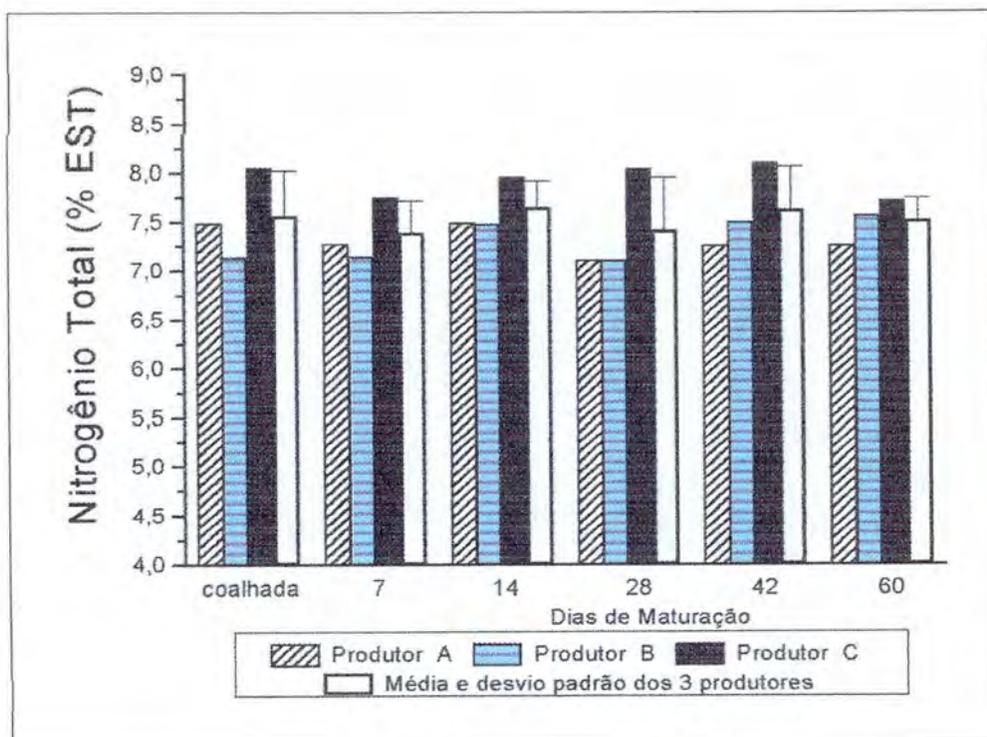


FIGURA 51: Variação do teor de nitrogênio total durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

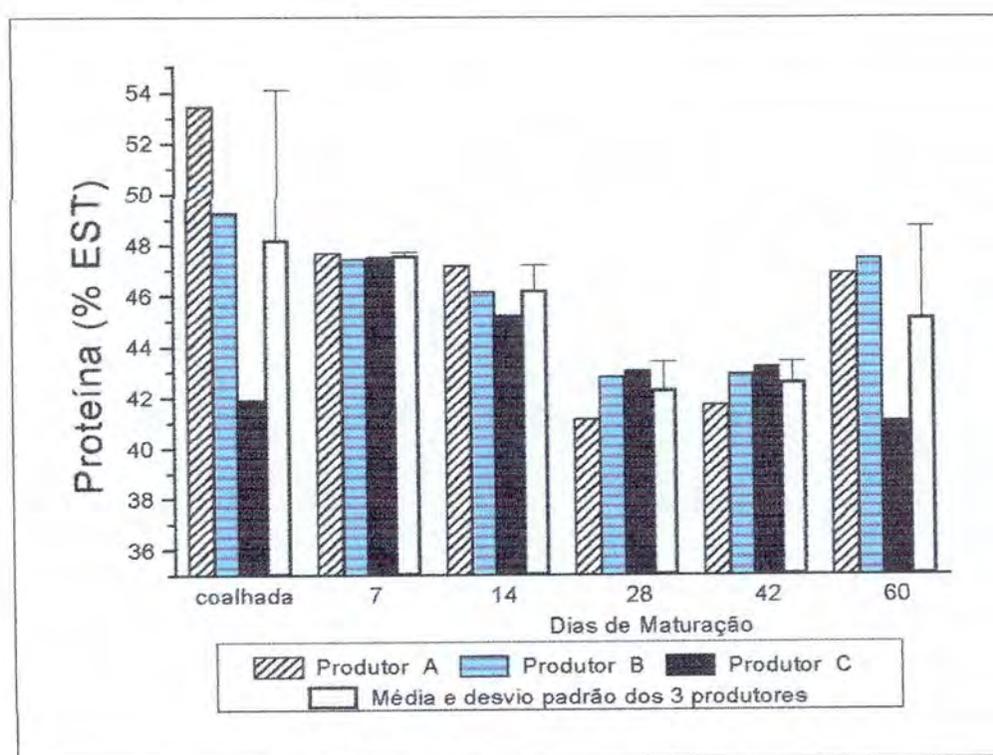


FIGURA 52: Variação do teor de proteína durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

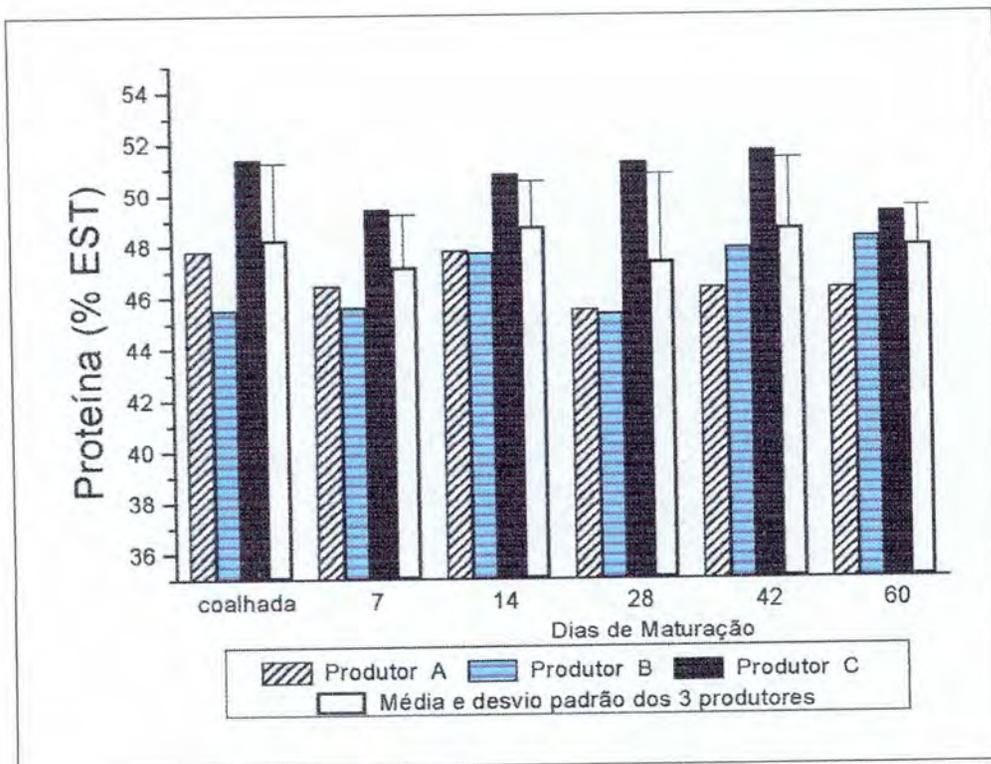


FIGURA 53: Variação do teor de proteína durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

