



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS

**AVALIAÇÃO DO QUEIJO FRESVAL OBTIDO POR COAGULAÇÃO ÁCIDA E O
EFEITO DA NISINA NOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS**

Autora: Bruna Paulino Conti

Orientadora: Rosalinda Arévalo Pinedo

DOURADOS -MS

2013



BRUNA PAULINO CONTI

**AVALIAÇÃO DO QUEIJO FRESCAL OBTIDO POR COAGULAÇÃO ÁCIDA E O
EFEITO DA NISINA NOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal da Grande Dourados
como requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

**Orientadora: Prof^ª Dra. Rosalinda Arévalo
Pinedo**

DOURADOS-MS

2013

Dedico este trabalho aos meus pais Alice e Fernando, que mesmo em meio às dificuldades, sempre priorizaram a educação de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me concedido a vida, com muita saúde para que pudesse ir atrás de todos os meus sonhos e aos poucos torná-los realidade.

Aos meus Pais Maria Alice Paulino Conti e Antônio Fernando Conti por me apoiarem em todas as minhas decisões, e por terem priorizado a educação de seus filhos, com muito amor e respeito. Aos demais familiares, por todo o apoio.

Agradeço a todos os professores do Curso de Biotecnologia, onde mesmo em meio às dificuldades por ser a primeira turma, fizeram de tudo para que o melhor ensinamento nos fosse passado.

A Prof^a Rosalinda, por ter me orientado durante todo este tempo, por toda sua paciência e dedicação. Sem seus ensinamentos certamente este trabalho não teria sido concluído.

Agradeço também a Taiane, Thuliane, Bruno Centenaro, Fabi, João e Prof^a Angela, por todo o apoio na execução deste trabalho.

Agradeço ao Prof^o. Dr. Marcelo Fossa da Paz e a Prof^a. Dra. Angela Dulce Cavenaghi, por aceitarem participar da banca examinadora do meu Trabalho de Conclusão de Curso.

Agradeço as minhas amigas Jéssica, Jaine, Allyne e Barbara que sempre estiveram ao meu lado nestes quatro anos de faculdade, pela companhia, cumplicidade e amizade. Por fazerem meus dias mais felizes, mesmo quando o desânimo as vezes se fizesse maior.

A todos os meus colegas e amigos da I Turma, pela parceria e companheirismo. Se não fosse o empenho e dedicação de cada um, hoje não estaríamos concluindo o curso.

Muito Obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes” (Marthin Luther King).

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos específicos.....	11
3. REVISÃO	12
3.1 Leite.....	12
3.2 Microbiota do Leite.....	13
3.3 Importância dos componentes do leite	13
3.4 Queijo.....	15
3.5 Queijo Minas Frescal	15
3.6 Coagulação do leite.....	16
3.7 Fatores de influência no desenvolvimento de Micro-organismos.....	16
3.8 Bacteriocinas	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Matéria Prima.....	18
4.2 Análises Físico-Químicas.....	18
4.2.1 Determinação do pH.....	18
4.2.2 Determinação da Acidez Total Titulável, ATT.....	19
4.2.3 Determinação de Lipídeos.....	19
4.2.4 Determinação do conteúdo de umidade	19
4.2.5 Determinação da atividade de água, A_w	19
4.2.6 Determinação de proteína.....	19
4.3 Obtenção dos queijos através da coagulação ácida	19
4.4 ANÁLISES DURANTE A ARMAZENAGEM	21
4.4.1 Análises Microbiológicas.....	21
4.4.2 Análise Sensorial.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Caracterizações da qualidade do leite.	22
5.2 Caracterizações físico-químicas do Queijo.	23
5.3 Análises microbiológicas	24
5.4 Avaliação dos atributos Sensoriais.....	26
5.5 Resultados da força de cisalhamento.	28
6. CONCLUSÕES.....	29
7. REFERÊNCIAS	30

RESUMO

A qualidade e vida de prateleira dos queijos são fatores fundamentais para garantir a comercialização, sem afetar a saúde do consumidor. Os queijos obtidos através de coagulação ácida são pouco processados e comercializados, desconhecidos devido à falta de hábitos da população e dos fabricantes, e por ser um produto altamente perecível. A nisina por possuir um amplo espectro de ação contra os patógenos e bactérias Gram positivas, se torna um bactericida e um conservante alimentar na produção de queijos, sendo permitida pela legislação. O objetivo de este trabalho foi avaliar o efeito da nisina em duas formas (seca e úmida), sobre os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais no queijo minas frescal, obtido através da coagulação ácida (ácido acético). As análises físico-químicas que se realizaram no leite *in natura* foram pH, acidez, gordura. Nos queijos obtidos foram realizadas as análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. Na presente pesquisa se elaboraram três tipos de queijos: Queijo Controle, com nisina úmida e com nisina seca, com a mesma concentração de nisina (8,5mg/Kg de queijo). Após obtenção dos queijos, os mesmos foram armazenados por 30 dias a temperatura de 6°C, sendo monitorado, microbiologicamente (coliformes termotolerantes e *Salmonella*) a cada 15 dias. Os resultados obtidos demonstraram que o leite *in natura* foi de boa qualidade, obtendo-se uma acidez de 16,7°D e pH 6,64, valores que estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação. Nos queijos controle, com nisina seca e nisina úmida, se obteve um % de gordura de 30,34; 33,48 e 33,64 caracterizando-os como queijos semi-gordos. Assim como também se obteve um bom percentual de proteínas nos diferentes queijos estudados. Nas análises microbiológicas obteve-se valores inferiores a $1,0 \times 10^1$ UFC/g para coliformes termotolerantes, e *Salmonella* não foi detectada no mesmo período de monitoração. Portanto, dentro dos 30 dias, os queijos estavam aptos para serem consumidos. Os resultados da análise sensorial indicaram que não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre o controle e os queijos com nisina úmida e nisina seca, indicando que sua adição e a forma como é adicionada ao processo de produção não causa interferências.

Palavras-chaves: Leite, Queijo minas frescal, nisina, coagulação ácida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados da Caracterização da qualidade do leite.....	23
Tabela 2. Avaliação físico - química dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.....	24
Tabela 3. Resultados da Unidade Formadora de Colônia de Coliformes Termotolerantes nas amostras de Queijo minas frescal obtido por coagulação ácida.....	25
Tabela 4. Contagem de <i>Salmonella</i> spp em queijo minas frescal obtido por coagulação ácida.....	26
Tabela 5. Resultados da análise sensorial realizado no segundo dia após a fabricação, pelo teste de aceitação segundo a escala hedônica de cinco pontos, dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.....	27
Tabela 6. Força de cisalhamento dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma de obtenção do queijo através de coagulação ácida.....	21
Figura 2. Percentagem de intenção de compra (IC) dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.....	28

1. INTRODUÇÃO

O queijo é um produto obtido por coagulação enzimática ou ácida do leite, podendo ser fresco ou maturado, sólido ou cremoso. É a maneira mais simples, prática e saudável de consumir as propriedades nutritivas do leite (ABIQ, 2013).