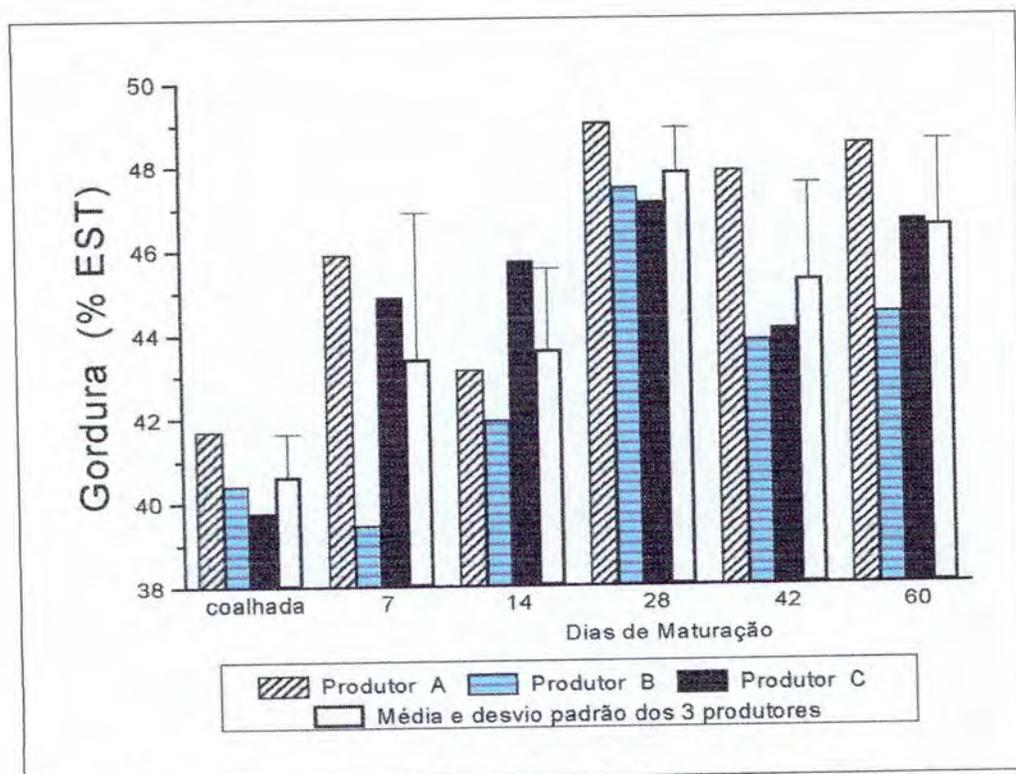


FIGURA 54: Variação do teor de gordura durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **verão** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

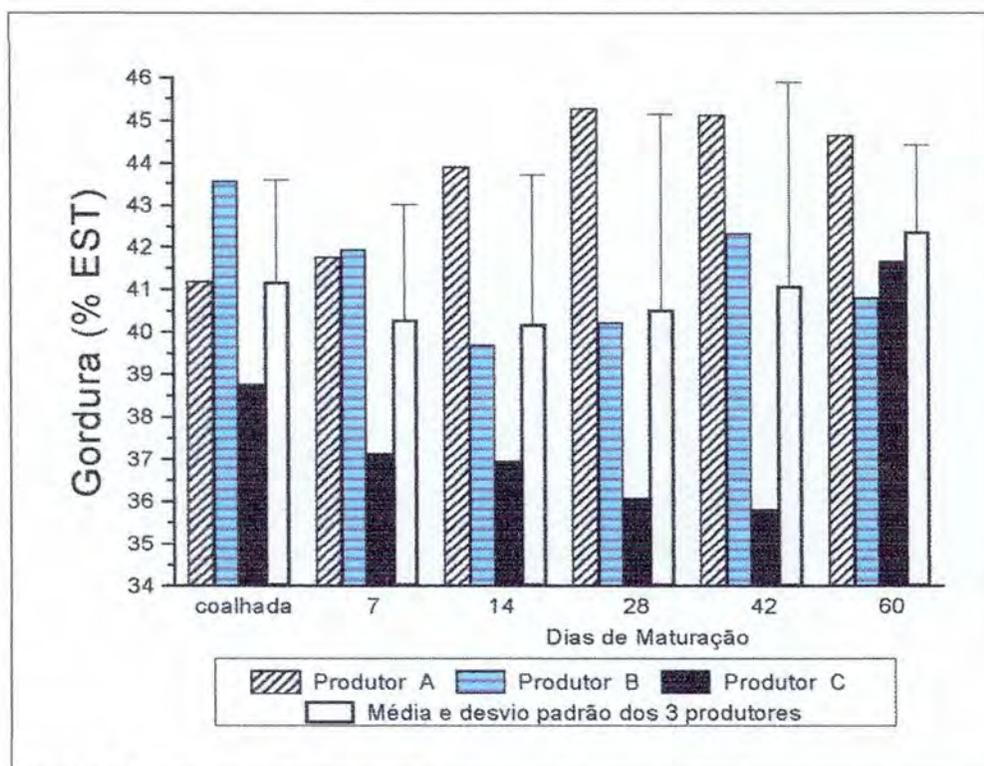


FIGURA 55: Variação do teor de gordura durante a elaboração e maturação dos Queijos Serranos no **inverno** e a média \pm desvio padrão dos 3 produtores.

A concentração de nitrogênio total, proteína e gordura, expressadas como porcentagem de sólidos totais, mostraram diferenças significativas entre os dois períodos analisados (Tabela 10). Provavelmente o maior teor de gordura dos queijos maturados no verão deva-se à maior perda de umidade desse período. Segundo Giometti et al. (1986) os Queijos-de-Minas maturados a 28^oC apresentaram uma maior concentração de gordura que os maturados a 12^oC. Além disso, essas diferenças nas características químicas dos queijos podem ter ocorrido em função da composição do leite que pode ter variado entre as duas estações, devido a mudanças na alimentação do gado entre o verão e o inverno; apesar da concentração média de gordura no leite ter sido semelhante nos dois períodos analisados (Tabela 11). Para determinarmos se há variação na composição do leite entre as estações do ano seria necessário um número maior de amostras.

TABELA 11 : Teor de gordura (%) dos leites coletados no verão e inverno.

	Gordura(%) no verão	Gordura (%) no inverno
Produtor A	3,5	2,7
Produtor B	3,3	3,1
Produtor C	2,7	4,1
Valor Médio	3,2	3,3

5. Conclusão

Neste trabalho observou-se que a idade (etapa de maturação) dos queijos teve uma influência altamente significativa na variação das contagens dos grupos microbianos e das propriedades químicas e físico-químicas, sendo que esse efeito foi mais pronunciado para os queijos analisados no verão.

Não constatou-se diferenças significativas para a maioria das contagens microbianas e das características químicas e físico-químicas em relação ao período do ano em que os queijos foram elaborados e maturados. Apenas as contagens de halotolerantes e bolores e as análises químicas de umidade, nitrogênio total, proteína e gordura apresentaram diferenças significativas entre o verão e o inverno. Provavelmente a principal causa dessa diferença seja a temperatura que ocasiona maior crescimento microbiano, maior perda de água e maior velocidade das reações enzimáticas nos queijos processados no verão.

A maioria dos grupos microbianos apresentam contagens máximas no sétimo dia de maturação e, em seguida, diminuíram progressivamente. Também nessa mesma etapa do processo de cura o pH atingiu seu valor mínimo, provavelmente devido à produção de ácido láctico pelas bactérias lácticas.

Provavelmente as populações microbianas de maior importância sobre o processo de maturação do Queijo Serrano, sendo, portanto, responsáveis pelas características de sabor, aroma e textura desse queijo são: proteolíticos, bactérias lácticas e halotolerantes.

Entre as bactérias lácticas, os lactobacilos são os mais importantes, tendo em vista o predomínio deste gênero entre as bactérias isoladas do Queijo Serrano ao longo de todo o processo de elaboração e maturação. A cultura “starter” deste queijo deverá conter, com certeza, *Lactobacillus* spp.

Os resultados das análises de coliformes fecais mostram a necessidade de orientar os pequenos produtores para que observem as normas básicas de higiene, a fim de que seus produtos cheguem ao consumidor com boas características higiênico-sanitárias. As condições

de limpeza das queijarias e dos utensílios e equipamentos, bem como a higiene pessoal, necessitam de cuidados redobrados, pois influenciam diretamente na qualidade dos produtos.

A textura, o sabor e o aroma dos queijos de 2 meses elaborados no inverno pode ser considerada adequada para este tipo de queijo e, inclusive, melhor que os do verão na mesma etapa de maturação, mas a qualidade microbiológica precisa ser melhorada. Portanto, o período de cura dos Queijos Serranos produzidos no inverno, a partir de leite cru e sem cultura lática, deveria ser estendido para mais de 60 dias, uma vez que isso poderia ter um efeito positivo na redução da quantidade de bactérias contaminantes, como, por exemplo, os coliformes fecais.

Além disso, tais resultados demonstram a importância da utilização de uma cultura lática na elaboração do Queijo Serrano.

Apesar da literatura ressaltar a importância do pH, acidez, umidade, a_w e conteúdo de NaCl no controle do crescimento de microrganismos nos queijos, principalmente os patogênicos, não observou-se um efeito significativo de qualquer um desses fatores inibitórios sob as contagens de todos os grupos microbianos analisados. Portanto, deve-se levar em conta que o progressivo desaparecimento dos microrganismos no interior do Queijo Serrano não é consequência da influência de um único parâmetro físico-químico, mas de um efeito combinado do pH, acidez, umidade, a_w , concentração de NaCl, temperatura e disponibilidade de oxigênio, pois a combinação de vários fatores exerce um efeito inibitório maior que cada um deles separadamente.

Enfim, os dados microbiológicos, químicos e físico-químicos do Queijo Serrano gerados nesta pesquisa, servirão como ponto de partida para o trabalho minucioso e fundamental a meta deste projeto, que é a de selecionar uma cultura lática específica para esse produto, condição essencial para a padronização de sua manufatura.

6. Perspectivas

Com base nos resultados desse trabalho, os desenvolvimentos futuros desta pesquisa incluirão :

- Caracterização bioquímica dos Queijos Serranos ao longo da maturação: glicólise, proteólise (frações nitrogenadas e aminoácidos livres) e lipólise (ácidos graxos livres);
- Identificação das bactérias lácticas isoladas do Queijo Serrano, a nível de espécie, com o auxílio de técnicas de biologia molecular ou provas bioquímicas;
- Caracterização das propriedades tecnológicas das bactérias lácticas: capacidade acidificante, proteolítica e lipolítica;
- Investigação da atividade antimicrobiana das bactérias lácticas, como por exemplo, a produção de bacteriocinas,;
- Seleção das cepas mais apropriadas para elaborar uma cultura “starter” para o Queijo Serrano;
- Purificação e caracterização das enzimas proteolíticas e lipolíticas das bactérias lácticas para que possam ser utilizadas como agentes de maturação;
- Análise de microrganismos potencialmente patogênicos, tais como *E.coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* e *Listeria* spp. no Queijo Serrano;
- Desenvolvimento de uma metodologia para determinação de cloretos em queijo por cromatografia líquida (HPLC);
- Determinação das características bioquímicas, físico-químicas e microbiológicas para os Queijos Serranos maturados sob condições controladas de temperatura e umidade relativa.

7. Referências Bibliográficas

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 16 ed., Washington, 1993. 546p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington, 1976. 702p.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2 ed., New York, 1966. 205p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Hydrogen-Ion activity (pH). 14.022 potentiometric method. In: HORWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis**. 13 ed. Washington, 1980. p. 213.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Dairy Products. In: HORWITZ, W. (Ed.) **Official methods of analysis**. 16 ed. Washington, 1996. Cap. 33, p.1-75.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Influência da fonte de carbono e da temperatura sobre a fermentação láctica desenvolvida por cultura mista de bactérias lácticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 19, p. 363-369, 1999.

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

BHOWMIK, T.; MARTH, E. H. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 73, p. 859-866, 1990.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Assessment of dairy product quality and potential shelf-life – a review. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 49, p. 739-753, 1986.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes**. Brasília, 1981. v.2: Métodos físicos e químicos.

BRASIL. Portaria n. 146, de 7 de março de 1996. Aprova Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, n. 48, p. 3977-3979, 11 mar. 1996. Seção 1.

BRIGGS, M. The classification of lactobacilli by means of physiological tests. **Journal General Microbiology**, London, v.9, p.234, 1953.

BULLERMAN, L. B. Public health significance of molds and mycotoxins in fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 64, p. 2439-2452, 1981.

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

CARRASCO DE MENDOZA, M. et al. Technological properties of enterococci in lactic starters: acidifying and lipolytic activities. **Microbiologie-Aliments-Nutrition**, Châtenay-Malabry, v. 10, p. 289-293, 1992.

CASAGRANDE, H. R.; POMBO, A.F.W. Fermentação da lactose no queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 43, p. 38-39, 1988.

CENTENO, J. A.; RODRIGUEZ-OTERO, J. L.; CEPEDA, A. Microbiological study of Arzúa cheese (NW Spain) throughout cheesemaking and ripening. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 14, p. 229-241, 1994.

CENTENO, J. A.; CEPEDA, A. ; RODRÍGUEZ-OTERO, J.L. Lactic acid bacteria isolated from Arzúa cows' milk cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 6, p. 65-78, 1996a.

CENTENO, J. A.; MENÉNDEZ, S.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 307-313, 1996b.

CHAMPAGNEE, C. P.; GIRARD, F.; MORIN, N. Inhibition of psychrotrophic bacteria of raw milk by addition of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 53, p. 400-403, 1990.

CHAPMAN, H. R.; SHARPE, M. E. Microbiología del queso. In: ROBINSON, R. K. (ed.), **Microbiología Lactológica: Microbiología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 1987. v. 2, cap. 5, p.147-221.

CHAVES, A. H.; PINHEIRO, A. J. R.; TEIXEIRA, M. A. Isolamento, caracterização e identificação de bactérias do gênero *Leuconostoc*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 50, p. 35-41, 1995.

COGAN, T.M. et al. Characterisation of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, London, v. 64, p.409-421, 1997.

COLLINS, E. B. Symposium on lactic starter cultures I. Culture identity and selection. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 45, p. 1263-1266, 1962.

CUESTA, P. et al. Evolution of the microbiological and biochemical characteristics of Afuega'l Pitu cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v.79, p. 1693-1698, 1996.

DE GIORI, G. S. et al. Microflora of Tafi Cheese: changes during manufacture and maturation. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, p. 518-521, 1983.