Existem centenas de tipos de queijo em todo o mundo, no Brasil são cerca de 70 tipos de queijos o que o coloca entre os principais produtores. Entre os tipos mais consumidos no Brasil encontra-se o queijo minas frescal, mussarela, prato e requeijão, onde juntos representam mais de 60% da produção do país. O queijo minas frescal é um dos mais consumidos no Brasil.

O queijo é um dos alimentos mais propícios a contaminações microbianas, em razão dos processos envolvidos na sua fabricação, como a pasteurização do leite, coagulação, corte do coágulo, dessoragem, entre outros. A contaminação cruzada durante ou após o processamento (armazenamento e transporte) pode também contaminar esses alimentos (BALBANI e BUTUGAN, 2001).

A coagulação ácida ocorre através da adição de ácidos orgânicos diretamente ao leite ou pela produção de ácido lático pelas bactérias do fermento (CAVALCANTE, 2004).

O uso de aditivos nos alimentos é permitido pela legislação brasileira, desde que utilizados nas concentrações recomendadas, de tal forma que não prejudique a saúde do consumidor. Porém nos últimos anos, houve a necessidade de melhoria nas tecnologias de processamento, uma vez que a preferência do consumidor é por alimentos com mínima adição de conservantes, por serem mais saudáveis, fáceis de transportar e preparar (SANTOS e OLIVEIRA, 2012).

Existem muitos aditivos que são utilizados para realçar o sabor, melhorar a qualidade do produto ou como conservante. Dentro destes conservantes, encontra-se a Nisina, cujo uso é permitido em queijos, requeijão, queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em pó, na concentração de $12,5\text{mg.Kg}^{-1}$ do produto final (BRASIL, 1997).

As bacteriocinas, em geral, são uma das opções para controlar bactérias patogênicas e deteriorantes em alimentos. Porém, é importante lembrar que as substâncias antimicrobianas dificilmente poderão substituir as boas práticas de fabricação, fundamentais para a produção de alimentos seguros.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho de pesquisa teve o objetivo de avaliar a atividade da nisina em queijos tipo frescal obtidos por coagulação ácida.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a qualidade do leite *in natura*.
- Avaliar a qualidade dos queijos elaborados.
- Avaliar a atividade antimicrobiana da nisina nos queijos através das análises físico-químicas e microbiológicas.
- Avaliação dos atributos sensoriais dos queijos processados.

3 REVISÃO

3.1 Leite

De acordo com o RIISPOA (1997) "entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda".

O leite fresco normal tem um sabor ligeiramente adocicado, devido principalmente ao seu alto conteúdo de lactose. Entretanto, todos os elementos do leite, inclusive as proteínas que são insípidas, participam de forma direta ou indireta na sensação de sabor, tornando-o um produto com atributo sensorial muito atrativo (BRITO e BRITO, 1998).

A cor do leite (branco-amarela, opaca) se deve principalmente à dispersão da luz pelas micelas da caseína. Os glóbulos de gordura dispersam a luz, porém pouco contribui para a cor branca do leite. O caroteno e a riboflavina (substâncias lipossolúveis) contribuem para a cor amarela (VENTURINI et al., 2007).

Alterações no sabor do leite podem ocorrer desde a sua produção, até a sua embalagem e transporte. Podem estar relacionados à alimentação animal, à presença de micro-organismos, à quebra de gordura (sabores lipolítico e de sabão), à relação tempo e temperatura do tratamento térmico, à oxidação de ácidos graxos entre outros (BRASIL, 2010).

O leite pode ser classificado em tipo A, B e C, de acordo com o modo de produção e a contagem de micro-organismos presentes em sua composição. O leite tipo A, é pasteurizado e embalado no mesmo local onde é ordenhado, contendo assim, concentrações mais baixas de micro-organismos. O leite tipo B, é encaminhado para uma indústria específica, em uma localização diferente de onde foi ordenhado, sendo então, pasteurizado e embalado na indústria, desta forma, contém uma concentração maior de micro-organismos. O leite tipo C, também é pasteurizado e embalado em uma indústria de região diferente de onde foi ordenhado, porém os cuidados com higiene são menores, desta forma, contém uma concentração mais elevada de micro-organismos do que os outros dois tipos, A e B (VENTURINI et al., 2007).

Atualmente, de acordo com a normativa 62 (MAPA, 2011), de 29 de Dezembro de 2011, os leites são classificados apenas em tipo A. "Entende-se por Leite Pasteurizado tipo A o leite classificado quanto ao teor de gordura em integral, semidesnatado ou desnatado,

produzido, beneficiado e envasado em estabelecimento denominado "Granja Leiteira". Imediatamente após a pasteurização, o produto assim processado deve apresentar teste qualitativo negativo para fosfatase alcalina, teste positivo para peroxidase e enumeração de coliformes a 30/35°C (trinta/trinta e cinco graus Celsius) menor do que 0,3 NMP/mL (zero vírgula três Número Mais Provável /mililitro) da amostra.”.

Em condições normais, o leite apresenta pH em torno de 6,5 - 6,6; densidade de 1,030 a 1,034g/cm³ a 15°C; 0,93 cal/g°C de calor específico; ponto de congelamento em torno de - 0,55°C e índice de refração em torno de 1,35 (AQUARONE et al.,1983).

O uso da matéria prima (leite) de baixa qualidade pela indústria trás serias implicações tecnológicas, causando perdas econômicas e riscos à saúde do consumidor. Dentre os problemas, pode-se mencionar o baixo rendimento na fabricação de derivados, a diminuição da vida útil dos produtos no mercado, as alterações nas características originais do leite e dos derivados (SILVA et al., 1999).

3.2 Microbiota do Leite

A viabilidade do leite para consumo é limitada pela presença e multiplicação de micro-organismos, que causam modificações físico-químicas no mesmo (VENTURINI et al., 2007).

Os micro-organismos que podem estar presentes no leite cru são provenientes da própria pele do animal, do úbere e dos equipamentos utilizados para a ordenha. Sua contaminação por micro-organismos ocorre principalmente após o período de ordenha. Para evitar a contaminação microbiana, uma rigorosa higiene nos equipamentos e nos processos de ordenha é necessária, e após a ordenha o leite deve ser rapidamente refrigerado (JAY, 2005).

Em temperatura ambiente, diversos micro-organismos podem se desenvolver no leite como bactérias lácticas e o grupo de coliformes, pelo fato deste ser um ótimo meio de nutrientes, conseqüentemente, o leite é rapidamente deteriorado (MIRANDA,2007). Porém, mesmo sob-refrigeração, poderá haver o crescimento de muitos micro-organismos no leite cru, como as do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e também coliformes (JAY,2005).

3.3 Importância dos componentes do leite

O leite é composto de água, e nela se encontram dispersos os componentes sólidos, denominados sólidos totais (ST), constituídos por proteínas, gorduras, lipídios, lactose e sais.

Esta composição é variável, dependendo de diversos fatores como: raça, período de lactação, alimentação, saúde, período de cio, idade, características individuais, clima, espaço entre as ordenhas e estação do ano (VENTURINI et al., 2007).

As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: a) caseínas; b) proteínas do soro; c) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; d) enzimas e fatores de crescimento (SGARBIERI, 1996; LOURENÇO, 2000).