- De MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 23, p. 130-135, 1960.
- DESMAZEAUD, M. Lactic acid bacteria in food: use and safety. **Cahiers Agricultures**, Montrouge, v. 5, p. 331-343, 1996.
- DEVOYOD, J. J.; DESMAZEAUD, M. Microbial associations in Roquefort cheese. III. Action of enterococci and lactose-fermenting yeasts on lactobacilli. **Lait**, Paris, v. 51, p. 399-415, 1971.
- DILANJAN, S.C. **Fundamentos de la elaboración del queso**. Zaragoza: Acribia, 1984. 127p.
- DUMAIS, R.; BLAIS, J. A.; CONRAD, F. Cheese. In: BROCHU, E. et al. (Eds). **Dairy Science and Technology**. Canadá: La Fondation de Technologie Laitière du Québec, 1985. Cap. 9, p.233-279.
- ELLIOTT, R.P. et al. (Eds.). **Microorganismos de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1982. 431p.
- ELORTONDO, F. J. P. et al. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewes' milk cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 8, p. 725-732, 1998.
- EL SODA, M. A. The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 12, p. 239 – 252, 1993.
- EL SODA, M. A. et al. Cell-wall-associated proteinases in *L. casei* and *L. plantarum*. **Journal Food Protection**, Ames, v. 49, p. 361-365, 1986.
- ESTEPAR, J. et al. Biochemical and microbiological characterization of artisanal "Peñamellera" cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, Barking, v. 9, p. 737-746, 1999.
- FARIAS, M. E.; HOLGADO, A.A.P.R.; SESMA, F. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, p. 1013-1015, 1994.
- FERNANDEZ DEL POZO, B. et al. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. **Journal of Dairy Research**, London, v. 55, p. 449-455, 1988.
- FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (FEPAGRO) – Equipe de Agrometeorologia. **Dados de temperatura e umidade relativa coletados na Estação Meteorológica de Caxias do Sul. 2001**. (comunicação pessoal).
- FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE - INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). **Standard 27: Determination of the ash content of processed cheese products**. Brussels, 1964.
- FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE - INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). **Standard 43: Determination of the lactose content of cheese and processed cheese products**. Brussels, 1967.

FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE - INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). **Standard 50B: Milk and milk products. Methods of sampling.** Brussels, 1985.

FEDERATION INTERNATIONALE DE LAITERIE - INTERNACIONAL DAIRY FEDERATION (FIL-IDF). **Standard 5B: Cheese & processed cheese products. Determination of fat content.** Brussels, 1986.

FLEET, G.H. Microorganisms in food ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p.101-117, 1999.

FONTÁN, M. C. G. et al. Microbiological changes in "San Simón" cheese throughout ripening and its relationship with physico-chemical parameters. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 25-33, 2001.

FONTECHA, J. et al. Biochemical and microbiological characteristics of artisanal hard goat's cheese. **Journal of Dairy Science**. Lancaster, v. 73, p. 1150-1157, 1990.

FOX, P. F. Proteolysis during cheese manufacture and ripening. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 72, p. 1379-1400, 1989.

FOX, P. F. (Ed.). **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** 2 ed., London: Chapman & Hall, 1993. v.1, 601 p.

FOX, P. F. et al. **Fundamentals of cheese science.** Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 587p.

FOX, P. F.; LUCEY, J. A.; COGAN, T. M. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. **Critical Review Food Science and Nutrition**, West Palm Beach, v. 29, p. 237-253, 1990.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. Proteolysis in cheese during ripening. **Food Reviews International**, New York, v. 12, p. 457-509, 1996.

FREITAS, A. C. et al. Microbiological characterization of Picante da Beira Baixa cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p. 155-160, 1996.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo.** 2 ed. São Paulo: Editora Globo, 1990. 297p.

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

FURTADO, M. M. et al. Estudo conclusivo a respeito da fabricação do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, p. 13-16, 1980.

FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F.; CHAVES, J. B. P. Queijo Prato fabricado com cultura lática isolada de leite cru e soro de queijo artesanal da região do Serro, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 45, p. 14-17, 1990.

- GARCÍA, M. C. et al., Microbiological quality and composition of two types of Spanish sheep's milk cheeses (*Manchego and Burgos varieties*). **Journal of Dairy Research**, London, v. 54, p. 551-557, 1987.
- GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. Accelerated decrease of *Enterobacteriaceae* counts during ripening of raw milk Manchego cheese by lactic culture inoculation. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 46, p. 305-308, 1983.
- GAYA, P.; MEDINA, M.; NUÑEZ, M. *Enterobacteriaceae*, Coliforms, Faecal Coliforms and *Salmonellas* in raw ewe's milk. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 62, p. 321-326, 1987.
- GIOMETTI, J. ; PINHEIRO, A.J.R.; BRANDÃO,S.C.C. Efeito de culturas lácticas selecionadas e da temperatura de maturação sobre o pH, proteína solúvel e gordura de Queijo-de-Minas curado. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 20, p. 1-16, 1986.
- GOBBETTI, M. et al. Microbiology and biochemistry of Taleggio cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 509-517, 1997a.
- GOBBETTI, M. et al. Microbiology and biochemistry of Gorgonzola cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 519-529, 1997b.
- GOMES, M.I.F.V.; BONASSI, I.A. Aspecto microbiológico do queijo tipo Minas prensado. **Revista do Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, Juiz de Fora, v. 50, p. 23-26, 1995.
- GOMES, M.I.F.V.; BONASSI, I.A. Evolução da microbiota durante a cura do queijo Minas padronizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 16, p. 179-183, 1996.
- GÓMEZ, R.; PELÁEZ, C.; DE LA TORRE, E. Microbiological study of semi-hard goat's milk cheese (Majorero). **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 24, p. 147-151, 1989.
- GONZÁLEZ DE LLANO, D. et al. Microbiological and physicochemical characteristics of Gamonedo blue cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 2, p. 121-135, 1992.
- GOURAMA, H. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Penicillium* by *Lactobacillus* species. **Food Science Technology**, London, v. 30, p. 279-283, 1997.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Inhibition of growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* by *Lactobacillus* species. **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, p. 1249-1256, 1995a.
- GOURAMA, H.; BULLERMAN, L. B. Antimycotic and antiaflatoxigenic effect of lactic acid bacteria: a review . **Journal of Food Protection**, Ames, v.58, p. 1275-1280, 1995b.
- GRAPPIN, R.; BEUVIER,E. Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 751-761, 1997.

- HARGROVE, R.E.; MCDONOUGH, F.E.; MATTINGLY, W. A. Factors affecting survival of *Salmonella* in Cheddar and Colby cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v.32, p. 480-484, 1969.
- HATZIKAMARI, M. ; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological characteristics of Anevato: a traditional Greek cheese. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 87, p. 595-601, 1999.
- HARRIGAN, W.F. **Laboratory Methods in Food Microbiology**. 3. ed. London: Academic Press, 1998. 532p.
- HERNÁNDEZ, M.; BARNETO, R.; GARRIDO, P. Microbiología del queso de Gamonedo. **Alimentaria**, Madrid, v. 25, p. 47-50, 1989.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3. ed., São Paulo, 1985. v.1, 533p. Métodos Químicos e Físicos para análise de alimentos.
- ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência do emprego de culturas lácticas nas características do queijo tipo minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, p. 1-5, 1995.
- JAY, J. M. Fermented foods and related products of fermentation. In: **Modern food microbiology**. 4. ed., New York: Van Nostrand Reinhold, 1992. Cap. 16, p. 371-409.
- KAMALY, K. M.; MARTH, E. H. Enzyme activities of lactic streptococci and their role in maturation of cheese: a review. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 72, p.1945-1966, 1989.
- KAMALY, K. M.; TAKAYAMA, K.; MARTH, E. H. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* and their mutants. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 73, p. 280-290, 1990.
- KAMINOGAWA, S. et al. Identification of low molecular weight peptides in Gouda type cheese and evidence for the formation of these peptides from 23 N-terminal residues of α_{s1} -casein by proteinases of *S. cremoris* H61. **Journal Food Science**, Chicago, v. 51, p. 1253-1256, 1264. 1986.
- KAMINARIDES, S. E.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of the microflora of Kopanisti cheese during ripening: study of the yeast flora. **Lait**, Paris, v. 69, p. 537-546, 1989.
- KANDLER, O. ; WEISS, N. Genus *Lactobacillus*. In: SNEATH, P. H. A. et al. (Eds). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. v. 2, p. 1209-1234.
- KHALID, N. M.; MARTH, E. H. Lactobacilli-their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 73, p. 2669-2684, 1990.
- KLEIN, H.; FUNG, D. Y. C. Identification and quantification of fecal coliforms using violet red bile agar at elevated temperature. **Journal of Milk and Food Technology**, Ames, v. 39, p. 768-770, 1976.

KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. New York: Brooktondale, 1977. 609p.

LALEYE, L. C. et al. Quality attributes of Cheddar cheese containing added lactobacilli. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 114-118, 1990.

LIEU, F.Y.; BULLERMAN, L. B. Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates. **Journal Food Science**, Chicago, v. 42, p. 1222-1224, 1228, 1977.

LIMA et al. Biotechnological production of lipases. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Anais**. Foz do Iguaçu: SBM, 2001. p. 334.

LITOPOULOU-TZANETAKI, E.. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyri cheese. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, p. 111-113, 1990.

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

LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A. Effect of the type of lactic starter on microbiological chemical and sensory characteristics of Feta cheese. **Food Microbiology**, London, v. 10, p. 31-41, 1993.

LÓPEZ-DÍAZ, T.M. et al. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, p. 23-32, 2000.

LÓPEZ, S.; MAYO, B. Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, p. 233-238, 1997.

LÜCK, H; DUNKELD, M. *Enterobacteriaceae* in cheese. **South African Journal Dairy Technology**, Verwoerdburg, v. 13, p. 9-14, 1981.

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

MACEDO, A.C.; MALCATA, F.X.; HOGG, T.A. Microbiological profile in Serra ewes' cheese during ripening. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, p. 1-11, 1995.

MACEDO, A. C.; MALCATA, F. X.; OLIVEIRA, J. C. The technology, chemistry, and microbiology of Serra Cheese: A review. **Journal of Dairy Science**. Lancaster, v. 76, p. 1725-1739, 1993.

MARCOS, A. et al. Water activity and chemical composition of cheese. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 64, p. 622-626, 1981.

MARCOS, A. et al. Chemical composition and water activity of Spanish Cheeses. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 66, p. 2488-2493, 1983.

- MARGOLLES, A.; RODRIGUEZ, A.; REYES-GAVILAN, C. G. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses from Asturias, Spain. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 59, p. 509-515, 1996.
- MARTINS, J.F.P. et al. Maturação de queijo Prato: evolução da microflora láctica. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v. 10, p. 45-58, 1979.
- MARTLEY, F. G.; CROW, V.L. Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 3, p. 461-483, 1993.
- McSWEENEY, P. L. H. et al. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, Barking, v. 3, p.613-634, 1993.
- MEDINA, M.; GAYA, P.; NUÑEZ, M. Gredos goats' milk cheese: microbiological and chemical changes throughout ripening. **Journal of Dairy Research**, London, v. 59, p. 563-566, 1992.
- MEDINA, M. L. R et al. Microbiological study of León Raw Cow-Milk Cheese, a Spanish Craft Variety. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 57, p. 998-1006, 1995.
- MENÉNDEZ, S.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Enterococos em quesos. **Alimentaria**, Madrid, v. 35, p.69-73, 1999.
- MENÉNDEZ, S. et al. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of "Tetilla" raw cows-milk cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 151-158, 2001.
- MOR-MUR, M. et al. Microbiological changes during ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. **Food Microbiology**, London, v. 11, p. 177-185, 1994.
- NATH, K. R. Cheese. In: HUI, Y. H. (Ed.), **Dairy science and technology handbook**. USA: VCH Publishers, 1993. v.2, cap. 3, p.161-255.
- NHUCH, E. L. **Estudio bioquímico del proceso madurativo del queso de San Simón da Costa elaborado por procedimientos artesanales e industriales con vistas a la mejora de su tecnología de fabricación**. 2000. 217 f. Tese (Doutorado em Biologia), Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León. 2000.
- NUÑEZ, J. A.; CHAVARRI, F. J.; NUÑEZ, M. Psychrotropic bacterial flora of raw ewes' milk, with particular reference to Gram negative rods. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 57, p. 23 -29, 1984.
- NUÑEZ, M. Microflora of Cabrales cheese: changes during maturation. **Journal of Dairy Research**, London, v. 45, p. 501-508, 1978.
- NUÑEZ, M.; GAYA, P.; MEDINA, M. Influence of manufacturing and ripening conditions on the survival of *Enterobacteriaceae* in Manchego cheese. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 68, p. 794 - 800, 1985.
- OCANDO, A. J. F. et al., Microflora isolated from Venezuelan "Palmita-type" cheese. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 54, p.856-860, 1991.

- OLARTE, C. et al.; Microbiological and physicochemical characteristics of Cameros cheese. **Food Microbiology**, London, v. 16, p. 615-621, 1999.
- OLIVEIRA, J. S. **Queijo: fundamentos tecnológicos**. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1986, 146p.
- OLSON, J. C.; MOCQUOT, Y. G. Leche y productos lácteos. In: ELLIOTT, R. P. et al. (Eds.). **Ecología Microbiana de los Alimentos: productos alimenticios**. Zaragoza: Acribia, 1985. v. 2, p. 472-525.
- ORDÓÑEZ, J. A. ; BURGOS, J. Étude de la variété de fromage "Ulloa". **Le Lait**, Paris, v. 57, p. 150-163, 1977.
- OXOID. **Manual Oxoid**. Hampshire:Unipath, 1995. 389p.
- PALEARI, M. A. et al. A study on a typical mountain raw milk cheese. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 13, p. 723-735, 1993.
- PETERSON, S. D. ; MARSHALL, R. T. Non starter lactobacilli in Cheddar Cheese. a review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 73, p. 1395-1410, 1990.
- POULLET, B. et al., Microbial study of Casar de Cáceres cheese throughout ripening. **Journal of Dairy Research**, London, v. 58, p. 231 – 238, 1991.
- POULLET, B. et al. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 60, p. 123-127, 1993.
- PRIETO, B. et al. Biochemical characteristics of León raw cow milk cheese, a Spanish craft variety. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 14, p. 203 – 215, 1994.
- PRIETO, B. et al. "Quesucos de Liébana" cheese from cow's milk: biochemical changes during ripening. **Food Chemistry**, Oxford, v. 70, p. 227-233, 2000.
- PUCCI, M.J. et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-I produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 2349-2353, 1988.
- QUINTO et al., Microbiological quality of Cebrero cheese from Northwest Spain. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 14, p. 1- 8, 1994.
- REQUENA, T.; PELÁEZ, C.; DESMAZEAUD, M. J. Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goats'cheese. **Journal of Dairy Research**, London, v. 58, p. 137-145, 1991.
- REUTER, G. Elective and selective media for lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 2, p. 55-68, 1985.
- ROOSTITA, R.; FLEET, G.H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and blue-veined cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 28, p. 393-404, 1996.