As propriedades do leite constituem ingredientes dos mais valorizados pelas suas excelentes propriedades nutritivas, tecnológicas e funcionais. Suas propriedades nutritivas e tecnológicas derivam da composição em aminoácidos que atendem a maioria das exigências fisiológicas do ser humano (CHEFTEL et al., 1989) e de suas propriedades físico-químicas, que proporcionam propriedades funcionais de grande interesse tecnológico, como: solubilidade, absorção e retenção de água e de gordura, capacidade emulsificante e estabilidade das emulsões, capacidade espumante e estabilidade de espuma, geleificação, formação de filmes comestíveis e biodegradáveis, formação de micropartículas, melhoria nas propriedades sensoriais e na aceitação dos produtos (WONG et al., 1996).

A parte lipídica do leite possui constituição muito complexa. Sua ação é extremamente importante durante o desenvolvimento de mamíferos, servindo como fonte de energia, e vitaminas A e D (VALSECHI, 2001). O leite possui basicamente todas as principais vitaminas, como a A, D, E e K. Porém a vitamina K é limitantemente encontrada na parte lipídica do leite (AUGUSTINHO, 2007). O glóbulo de gordura é envolto por uma membrana protéica, onde se retiram duas frações: uma insolúvel em solução aquosa e outra solúvel. A matéria gorda é constituída por cerca de 99,5% de compostos lipídicos e 0,5% de compostos lipossolúveis. Industrialmente, a gordura do leite é muito aplicada, dando aos produtores maior qualidade organoléptica (VALSECHI, 2001).

Os açúcares do leite são constituídos principalmente pela lactose, com uma composição média de 4,5 a 5,0 g/L o que caracteriza o sabor adocicado. A Lactose possui a fórmula molecular parecida com a da sacarose, diferindo apenas na configuração molecular. A modificação deste açúcar pelos fermentos lácticos é utilizada na fabricação de produtos lácticos fermentados: nata, manteiga, leite acidificado, queijos frescos e curados (VALSECHI, 2001).

3.4 Queijo

Queijo pode ser definido como um concentrado lácteo, composto de lipídeos, proteínas, sais minerais, fósforo, vitaminas, carboidratos, cálcio, e vitaminas, sendo considerado um dos alimentos mais nutritivos existentes. A coagulação do queijo é influenciada pelos minerais, a qual influencia na textura do queijo. O líquido residual é variável, dependendo do tipo de queijo, e é chamado de lactosoro; onde boa parte é eliminada no processo de fabricação e sendo aproveitado como matéria-prima na produção de ricota, iogurtes e outros produtos (PERRY, 2004).

Os queijos podem ser classificados de acordo com o modo de produção, da região de onde é produzido, do tipo de matéria prima utilizada, textura, teor de umidade, e sua maturação (JAY, 2005). São classificados de acordo com sua consistência em *brandos*: requeijão cremoso, queijo creme, Quark (se espalham facilmente); *semi-brandos*: não se espalham facilmente, mas podem ser cortados (Minas Frescal); *semi duros*: podem ser fatiados (Edam, Gouda, Prato); *Duros*: possuem baixa umidade, e são resistentes a cortes (Cheddar, Suíço); *Extraduros*: não permite corte, são utilizados com auxílio de um ralador (Parmesão, Romano).

Quanto ao teor de gordura os queijos são classificados em *Gordo* (40% GES-Gordura no Extrato Seco); *Semi-gordo* (>25%GES); *Magro* (>15%GES) e *Desnatado* (<15%GES) (JUNIOR et al., 2006).

Referente ao Grau de maturação são classificados em: *Frescos*: sem maturação (Campesino, Minas Frescal); *Maturados* (Grande parte dos queijos); *Maturação por Bactérias*: utilização de fermentos lácticos (Gouda, Prato), *Maturação por Mofos e Bactérias* (Roquefort, Camembert), *Casca lavada*: maturação externa por *Brevibacterium* (Saint-Paul). De acordo com a textura são classificados em *Aberta*: com olhaduras (Prato, Emmenthal) e *Fechada*: sem olhaduras (Cheddar) (JUNIOR et al., 2006).

3.5 Queijo Minas Frescal

O queijo minas frescal é definido como o produto elaborado a partir do leite cru, integral e recém-ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente quimosina de benzeno puro e, no ato da prensagem o processo deve ser somente manual. O produto final deve apresentar consistência firme, cor e sabor próprio, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas (CARVALHO et al., 2007).

O queijo minas frescal é um queijo de formato cilíndrico, de sabor levemente ácido e salgado, é semi-gordo (25–44,9% de gordura), com alto teor de umidade (55 - 58%) e que

deve ser consumido fresco. Nessas condições este se torna muito perecível, com durabilidade variando entre 8 a 10 dias sob refrigeração de no máximo 8°C (BRASIL, 1996; PEREIRA; LIMA; SANTANA, 2006).

O queijo minas frescal é um dos produtos artesanais mais consumidos no Brasil, e para que o mesmo seja de qualidade, a matéria-prima deve ser oriunda de animais saudáveis e passar por métodos rígidos de higiene em sua fabricação. Quando não existe a higiene necessária tanto na ordenha, na produção e no armazenamento, o produto será de péssima qualidade, podendo comprometer a saúde dos consumidores devido aos riscos de intoxicações e infecções. A presença de micro-organismos poderá causar alterações no produto final, como alterações físico-químicas e sensoriais (BERGMAN et al., 2007).

3.6 Coagulação do leite

A coagulação do leite ocorre devido à desestabilização da solução da caseína dando origem a micelas livres o que leva a formação de um gel, concentrando assim as proteínas do leite e retendo gordura. Na coagulação podem ser utilizados dois métodos: coagulação ácida ou coagulação enzimática (adição de coalho). Por possuírem propriedades distintas, o tipo de queijo desejado, definirá o tipo de coagulação usada (JUNIOR et al., 2006).

A coagulação ácida ocorre através da adição de ácidos orgânicos diretamente ao leite ou pela produção de ácido láctico pelas bactérias do fermento (CAVALCANTE, 2004). A coagulação da caseína ocorre após a perda de sua carga elétrica ao alcançar seu ponto isoelétrico, estando o pH a um valor de aproximadamente 4,6, onde sua carga elétrica está totalmente anulada, e assim a coagulação se dá por completa. A acidez eleva a solubilidade dos sais minerais, sendo que o fosfato e o cálcio nas micelas passam a fase aquosa. Desta forma, a coalhada expulsa facilmente o lactosoro, por estar desmineralizada (BONATO et al., 2006).

As bactérias lácticas possuem grande importância na produção de queijos. Seu papel principal é a produção de ácido láctico, que por sua vez tem a função de diminuir o pH do leite, melhorando a atividade do coagulante e auxiliando a expulsão do soro (FOX et al., 2000 apud DAGOSTIN, 2011).

3.7 Fatores de influência no desenvolvimento de Micro-organismos

A quantidade e a variedade de nutrientes de um alimento são fatores determinantes para o desenvolvimento de micro-organismos, pois cada micro-organismo tem suas necessidades específicas (HOFFMANN, 2001).

O pH é um fator intrínseco para o desenvolvimento de micro-organismos. Normalmente, bactérias são mais exigentes com relação ao pH do que mofos e leveduras. Grande parte dos micro-organismos crescem com pH em torno de 6,6 – 7,5 (JAY, 2005).