- ROGOSA, M.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN, R. F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and faecal lactobacilli. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 132-133, 1951.
- SABLÉ, S. et al. Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 21, p. 212-220, 1997.
- SANTOS, E.S.; CARVALHO, E. P.; ABREU, L. R. Psicrotóxicos: consequências de sua presença em leites e queijos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 33, p. 129-138, 1999.
- SANTOS, J. A. et al. Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 33, p. 301 – 306, 1996.
- SCHILLENGER, U.; LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 1901-1906, 1989.
- SCOTT, P.M. Mycotoxigenic fungi contaminants of cheese and other dairy products. In: VAN EGMOND, H.P. (Ed). **Mycotoxins in dairy products**, New York: Elsevier Applied Science, 1989. p. 193-259.
- SCOTT, R. **Fabricación de queso**. Zaragoza: Acribia, 1991. 520p.
- SHARPE, M.E. Selective media for the isolation and enumeration of lactobacilli. **Laboratory Practice**, London, v. 9, p. 223-227, 1960.
- SHARPE, M.E. Taxonomy of the lactobacilli. **Dairy Science Abstract**, Schinfield, v. 24, p.109-118, 1962.
- SHARPE, M. E.; FRYER, T.F.; SMITH, D.G. Identification of the lactic acid bacteria. In: GIBBS, B.M.; SKINNER, F.A. (Eds.) **Identification methods for microbiologists**. London: Academic Press, 1966. p. 65-77.
- SHARPE; M.E. Identification of lactic acid bacteria. In: SKINNER, F.A.; LOKLOK, D.W. (Eds.) **Identification methods for microbiologist**. New York: Academic Press, 1979. p. 233-259.
- SILVA, A. T.; VAN DENDER, A. G. F.; BALDINI, V. L. S. Perfil eletroforético do queijo tipo prato obtido com incorporação de enzimas proteolíticas. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16, 1999, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: Instituto de Laticínios Cândido Tostes, 1999. p. 150-156.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela. 1997. 295p.
- SINGH, A.; SCRINIVASAN, S.A.; DUDANI, A. T. Studies on exocellular and endocellular lipases of some of the lipolytic bacteria. **Milchwissenschaft**, Munchen, v. 28, p. 164-166, 1973.
- SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.

- TAVARIA, F. K.; MALCATA, F.X. Microbiological characterization of Serra da Estrela Cheese throughout its appellation d'Origine Protégée Region. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, p. 601-607, 1998.
- TATINI, S. R. et al. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheeses. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 54, p. 815-825, 1971.
- TERZAGHI, B. E.; SANDINE, W. E. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. **Applied Microbiology**, Washington, v. 29, p. 807-813, 1975.
- TORNADIJO, M. E. **Evolución e identificación de los microorganismos responsables de la maduración del Queso de Armada, variedad Sobado**. 1995. 312 f. Tese (Doutorado em Biologia), Facultad de Veterinaria, Universidad de León. León. 1995
- TORNADIJO, M. E. et al., Microbiological changes throughout the manufacturing and ripening of a Spanish goat's raw milk cheese (Armada variety). **Lait**, Paris, v. 75, p. 551-570, 1995.
- TORNADIJO, M.E. et al. Study of *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simón cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 499-509, 2001.
- TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Ed. da UFSM. 1997. 166p.
- TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E. Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two greek cheeses from ewes'milk. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, p. 1389-1393, 1992.
- VASSILIADOU, D.K.; TZANETAKIS, N.; TZANETAKI, E.L. Microbiological and physicochemical characteristics of Anthotyro, a Greek traditional whey cheese. **Food Microbiology**, London, v. 11, p. 15-19, 1994.
- VIVIER, D. et al. Study of the growth of yeasts from Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 22, p. 207-215, 1994.
- WEGNER, W. Relatório prático sobre a elaboração dos queijos Estepe e Montanhese com características de Emmenthal e Gruyere em queijarias do Rio Grande do Sul no período de 1980-1983. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 42, p. 29-38, 1987.
- WESSELS, D.; JOOSTE, P. J.; MOSTERT, J.F. Technologically important characteristics of *Enterococci* isolates from milk and dairy products. **International Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 10, p. 349-352, 1990.
- YÚFERA, E. P. La leche y los produtos lacteos. In: QUÍMICA de los alimentos. Madrid: Editorial Síntesis, 1998. Cap. 9, p. 343-364.
- ZARATE, V. et al. Changes in the microbial flora of Tenerife goat's milk cheese during ripening. **International Dairy Journal**, Barking, v. 7, p. 635-641, 1997.

8. APÊNDICES

Apêndice 1

Questionário

Visita aos produtores de queijo

Produtor:

Localidade:

1. Rebanho:
 - Raça:
 - Quantidade:
2. Produção (quantidade, formato, etc.):
3. Leite
 - Tratamento (sim/não):
 - Gordura:
4. Coagulação do Leite
 - Tipo de coalho: (pasta/líquido/pó)
 - Poder coagulante:
 - Tempo de coagulação:
 - Temperatura:
5. Prensagem
 - Pressão (sim/não):
 - Tempo de prensagem:
6. Salga
 - Tipo (direta, superfície, seca, imersão) :
 - Tempo:
 - Quantidade de sal:
7. Maturação
Ações durante a maturação (limpeza, salga periódicas, tempo, outros tratamentos)
8. Conservação dos Queijos
 - Temperatura:
 - Umidade relativa:
 - Massa média das forma:
9. Tratamento da superfície (sim/não):
10. Defeitos Apresentados:

Apêndice 2

Dados diários de temperatura durante o período de coleta dos queijos

Dias	Temperaturas (°C)														
	Janeiro			Fevereiro			Março			Julho			Agosto		
	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med	Min	Máx	Med
1				19	24	21,5	17,5	29,5	23,5	11,4	20	15,7	15	26	20,5
2				18,2	29	23,6	18,1	29,1	23,6	11,6	15,8	13,7	16,8	28,5	22,7
3				18,8	24,6	21,7	18,8	27	22,9	11,4	22,4	16,9	16	27	21,5
4				17,1	21,9	19,5	18,2	27,7	22,9	12,9	23,5	18,2	16	25	20,5
5				18,5	26,8	22,6	19	29	24	6,4	15,3	10,9	14	25,2	19,6
6				19,5	27,2	23,4	19	28,5	23,8	6	18,8	12,4	13,5	25	19,3
7				18,1	30	24,1	17,9	25,7	21,8	12,3	22	17,2	14	19	16,5
8				20,4	31	25,7	18,2	27	22,6	12	22,2	17,1	12,2	24	18,1
9				19,8	28	23,9	18,8	26,3	22,6	15	24,9	19,9	13,7	22	17,9
10				19,8	28,6	24,2	17,5	28	22,8	14,3	20,4	17,4	12	12,2	13,6
11				20	30	25	15	24,8	19,9	14,3	17,4	15,9	10,9	19,5	15,2
12				20,4	23	21,7	15	24,2	19,6	0	9	4,5	10,8	22,9	16,9
13				17,4	24	20,7	18	29	23,5	1	14,6	7,8	11,8	24	17,9
14				17,8	26,8	22,3	19,5	29,2	24,4	5,6	17,7	11,7	13	24,4	18,7
15				18,2	24	21,1	20	26,2	23,1	9,1	20,1	14,6	13	24	18,5
16				15,2	24	19,6	18,2	24,5	21,4	13,6	24,9	19,3	12,8	24	18,4
17				16	27	21,5	18,8	26	22,4	16,5	23,3	19,9	11,9	23,2	17,6
18				18,8	25	21,9	18,8	25,5	22,2	14	18	16	14,1	24,5	19,3
19				17,8	24,8	21,3	17,5	24,3	20,9	12,5	22,4	17,5	16,2	21,4	18,8
20				17,3	26	21,7	17,5	26,8	22,2	14	19,1	16,6	9,2	14,4	11,8
21				17,2	28,2	22,7	17,6	28	22,8	7,1	13,5	10,3	7,8	13,7	10,8
22				19,5	26,7	23,1	20	29	24,5	5,8	9,2	7,5	4,8	14	9,4
23				18,8	29	23,9	19,7	24,3	22	0	11,4	5,7	7,1	14,5	10,8
24				19,6	28	23,8	18,2	22	20,1	3	13,2	8,1	9	21	15
25				19	27	23	17,9	26,8	22,4	7	19	13	11,5	23,6	17,6
26				20	28,1	24	18,3	21	19,7	11	14,4	12,7	16	28,6	22,3
27				19	28,5	23,8	14,7	20	17,4	2	7,5	4,75	15	21,8	18,4
28				20	28	24	13	22	17,5	-2	9,4	3,7	9,6	14,5	12
29							13,1	22,3	17,7	0,7	17	8,9	9,6	22	15,8
30	17	24,5	20,8				15	25,5	20,3	7,2	21,6	14,4	12,6	23,3	18
31	18,2	23,8	21				16	26	21	11,1	25,3	18,2	16,4	22,2	19,3