A atividade da água é outro fator intrínseco para o desenvolvimento de micro-organismos; pois não há desenvolvimentos deles em meio totalmente seco. Para que isso ocorra, é necessária a presença de água livre. Quanto maior o teor de água livre, maior será o desenvolvimento de bactérias, pois em meio úmido, elas se desenvolvem rapidamente. As bactérias Gram - negativas, esporos bacterianos e algumas leveduras se desenvolvem em atividade da água em torno de 0,95 – 1,00 (MASSAGUER, 2005).

A qualidade do queijo minas frescal está diretamente relacionado à qualidade de sua matéria-prima, e por isso a ANVISA através do Regulamento da Diretoria Colegiada (RDC 12 de 02/01/2001), estabelece padrões Microbiológicos para alimentos, considerando para o queijo minas frescal, através da Unidade Formadora de Colônia (UFC) uma tolerância de 5×10^2 da amostra para Coliformes a 45°C e *Estafilococos* coagulase positiva e ausência de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*.

3.8 Bacteriocinas

Para prolongar a vida de prateleira dos alimentos, utilizam-se aditivos que mantêm a segurança do consumidor, porém nas últimas décadas, o crescimento na procura por alimentos minimamente processados é elevado. O crescente interesse dos consumidores por estes alimentos tem incentivado para que pesquisas estejam em andamento de tal forma que se melhore as tecnologias de processamento, uma vez que a preferência do consumidor é por alimentos com a mínima adição de aditivos.

As bacteriocinas são proteínas biologicamente ativas, ou complexos protéicos que tem ação bactericida exclusiva em bactérias Gram positivas (MORENO et al., 2000).

No Brasil o uso de nisina é permitido em queijos, requeijão, queijos fundidos, queijos pasteurizados e queijos em pó, na proporção de 12,5mg/Kg de produto final (BRASIL, 1997).

A nisina é uma bacteriocina descoberta em 1928, produzida por várias estirpes de *Lactococcus lactis*. Cleveland et al. (2001) avaliaram a produção de nisina por 40 estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e observaram que 35 estirpes produziram a bacteriocina. A nisina é naturalmente produzida em alimentos fermentados, especialmente produtos lácteos e vem sendo consumida pelos humanos ao longo do tempo (BOWER et al., 2002)

Esta bacteriocina tem seu uso aprovado em alimentos em mais de 50 países e possui classificação GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration).

Os organismos produtores de nisina se encontram naturalmente no leite. A nisina é um polipeptídeo antibacteriano produzido por *Lactococcus lactis*. Possui regiões hidrofílicas e hidrofóbicas na mesma molécula, de forma que sua atividade resulta da permeabilização de membranas celulares bacterianas, ocasionando refluxo de compostos citoplasmáticos. (REVISTA FI, 2012)

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria Prima

O leite *in natura* foi coletado na Fazenda Agropecuária Conti, localizada na cidade de Amambai –MS. O leite foi obtido por meio de ordenha mecânica respeitando-se as boas práticas de fabricação. Após a ordenha, o leite foi imediatamente resfriado em tanque de expansão provido de sistema de agitação e controle de temperatura. Posteriormente o leite foi transportado em um vasilhame adequado até o Laboratório da Faculdade de Engenharia/UFGD, onde foram realizadas as análises e a obtenção dos queijos.

A nisina utilizada foi obtida na indústria Coalhopar, localizada no estado do Paraná, onde ela disponibilizou a nisina já isolada e purificada.

4.2 Análises Físico-Químicas

As análises físico-químicas se realizaram na matéria-prima *in natura* (leite) e nos queijos, todas as análises foram realizadas em triplicatas.

4.2.1 Determinação do pH

O pH foi obtido através de potenciômetro, calibrado previamente com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, utilizando pHmetro analógico, LAB METER pH-3B, com eletrodo

combinado de vidro, cujos resultados foram realizados com leitura direta. Esta análise foi realizada no leite *in natura* e nos queijos.

4.2.2 Determinação da Acidez Total Titulável, ATT.

O teste de Acidez Dornic, quantifica o ácido láctico presente no leite. A técnica foi realizada de acordo com as Normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

4.2.3 Determinação de Lipídeos

A determinação de lipídeos no leite foi realizada através da metodologia do Instituto Adolfo Lutz, (2008).

Para o queijo a determinação de lipídeos se realizou segundo a metodologia recomendada de AOAC (1997), sendo utilizado o extrator sohxtel com refluxo contínuo por oito horas com hexano.

4.2.4 Determinação do conteúdo de umidade

A determinação do teor de umidade nos queijos foi feita pelo método gravimétrico em estufa com circulação de ar (Marca QUIMIS) à temperatura de 80°C por 24 horas e expressa em g água/g queijo.

4.2.5 Determinação da atividade de água, A_w

A atividade de água dos queijos se realizou através do uso do higrômetro Marca AQUALAB, o qual foi calibrado. Amostras dos queijos foram trituradas e misturadas para poder obter uma amostra homogênea.

4.2.6 Determinação de proteína

A proteína foi determinada pelo método micro Kjeldahl (AOAC; 2000), usando um destilador de nitrogênio (Marca MARCONI, MODELO MA, 036), com modificações, utilizando como catalisadores o Na_2SO_4 , CuSO_4 e Se, titulado com H_2SO_4 0,1 N. Como fator de cálculo, foi usado o valor de 6,25 (Adolfo Lutz; 2008).

4.3 Obtenção dos queijos através da coagulação ácida

As análises da qualidade da matéria prima foi um fator decisivo, para continuar como processo de obtenção dos queijos. A pasteurização lenta foi realizada a 72-75°C x 20seg. Em

seguida se elevou a temperatura a 95-98 °C (temperatura de ebulição) e adicionou-se o ácido acético (vinagre comercial) para obter a coagulação e posteriormente a massa do queijo.

A adição da nisina úmida foi após a pasteurização, ou seja, diretamente no leite em uma concentração de 8,5mg/Kg. A adição da nisina seca foi em uma concentração de 8,5mg/Kg após o processo de obtenção da massa coagulada sendo adicionada diretamente à massa e em seguida misturada para uniformizar e seguir com o processo de obtenção do queijo. A salga foi feita de forma seca (adição direta ao queijo), num percentual de 1-2%. O fluxograma para a fabricação do queijo minas frescal consta a seguir, na Figura 1.