FONTE: FEPAGRO (2001)

Dados diários de umidade relativa durante o período de coleta dos queijos

Dias	Umidade Relativa (%)																			
	Janeiro				Fevereiro				Março				Julho				Agosto			
	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med	9	15	21	Med
1					87	80	94	87	69	40	80	63	73	54	75	67,3	70	44	55	56,3
2					75	46	94	71,7	71	41	89	67	96	87	90	91	60	30	45	45
3					95	80	96	90,3	87	74	70	77	80	55	79	71,3	44	30	31	35
4					91	91	89	90,3	82	50	75	69	77	43	95	71,7	51	38	55	48
5					85	91	94	90	89	40	79	69,3	98	94	94	95,3	59	36	38	44,3
6					96	56	80	77,3	80	58	93	77	88	55	85	76	59	39	51	49,7
7					80	41	75	65,3	96	60	92	82,7	86	46	75	69	88	98	99	95
8					80	39	76	65	94	55	89	79,3	66	49	64	59,7	98	40	91	76,3
9					76	49	66	63,7	82	76	90	82,7	80	41	54	58,3	80	50	91	73,7
10					81	49	76	68,7	84	44	80	69,3	92	54	74	73,3	99	86	95	93,3
11					80	45	89	71,3	89	50	80	73	96	95	87	92,7	92	40	81	71
12					90	93	96	93	75	56	91	74	90	35	75	66,7	89	34	46	56,3
13					95	65	85	81,7	70	40	88	66	59	22	59	46,7	90	31	69	63,3
14					91	54	81	72	79	70	86	78,3	54	35	44	44,3	70	30	50	50
15					92	80	89	87	88	92	95	91,7	57	33	54	48	74	31	60	55
16					92	53	91	78,7	85	63	86	78	56	39	56	50,3	80	37	62	59,7
17					80	46	83	69,7	93	56	84	77,7	58	45	94	64,7	92	45	66	67,7
18					79	65	89	77,7	94	60	89	81	91	95	90	92	72	36	53	53,7
19					90	69	90	83	96	70	92	86	84	65	71	73,3	74	94	97	88,3
20					90	51	71	70,7	90	50	92	77,3	96	96	97	96,3	99	83	96	92,7
21					75	49	80	68	75	53	80	69,3	96	50	94	80	90	59	93	80,7
22					74	54	85	71	87	54	70	70,3	97	81	95	91	89	66	95	83,3
23					65	45	72	60,7	80	66	84	76,7	94	35	94	74,3	96	52	60	69,3
24					76	56	81	71	94	90	93	92,3	90	61	96	82,3	90	34	82	68,7
25					89	74	85	82,7	94	56	75	75	82	62	94	79,3	81	55	66	67,3
26					85	85	85	85	96	82	93	90,3	99	97	99	98,3	51	29	51	43,7
27					60	36	82	59,3	86	60	80	75,3	99	78	81	86	70	87	95	84
28					72	54	80	68,7	71	42	80	64,3	97	44	74	71,7	98	89	90	92,3
29									81	46	78	68,3	65	30	74	56,3	95	60	80	78,3
30	94	81	85	86,7					75	38	89	67,3	74	31	75	50	82	45	61	62,7
31	93	91	96	93,3					76	70	91	79	79	36	53	56	86	97	80	87,7

FONTE: FEPAGRO (2001)

Apêndice 3

Datas das Coletas das Amostras no Verão

30/01/01	Elaboração dos queijos e coleta dos leites e coalhadas
06/02/01	Coleta dos queijos de 7 dias
13/02/01	Coleta dos queijos de 14 dias
27/02/01	Coleta dos queijos de 28 dias
13/03/01	Coleta dos queijos de 42 dias
31/03/01	Coleta dos queijos de 60 dias

Datas das Coletas das Amostras no Inverno

01/07/01	Elaboração dos queijos coleta dos leites e coalhadas
08/07/01	Coleta dos queijos de 7 dias
15/07/01	Coleta dos queijos de 14 dias
29/07/01	Coleta dos queijos de 28 dias
12/08/01	Coleta dos queijos de 42 dias
30/08/01	Coleta dos queijos de 60 dias

Apêndice 4

- Água Peptonada

Reagentes	Quantidade (g)
Peptona bacteriológica	1

Dissolver em 1L de água destilada e se esteriliza em autoclave a 121⁰C/15 min.

- Citrato de Sódio

Reagentes	Quantidade (g)
Citrato de sódio tribásico	20

Dissolver em 1L de água destilada e se esteriliza em autoclave a 121⁰C/15 min.

- Ágar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile (VRBA)

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de Levedura	3
Peptona	7
NaCl	5
Sais Biliares	1,5
Lactose	10
Vermelho Neutro	0,03
Cristal Violeta	0,002
Ágar	12

Pesa-se 38,5 g do meio em 1L de água destilada e ferve-se até a dissolução completa do meio. Esterilizar, na autoclave, em vapor fluente por cerca de 5min.. O pH final deste meio deve ser de $7,4 \pm 0,2$.

- Solução de Ácido Tartárico

Reagentes	Quantidade (g)
Ácido Tartárico	10

Dissolve-se o ácido em água destilada e completa-se o volume para 100 mL. Esteriliza-se por filtração com membrana filtrante de 0,2 μ m (Millipore/Brasil).

- Ágar Batata Dextrosado

Reagente	Quantidade (g)
Extrato de Batata	4
Glicose	20
Ágar	15

pH $5,6 \pm 0,1$

Pesa-se 39 g do meio em 1L de água destilada, deixa-se descansar por 15min e ferve-se até completa dissolução. Esteriliza-se em autoclave a 121⁰C/15 min. Adiciona-se uma quantidade suficiente de solução aquosa de ácido tartárico 10% estéril para obter pH final de 3,5.

- Ágar Padrão para Contagem (PCA)

Reagentes	Quantidade (g)
Triptona	5
Extrato de Levedura	2,5
Glicose	1
Ágar	9

pH 7,0 ± 0,2

Pesa-se 17,5g do meio em 1L de água destilada, deixa-se descansar durante 15 min, após ferve-se até dissolução total. Esteriliza-se em autoclave a 121⁰C/15 min.

- Ágar Manitol Salgado (MSA)

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de carne	1
Peptona	10
NaCl	75
Manitol	10
Vermelho de Fenol	0,025
Ágar	15

pH 7,5 ± 0,2

Pesa-se 111 g do meio em 1L de água destilada e ferve-se até a dissolução completa do meio. Esteriliza-se em autoclave a 121⁰C/15 min.

- Leite Reconstituído (10%)

Reagentes	Quantidade (g)
Leite em Pó Desnatado	10

Dissolve-se o leite em água destilada e completa-se o volume para 100 mL. Esteriliza-se na autoclave, em vapor fluente, durante 30 min.

- Ágar Leite

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de Levedura	3
Peptona de Carne	5
Ágar	15

Dissolver em 900 mL de água destilada e ferver até a dissolução completa do meio. Esteriliza-se em autoclave a 121⁰C/15 min. Adicionar ao meio estéril fundido 100 mL de leite desnatado reconstituído (10%) estéril.