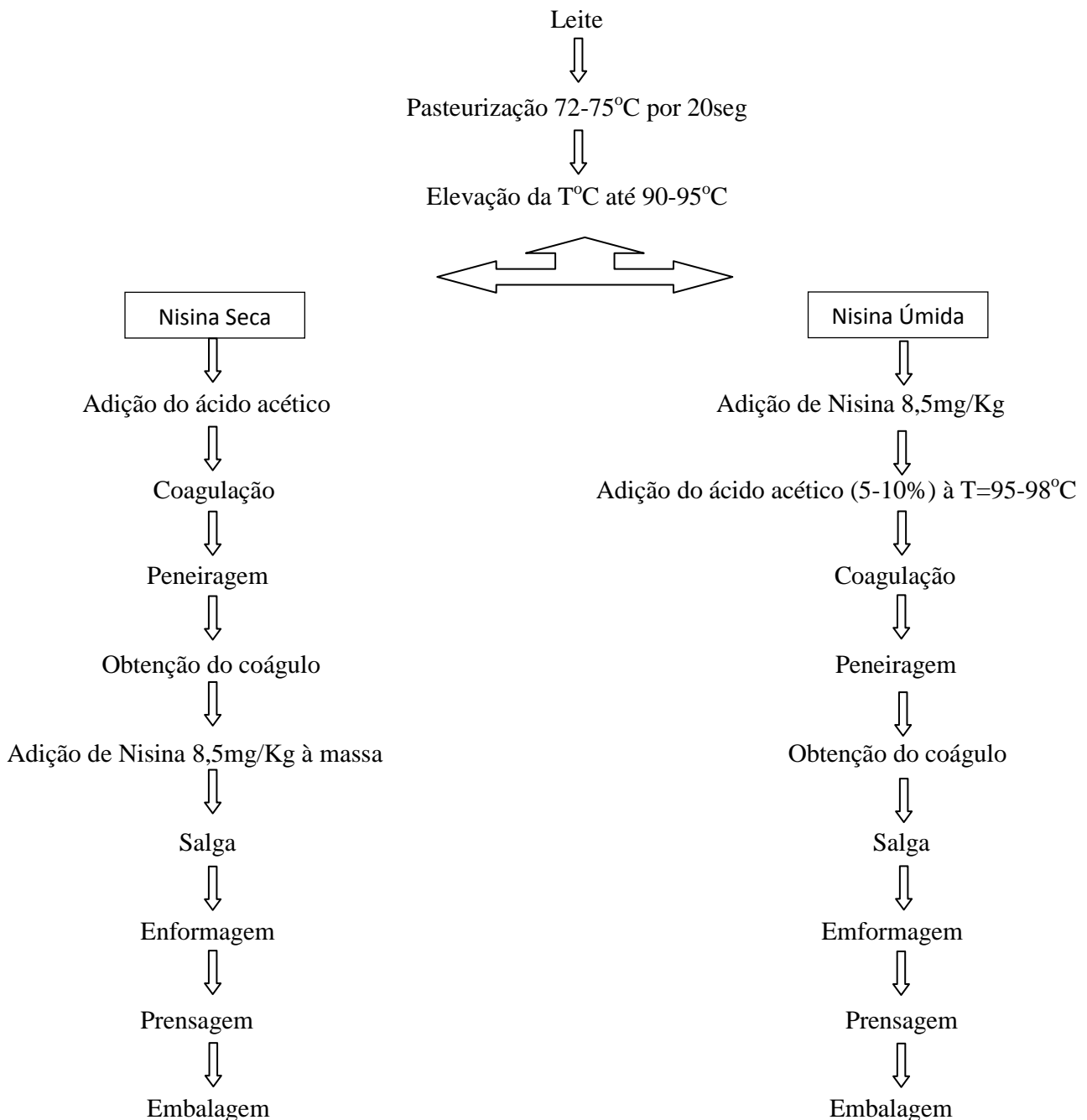


Figura1-Fluxograma de obtenção do queijo através de coagulação ácida.

4.4 ANÁLISES DURANTE A ARMAZENAGEM

4.4.1 Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram efetuadas no laboratório do SENAI, e seguindo a metodologia da Instrução Normativa 62, de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura utilizado para a contagem de coliformes termotolerantes a (45°C) e contagem de *Salmonella*.

4.4.2 Análise Sensorial

A avaliação da aceitabilidade sensorial do queijo realizou-se no Laboratório de Análise Sensorial (LANASE) do Curso de Engenharia de Alimentos da FAEN/UFMG. As amostras foram avaliadas por sessenta julgadores, não treinados.

Os queijos elaborados a partir do leite previamente pasteurizado foram submetidos à avaliação sensorial, sendo que estas análises se realizaram após verificação dos resultados das análises microbiológicas, para garantir a segurança dos provadores.

As amostras foram servidas de forma monádica, em pratos descartáveis, previamente codificados com números aleatórios de três dígitos e apresentadas, sob luz ambiente. Os julgadores avaliaram os atributos sabor, maciez, odor e forma global. Aplicou-se o teste de aceitação com escala vertical de categoria mista, utilizando-se de escala hedônica estruturada de 5 pontos, em que 5 = gostei muito, 4 = gostei pouco, 3 = nem gostei nem desgostei, 2 = desgostei pouco e 1 = desgostei muito, adaptada da metodologia de Meilgaard et al.(1999). Na mesma ficha foi solicitado aos julgadores, responderem quanto à intenção de compra do queijo, utilizando escala de 5 pontos, em que 5 = certamente compraria, 4 = provavelmente compraria, 3 = talvez comprasse/ talvez não comprasse, 2 = provavelmente não compraria e 1 = certamente não compraria.

A análise estatística se realizou por análise de médias e teste de *Tukey* a 5% de probabilidade, com transformação de dados $\sqrt{x+1}$, utilizando o programa SAS. A intenção de compra foi analisada em porcentagem.

4.4.3 Análise de Textura

A textura foi avaliada pela análise do perfil de textura utilizando-se um texturômetro (Stable Micro Sistens, modelo TA. XT) calibrado com uma célula de 5Kg, controlado por microcomputador, acoplado com acessório tipo Warner-Bratzler, com velocidade de 2mm/s, forma de 20 gramas e distância de ruptura de 30mm, em amostras.

As análises foram realizadas nos queijos minas frescal elaborado com vinagre, vinagre mais nisina úmida e vinagre mais nisina seca. Dois dias após a data de fabricação. Antes da

realização da análise de textura, os queijos foram cobertos com filme de PVC transparente e mantidos em geladeira até a realização do teste. Cada peça de queijo foi cortada em cubo de 2 x 2 cm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterizações da qualidade do leite.

Na Tabela1 podemos observar os resultados da caracterização físico-química da qualidade do leite *in natura* utilizado no presente trabalho.

Tabela1 - Resultados da caracterização físico- química da qualidade do leite

Parâmetros	Concentrações	Legislação
pH	6,64±0,03	6,4 à 6,8
Acidez	16,7±0,2	14-18°D
% Gordura	4,0±0,1	2,2% a 4,0%

Os resultados mostraram que o leite estava dentro dos parâmetros que o consideram como apto ao consumo e dentro dos parâmetros exigidos pela legislação.

Pela Tabela 1, a acidez estava de acordo com os parâmetros de qualidade do leite recomendado e estabelecido pela legislação que é de 14-18°D, sendo que valores muito elevados, podem conter alta carga microbiana comprometendo a qualidade do produto final (BRASIL,2002).

O pH do leite estava dentro dos parâmetros recomendados. Considera-se que o leite de vaca pode variar entre 6,4 a 6,8, e também pode ser um indicador da qualidade sanitária e da estabilidade térmica do leite. Nos casos graves de mastite, o pH pode chegar a 7,5 e na presença de colostro, pode cair a 6,0 (PAULA et al., 2010).