- Ágar Tributirina

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de Levedura	3
Tributirina Neutra	10
Peptona	5
Ágar	15

pH 7,5 ± 0,2

Dissolver em 1 L de água destilada e ferver até a dissolução completa do meio. Esteriliza-se em autoclave a 121⁰C/15 min. Em seguida resfriar o meio, a temperatura ambiente, sob agitação constante com movimentos oscilatórios. Distribuir nas placas quando estiver frio. Após resfriamento, o meio deve ter o aspecto de uma emulsão turva homogênea.

- Solução de Lactose (10%)

Reagentes	Quantidade (g)
Lactose	10

Dissolver em água destilada e completar para o volume de 100 mL. Esterilizar em autoclave a 121⁰C durante 15 min ou por filtração através de uma membrana de 0,2µm.

- Ágar M17

Reagentes	Quantidade (g)
Triptona	5
Peptona de Soja	5
Digerido de Carne	5
Extrato de Levedura	2,5
Ácido Ascórbico	0,5
Sulfato de Magnésio	0,25
Glicerofosfato Disódico	19
Ágar	11

pH 6,9 ± 0,2

Dissolver 48,25g do meio em 950 mL de água destilada e aquecer suavemente até ebulição. Esterilizar em autoclave a 121⁰C durante 15 min. Esfriar a 50⁰C e adicionar 50 mL da solução de lactose estéril (a 10% p/v).

- Ágar Rogosa

Reagentes	Quantidade (g)
Triptona	10
Extrato de Levedura	5
Glicose	20
Tween 80	1
Fosfato Monopotássico	6
Citrato de Amônio	2
Acetato de Sódio Anidro	17
Sulfato de Magnésio	0,575
Sulfato de Manganês	0,12
Sulfato Ferroso	0,034
Ágar	20

pH $5,4 \pm 0,2$

Pesar 82g do meio e dissolver em 1L de água destilada. Levar a ebulição até dissolução completa. Adicionar 1,32 mL de ácido acético glacial e misturar. Aquecer a 90-100° durante 2-3 min com agitação frequente. Não autoclavar.

- Ágar MRS

Reagentes	Quantidade (g)
Peptona Bacteriológica	10
Extrato de Levedura	4
Extrato de Carne	8
Glicose	20
Tween 80	1
Fosfato Dipotássico	2
Citrato de Amônio	2
Acetato de Sódio. 3H ₂ O	5
Sulfato de Magnésio	0,2
Sulfato de Manganês	0,05
Ágar	10

pH $6,2 \pm 0,2$

Pesa-se 62g do meio e dissolve-se em 1L de água destilada. Leva-se a ebulição até dissolução completa. Esterilizar em autoclave a 121°C/15min.

- Soluções para Coloração de Gram

Cristal Violeta

Solução A

Reagentes	Quantidade
Cristal Violeta	0,4 g
Etanol 95%	10 mL

Solução B

Reagentes	Quantidade
Fenol Fundido	1g
Água Destilada	100mL

Diluir o cristal violeta com o etanol, em seguida adicionar o fenol dissolvido na água.

Manter durante 24h em repouso e após filtrar.

Fucsina

Solução A

Reagentes	Quantidade
Fucsina Básica	0,3 g
Etanol 95%	10 mL

Solução B

Reagentes	Quantidade
Fenol Fundido	5 g
Água Destilada	95 mL

Misturar as soluções A e B. Diluir 1/10.

Lugol

Reagentes	Quantidade (g)
Iodo	5
Iodeto de Potássio	10

Mistura-se os dois reagentes e adiciona-se 100 mL de água destilada.

Diluir 1/15.

Alcool-Acetona

Reagentes	Quantidade (mL)
Acetona	50
Etanol 95%	50

Misturar os reagentes.

- Meio Semi-Sólido de Gibson

Reagentes	Quantidade (g)
Extrato de Carne	0,20
Extrato de Levedura	3
Peptona	1
NaCl	1
Glicose	50
Sulfato de Manganês(II)	0,04
Ágar	3

Pesa-se, dissolve-se em 500 mL de água destilada, leva-se a ebulição e se distribui num frasco de 1L de capacidade. Esteriliza-se a 121⁰C/15min.

Dilui-se 100g de leite em pó desnatado em 500 mL de água destilada e esteriliza-se na autoclave em vapor fluente durante 30 min.

O leite em pó desnatado quente é vertido sobre o meio base, homogeneiza-se e se distribui em tubos estéreis.

- Reativo de Nessler

Reagentes	Quantidade (g)
KI	7
HgI ₂	10
KOH	10

Ambos os iodetos são dissolvidos em 40 mL de água destilada. Dissolve-se o hidróxido de potássio em 50 mL de água destilada e se esfria. Mistura-se ambas as soluções e completa-se com água até 100 mL. Deixa-se que o precipitado sedimente, transfere-se o sobrenadante claro para um frasco e descarta-se o precipitado.

- Solução Alcóolica de Fenolftaleína

Reagentes	Quantidade
Fenolftaleína	2g
Etanol 96%	100mL

Dissolver a fenolftaleína no etanol.

-Solução Ácida para Digestão das Proteínas

Reagentes	Quantidade
CuSO ₄ .5H ₂ O	10g
K ₂ SO ₄	90g
H ₂ SO ₄ 98%	500 mL

Os sulfatos são dissolvidos em 500 ml de água destilada e após lentamente são adicionados os 500 mL de H₂SO₄ concentrado.

- Indicador Tashiro

Reagentes	Quantidade
Vermelho de Metila	0,6 g
Álcool Etilico 95%	50 mL
Azul de Metileno	0,1 g

Dissolve-se o azul de metileno em 50 mL de água destilada e mistura-se com a solução alcoólica de vermelho de metila.

- H₂SO₄ d=1,820

Reagentes	Quantidade (mL)
H ₂ SO ₄ d= 1,840	925
H ₂ O destilada	120

Misturar cuidadosamente a água com o ácido. Esfriar e conferir com densímetro.

- Solução Saturada de Permanganato de Potássio

Reagentes	Quantidade (g)
KMnO ₄	5

Deixa-se saturar 100 mL de água destilada com 5g de KMnO₄.

- Solução Saturada de Sulfato Férrico Amoniacal

Reagentes	Quantidade (g)
NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	36

Deixa-se saturar 100 mL de água destilada com 36g de NH₄Fe(SO₄)₂ e goteja-se HNO₃ 6N até desaparecer a cor marrom da solução.

- Solução de Tiocianato de Potássio 0,1N

Reagentes	Quantidade (g)
KSCN	10

Dissolve-se cerca de 10 g de KSCN em água destilada e completa-se a 1L. Padroniza-se o KSCN 0,1N com a solução padrão de AgNO₃ 0,1N.

- Solução de Sulfato de Zinco 30%

Reagentes	Quantidade (g)
Zn ₂ SO ₄ .7H ₂ O	30

Dissolve-se o sulfato de zinco em água destilada e completa-se até um volume final de 100 mL.

- Solução de Ferrocianeto de Potássio 15%

Reagentes	Quantidade (g)
K ₄ Fe(CN) ₆ .3H ₂ O	15

Dissolve-se o ferrocianeto de potássio em água destilada e completa-se até um volume final de 100 mL.

- Solução de Sulfato de Cobre II

Reagentes	Quantidade (g)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	70

Dissolve-se o sulfato de cobre II em água destilada e completa-se a 1L. Deixa-se repousar e filtra-se caso seja necessário.

- Solução de Tartarato Alcalino

Reagentes	Quantidade (g)
Tartarato de Sódio e Potássio Tetrahidratado	350
NaOH	100

Dissolve-se em água destilada e completa-se a 1L. Deixa-se repousar durante 2 dias em um frasco tampado e, após, filtra-se.