O teor de gordura (Tabela 1) estava dentro dos valores encontrados na literatura para caracterizar um leite de qualidade. A gordura é o componente de maior variabilidade do leite. De um modo geral, a gordura pode variar de 2,2% a 4,0%. Esta porcentagem é fortemente influenciada pela genética e fatores ambientais. Dentro dos fatores ambientais, o manejo nutricional pode exercer uma influencia muito importante. De fato, considera-se a gordura, proteína e a lactose como os três principais componentes do leite. Provavelmente, devido a

esta variabilidade, a gordura, foi o primeiro componente do leite, incluído no sistema de pagamento do leite (BURCHARD e BLOCK, 1998), uma vez que influencia diretamente os sólidos totais.

5.2 Caracterizações físico-químicas do Queijo.

A Tabela 2 apresenta os dados da composição físico-química do queijo controle e queijos adicionados com nisina úmida e seca.

Tabela 2 - Avaliação físico-química dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.

Amostras	pH	Aw	% Umidade	% Proteína	% Gordura
Controle	4,61±0,406	0,976±0,019	52,95±7,64	9,16±0,547	30,34±13,65
Queijo NU	5,00±0,051	0,964±0,003	50,34±1,64	9,10±0,885	33,64±5,85
Queijo NS	4,83±0,098	0,977±0,001	53,20±0,53	9,45±0,877	33,48±0,311

Queijo NU = Queijo obtido com nisina úmida

Queijo NS = Queijos obtido com nisina seca

Na Tabela 2 pode-se observar que o pH nas amostras adicionadas com nisina foram ligeiramente superiores ao controle, porém estiveram dentro dos teores encontrados por diversos autores, entre eles Machado et al (2004) que obteve um pH = 4,98, Martins e Silva(2006), pH de 5,00; Dores (2007) pH de 5,03 e Silva (2007) com valores de 5,24; todos eles em amostras de queijo minas artesanal. Uma característica que possivelmente teve influência no pH foi a prensagem, pois segundo Furtado(1990) a prensagem influencia no pH final do queijo, já que neste ponto de fabricação a massa ainda contém considerável quantidade de lactose e que será eliminado se for adequadamente prensado. Caso contrário, a lactose será fermentada, produzindo ácido lático e gerando, conseqüentemente, acidez no queijo (GALTON, *et al.*, 1986)

Verifica-se na Tabela 2 que os valores de atividade de água são altos tanto para o controle como para as amostras com nisina úmida e seca. Segundo Garcia (2004) a análise de atividade de água fornece valores que permitem um controle mais rigoroso dos micro-organismos na matéria-prima e produtos industrializados de origem animal, especialmente os que assumem importância em termos de saúde pública como *Staphylococcus aureus*, *Solmonella* spp. e fungos toxigênicos.

As proteínas presentes no queijo elaborado apresentaram valores de 9,16-9,45%. Estes valores estão muito semelhantes ao encontrado por (FOX, 1993) obtendo 9% de proteína, em queijo minas. Porém estes valores estão abaixo dos mencionados por Machado et al.,(2004), onde o queijo minas frescal apresentava de 12 a 18% de proteína. O percentual de gordura encontrados na presente pesquisa variou de 30,34 a 33,64% para os queijos obtidos. Estes dados são elevados, porém estão de acordo com o regulamento técnico de identidade de qualidade dos queijos (BRASIL, 1996) onde, queijo minas é considerado semi-gordo varia de 25 à 44,9% de gordura.

5.3 Análises microbiológicas

Na Tabela 3, encontram-se os resultados obtidos nas análises microbiológicas.

Tabela 3 – Análises da Unidade Formadora de Colônia de Coliformes Termotolerantes nas amostras de queijo minas frescal obtido por coagulação ácida.

Dias de estocagem	Controle	Nisina Úmida	Nisina Seca
0	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g
15	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g
30	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g	< 1,0x10 ¹ UFC/g

*Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Durante os 30 dias de armazenamento dos queijos frescal a uma temperatura de refrigeração de 6°C observou-se que não houve alteração microbiana. Um fator decisivo foi a retirada do soro dos queijos antes de serem embalados, para não acelerar o processo de deterioração, e melhorar a vida de prateleira, pois o soro acelera o processo de deterioração dos queijos devido ao seu elevado teor de nutrientes e a alta umidade.

Nos dados apresentados na Tabela 3, observou-se que as amostras em estudo apresentaram baixíssimos valores de coliformes termotolerantes. A *E. coli* é considerada uma das bactérias causadoras de estufamento precoce em queijos. Nesta pesquisa não foi visualizado estufamento precoce em nenhum dos tratamentos, devido ao baixo valor de colônias. Segundo Spreer (1991) e Furtado (2005) o principal sinal do estufamento precoce nos queijos é um grande número de olhaduras, irregulares e pequenas, distribuídas em toda a massa.

Na Tabela 4, encontram-se os resultados obtidos durante as análises microbiológicas para presença ou ausência de *Salmonella*.

Tabela 4 - Contagem de *Salmonella* spp em queijo minas frescal obtido por coagulação ácida.

Dias de estocagem	Controle	Nisina Úmida	Nisina Seca
0	Ausência	Ausência	Ausência
15	Ausência	Ausência	Ausência
30	Ausência	Ausência	Ausência

Resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Na Tabela 4, são apresentados os resultados da contagem de *Salmonella* spp observando-se ausência em todas as amostras. Para Melo et al.,(2009), a ausência de *Salmonella* spp. esta relacionada à presença de bactérias lácticas, o que faz com que o queijo se torne um meio adverso a sobrevivência de micro-organismos patogênicos ou até mesmo devido as condições estressantes do processamento e estocagem no qual o alimento foi submetido. Isso indica que os queijos foram produzidos de acordo com os princípios das Boas Práticas de Fabricação.

Os resultados estão de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2001) que preconiza a ausência de *Salmonella* em 25g do alimento pesquisado e uma tolerância através do Número Mais Provável por grama (NMP/g) de 5×10^2 da amostra para Coliformes a 45°C que corresponde a 2,70 Log UFC/g. Os resultados indicaram que a adição de nisina nos queijos, não influenciou na presença de coliformes nos queijos minas frescal, pois para o tempo 0, 15 e 30 não houve aumento linear no número de colônias.

Coliformes termotolerantes e a *Salmonella* são micro-organismos Gram-negativos (SILVA et al., 1997) e a nisina inibi principalmente micro-organismos Gram-positivos (MORENO et al., 2000), justificando assim a não interferência nos níveis de micro-organismos entre as amostras avaliadas.

Porém, segundo Grisi et al., (2005),a *Salmonella* é inibida com a adição de nisina e pH elevado. Thomas e Wimpenny (1996) verificaram que a eficácia da nisina aumentou com a diminuição do pH. Como a coagulação do leite foi através da coagulação ácida, este estudo pode ser uma resposta para a não variação de contagem de micro-organismos entre os tratamentos, tal como pode ser observado nas Tabelas 3 e 4.

5.4 Avaliação dos atributos Sensoriais

Os resultados da análise sensorial de aceitação dos queijos encontram-se na Tabela 5. Cujas análises foram realizados no segundo dia após a fabricação, pelo teste de aceitação segundo a escala hedônica de cinco pontos.

Tabela 5 – Avaliação dos atributos sensoriais, dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.

Tratamentos	Odor	Maciez	Sabor	Forma Global
Controle	3,6 _a	4,2 _a	4,2 _a	4,2 _a
Nisina úmida	3,9 _a	4,0 _a	4,2 _a	4,2 _a
Nisina Seca	3,9 _a	4,3 _a	4,0 _a	3,8 _a
Desvio Padrão	0,25	0,25	0,26	0,23

*Médias com letras iguais na mesma coluna indica que não existe diferença significativa $p>0,05$ pelo teste de Tukey.

Os tratamentos avaliados apresentaram comportamentos similares para os atributos: “odor”, “maciez”, “sabor” e “forma global”, que variou de “nem gostei nem desgostei” a “gostei pouco” e não houve diferença significativa, $p>0,05$. Podemos dizer que o uso da nisina úmida ou seca não altera os atributos sensoriais do queijo minas frescal obtidos por coagulação ácida.

Na figura abaixo, encontram-se os valores da intenção de compra dos consumidores com relação aos queijos elaborados.

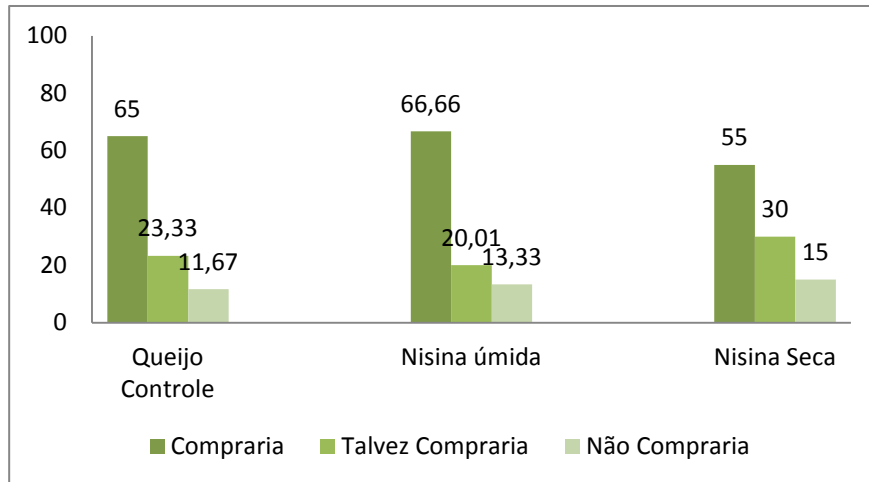


Figura 2. Percentual de intenção de compra (IC) dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.

CAPELLAS et al., (2000), testou a adição de nisina em queijo produzido com leite de cabra, e constatou a não interferência da nisina entre os tratamentos, nos fatores físico químicos e sensorial avaliados no período de 24 horas após a preparação, o mesmo foi verificado nesta pesquisa.

Pode-se observar na Figura 5 que o queijo tratado com nisina seca, obteve um índice de compra de 55%, nisina úmida 66,6% e o controle 65%. Pela Tabela dos valores críticos de Qui Quadrado (Bicaudal), ao nível de significância de 20% é necessário 68,97% da intenção de compra, e para 10% é de 74,40%. Como os valores obtidos pelos tratamentos foram menores que os valores mínimos tabelados para 20 e 10%, podemos dizer que estes não seriam comprados pelos consumidores. A baixa intenção de compra provavelmente não foi influenciada pela adição de nisina seca ou úmida, mas pelo processo de elaboração, pois o controle também apresentou valor inferior ao mínimo tabelado. E também porque os queijos não apresentaram diferença significativa ao nível de significância de 5%, nos atributos sensoriais avaliados pelo teste de aceitação.

5.5 Resultados da força de cisalhamento.

A Tabela 6 apresenta as médias obtidas para a força de cisalhamento dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.

Tabela 6 – Força de cisalhamento dos queijos minas frescal obtidos por coagulação ácida.

Tratamentos	Força de Cisalhamento
Controle	4,30 _b
Nisina Úmida	5,15 _a
Nisina Seca	4,51 _{ab}

*Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna existe diferença significativa a $p \leq 0,05$ pelo teste de Tukey.

Pela Tabela 6 podemos observar que o queijo adicionado com nisina úmida obteve a maior força de cisalhamento, que foi de 5,15Kgf, não apresentando diferença significativa a $p \geq 0,05$ do queijo adicionado com nisina seca. O tratamento controle apresentou a menor força de cisalhamento, que foi de 4,30Kgf diferindo dos queijos adicionados de nisina úmida e não diferindo do queijo com nisina seca, ao nível de significância de 5%.

Saad et al., (2008) avaliou a força de cisalhamento de queijo fresco cremoso, e encontrou o valor de 4,90Kgf, valor muito semelhante aos encontrados nos queijos minas frescal da Tabela 6, a semelhança se caracteriza pelo fato do queijo minas frescal ser considerado um queijo fresco.

6. CONCLUSÕES

A matéria-prima utilizada na produção dos queijos foi de ótima qualidade, estando dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Pelas análises de gordura, foram considerados queijos semi-gordos.

Os queijos elaborados e adicionados com nisina na forma seca e úmida, após 30 dias de armazenamento a $T= 6^{\circ}\text{C}$, ainda estavam aptos para o consumo.

Nas análises microbiológicas monitoradas a cada 15 dias não se obteve presença de *Salmonella* e os Coliformes termotolerantes, os resultados se mantiveram estáveis, estes fatores se devem a máxima quantia de soro retirada durante o processo de prensagem, assim como ao efeito da nisina presentes nas concentrações de 8,5mg/kg de queijo

A forma como foi colocada a nisina não influenciou nos atributos sensoriais, tanto o queijo controle como os queijos elaborados com nisina não obtiveram diferença significativa.

7. REFERÊNCIAS

ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. *Disponível em:* <<http://www.abiq.com.br/>>. São Paulo – SP, Brasil. Acessado em: 23 fev. 2013.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidas por fermentação. Editora Edgard Blücher, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983, 243 p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists:** edited Ig W. Horwitz 16^a ed. Washington, 850p. v.2. 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Agricultural Chemists.** 17. ed. Washington, DC, 2000. v.2, 1175.

AUGUSTINHO, E. A. *S.A Importância do Leite.* 2007. 21f. Relatório De Estágio Supervisionado (Graduação) - Curso de Farmácia, Departamento de Centro De Ciências Biológicas e Da Saúde. Pontifícia Universidade Católica Do Paraná, Paraná, 2007.

BALBANI, S. P. A; BUTUGAN, O. Contaminação biológica dos alimentos. **Revista de Pediatria**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 320-328, 2001.

BERGMAN, Z. C.; MELLO, J.F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n.3, p. 862-867, 2007.

BONATO, E. P., HELENO, G. J. B, HOSHINO, N. A. Leites fermentados e queijos. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p 1-31, jan 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. Portaria nº 1 de 28 de janeiro de 1987. **Diário Oficial**, Brasília, Seção 1, v. 125, p. 2197 - 2200, 12 fev. 1987.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Gabinete do Ministro. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 mar. 1996, Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesón. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – R.I.I.S.P.O.A.** Aprovado pelo decreto n 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto 1255 de 25 de junho de 1962. Alterado pelo Decreto 2244 de 04/06/1997. Brasília-DF. 1997.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 20 set. 2002, seção 1, p. 13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos

Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 set. 2003, seção 1, p. 14-51.

BRASIL, F.A. Principais defeitos de sabor do leite e suas causas. Instituto Qualittas. São Paulo – SP, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. de 2011. Seção 1, p. 6.

BRITO, J.R.F.B.; BRITO, M.A.V.P. Qualidade higiênica do leite . Juiz de Fora: Embrapa-Gado de leite, 1998, 17p.

BURCHARD, J.F.; BLOCK, E. Nutrição do gado leiteiro e composição do leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE QUALIDADE DO LEITE, 1., 1998, Curitiba. Anais... Curitiba: Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa/Universidade Federal do Paraná, 1998. p.16-19.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H.R. e SAAD, S. M. I. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2008, vol.44, n.1, pp. 75-84.

CAPELLAS, M; MOR-MUR M; GERVILLA, R; YUSTE J GUAMIS B. Efeito da alta pressão combinado com mildheat ou nisina sobre bactérias inoculadas e mesófilos de queijo de leite de cabra fresco. *Alimentos Microbiol.* 2000, 17: 633-641.

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

CAVALCANTE, F. M. Produção de queijos gouda, gruyère, mussarela e prato. 2004. 100p. Trabalho de conclusão de curso – Departamento de Matemática, Física e Engenharia de Alimentos, Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2004.

CHEFTEL, J. C.; CUQ, J. L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias. Bioquímica. Propriedades funcionales. Valor nutritivo.** Modificaciones químicas. Zaragoza: Editora Acribia, 1989. 346 p.

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

Conservação de alimentos por aditivos químicos. FOOD INGREDIENTS BRASIL. NO 22-201 <http://revista-fi.com>. Acessado em 24 fev. 2013.

DORES, M. T. das. Queijo Minas artesanal da Canastra maturado sob temperatura ambiente e refrigeração. 2007. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FOX, P. F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T. M.; SWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**, 2000. In: DAGOSTIN, J.L.A. Avaliação de atributos microbiológicos e físico-químicos de queijo minas frescal elaborado a partir de leite carbonatado. 2011. 78p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

FOX, P.F. (Ed.) Cheese: Chemistry, physics and microbiology. London: Chapman & Hall. 2. ed. v.1, p.574, 1993.

FURTADO, M. M. Principais problemas dos queijos: causas e prevenção. São Paulo: Ed. Fonte, 2005. 176p.

FURTADO, M.M. **Fatores que afetam as características finais do queijo.** A arte e a Ciência do Queijo. V.5, p. 115-148, São Paulo; Editora Globo, 1990.

GALTON, D. M.; PETERSON, L. G.; MERILL, W. G. Effects of premilking udder preparation practices on bacterial counts in milk and on teats. *Journal of Dairy Science*. v. 69, p. 260-266, 1986.

GARCIA, D. M. **Análise de atividade de água em alimentos armazenados no interior de granjas de integração avícola**. 2004. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GRISI, T.C. S. de L.; GORLACH, L. Krystyna. Action of nisin and high pH on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and in the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Braz. J. Microbiol.* [online]. 2005, vol.36, n.2, pp. 151-156.

HOFFMANN, F. L. Fatores limitantes à proliferação de micro-organismos em alimentos. **BRASIL ALIMENTOS**, p. 23-30, n° 9 - Julho/Agosto, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v. 4, p.533, 2008.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 711p.

JUNIOR, A. F.; HOHENDORFF, C. G. V.; SANTOS D. **Produção de Queijos**. Florianópolis, SC. 2006. 39p. Monografia (Engenharia Bioquímica) UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina.

LOURENÇO, E.J. **Tópicos de proteínas de alimentos**. Jaboticabal: Ed: FUNEP, 2000. 344p.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro**, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2004, vol.24, n.4, pp. 516

MARTINS, C. E. C. B.; SILVA, P. H. F. Queijo de Coalho: Aspectos físico-químicos e microbiológicos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 61, p. 17-21, 2006.

MASSAGUER, P.R. Microbiologia dos processos alimentares. São Paulo: Ed. Varela. 2005. 258p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 1999. 390p.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na cidade de São Luís, Maranhão. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 4, p. 547-551, 2009.

MINAS GERAIS. Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. Disponível em: <http://www.imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/14185.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2012.

MIRANDA, Z. B.; **Microbiota: Pescado, Leite, Mel e Carne Bovina**. Universidade Federal Fluminense – UFF, Niterói, RJ; 2007.

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

PAULA, F.P.; CARDOSO, C.E.; RANGEL, M. A. C. Análise Físico-química do Leite Cru Refrigerado Proveniente das Propriedades Leiteiras da Região Sul Fluminense. **Revista Eletrônica TECCEN**, Vassouras, v. 3, n. 4, p. 7-18, out./dez., 2010.

PEREIRA, M. G.; LIMA, M. T.; SANTANA, M. F. S. Queijo minas frescal. Universidade Federal do Piauí. Comunicado Técnico do Centro de Ciências Agrárias, Teresina, v. 5, n. 12, p. 1-4, 2006.

PERRY, KATIA S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, vol.27, n.2, pp. 293-300, Belo Horizonte, MG, 2004.

PIAZZON-GOMES, J.; PRUDÊNCIO, S. H.; SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.30, Supl.1, p. 77-85, maio 2010.

SANTOS, J.S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. **Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada**. *Braz. J. of Food Technol.*, Campinas, v. 15, n. 1, p. 1-14, jan./mar. 2012.

SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos**: propriedades, degradações, modificações. São Paulo: Editora-Livraria Varela, 1996. 517 p.

SILVA, F.T. Queijo minas frescal. Editoração Eletrônica: José Batista Dantas. Embrapa, informação tecnológica. Brasília – DF. 2005.

SILVA, J. G. **Características físicas, químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal da Canastra**. Lavras, MG. 2007. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Varala, 1997. 295p.

SILVA, P.H.F DA; PORTUGAL, J.A B.; CASTRO, M.C.D. e. Qualidade e competitividade em laticínios. Juiz de Fora: EPAMIG – Centro Tecnológico – ILCT, 1999. 116p.

SPREER, E. *Lactologia industrial*, 2 ed. Zagarosa: Ed. Acribia, 1991. 617p.

THOMAS, L. V; WIMPENNY, J.W. Investigação do efeito de variações combinadas de pH, temperatura e concentração de NaCl na nisina inibição de *Listeriamonocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 2006-2012, 1996

VALSECHI, A.O. Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados. Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p.

VAN SCHAIK,W.; GAHAN,C.G.M.;HILL,C.Acid adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin, 1999. In: SCHULZ,D.; PEREIRA, M.A.; BONELLI, R.R.; NUNES, M.M.; BATISTA, C.R.V. **Bacteriocinas: mecanismo de ação e uso na conservação de alimentos.** Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC, Florianópolis – SC. Revista Alim. Nutr., Araraquara, v.14,n.2,p. 229-235, 2003.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. da. Características do leite. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo/Pró-Reitoria de Extensão, Programa Institucional de Extensão, 2007.

WONG, D. W. S.; CARMIRAND, W. M.; PAVLAT, A. E. Structures and functionalities of milk proteins. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr., v. 36, n. 8, p. 807-844, 1996.