

TATIANE FERREIRA ARAÚJO

**POTENCIAL DE AMINAS BIOATIVAS COMO INDICADORAS
DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO E O PAPEL DA MICROBIOTA
ENDÓGENA DO LEITE CRU NA INOCUIDADE E
CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

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

T

A663p
2013

Araújo, Tatiane Ferreira, 1982-

Potencial de aminos bioativas como indicadoras do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo Minas artesanal / Tatiane Ferreira Araújo. – Viçosa, MG, 2013.

xiii, 113f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

I. Queijo-de-minas. 2. Aminos. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

II. Título.

CDD 22. ed. 637.3

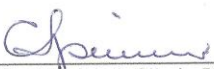
TATIANE FERREIRA ARAÚJO

**POTENCIAL DE AMINAS BIOATIVAS COMO INDICADORAS
DO ESTÁDIO DE MATURAÇÃO E O PAPEL DA MICROBIOTA
ENDÓGENA DO LEITE CRU NA INOCUIDADE E
CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO MINAS ARTESANAL**

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

Aprovada: 02 de agosto de 2013.


Prof.ª Luciana Rodrigues da Cunha


Dra. Claudia Lúcia de Oliveira Pinto


Prof.ª Maria Beatriz de Abreu Glória
(Coorientador)


Prof. Italo Tuler Perrone
(Coorientador)


Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira
(Orientador)

A minha principal razão de viver, de incentivo, de luta...
Aquela que acreditou em mim muito mais do que eu mesma...
Aquela que me aceitou com todos meus erros e dificuldades...
Aquela a quem tenho a honra de chamar de minha mãe...

Dedico...

A minha grande amiga Vivian Carolina (Carol) que esteve ao meu lado em todos os momentos alegres e outros nem tantos, sempre me apoiando, acreditando que eu era capaz de atingir meu objetivo. Carol, não tenho palavras para expressar minha gratidão, amizade e companheirismo a você. Sei que dificilmente outra pessoa faria o que você fez.

A você minha amiga... dedico todo esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me levantar em momentos em que a esperança estava perdida no meio de tantos problemas; por sempre me conceder mais um dia de vida para tentar mais uma vez.

Aos meus pais e meu irmão, que sempre me motivaram e demonstram o orgulho de verem que conseguir chegar até o fim, após tantos desafios.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos pela oportunidade da realização de um sonho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A professora Célia, que ao longo desses anos, me mostrou que crescemos muito mais quando conseguimos superar nossas dificuldades, sejam pessoais ou profissionais. Que a partir de seus “riscos” e “rabiscos” em suas correções, pude aperfeiçoar minha capacidade de escrever e discutir.

A professora Dra. Maria Beatriz Glória pela disponibilidade e co-orientação fundamentais na concretização desse estudo.

Ao professor Dr. Ítalo Perrone pela orientação e ensinamentos.

Aos membros da banca, professora Dra. Luciana Rodrigues e a pesquisadora da EPAMIG, Dra. Cláudia Oliveira, por terem aceitado participar de minha defesa e contribuírem ainda mais para meu aperfeiçoamento acadêmico.

Ao Leonardo, que mesmo entendendo muito pouco sobre minha pesquisa, achar que todos os congressos só servem para que eu possa passear, tem um orgulho de dizer que sou sua “Doutora”.

A minha família, em especial a tia Sônia, tio Carlos, Nayane e meu primo Brainer, por acreditarem em meu potencial e sempre estarem felizes com minhas conquistas. Ao meu tio Nivaldo pela paciência, disponibilidade e por me ensinar a fazer queijo. A minha tia Irenita por ter orgulho de dizer que sua sobrinha é “doutora”.

A minha amiga Cristina Pierroti, por ter convivido anos e anos e que agora, mesmo longe, tenho certeza que torce por mim. A minha amiga Mayra Martins, que quis o melhor para mim e sabia que terminaria o doutorado com grande êxito.

A minha amiga e companheira de congressos Roberta Careli, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e ajudando a tomar decisões corretas. A distância não foi impedimento para nossa amizade. Essa mesma distância também não me afastou de

minha amiga Fabíola Ângelo, parceira em diversos trabalhos e amiga em todos os outros momentos. Adoro vocês!

Aos meus amigos Luhan e Emanuelle por todo o convívio e apoio quando eu mais precisava. Vocês foram fundamentais!

Aos meus amigos de trabalho Maria de Lourdes, Rita de Cássia, Fábio Generoso e Cristiane por sempre me apoiarem e acreditarem em meus sonhos. Obrigada pela força sempre!

A minha amiga Mônica Sant’anna por todo auxílio, companheirismo ao longo desses quatro anos. Aos meus “companheiros de luta”, Erika, Michele, Viviane, Joice, Milene, Juliana e Éder. As minhas estagiárias Maria Vanessa, Francislaina, Isabela e Aline por estarem presente quando eu mesma não estava.

Aos “companheiros” Célio de Souza, “Pio”, Dimas, “Perereca”, por sempre estarem dispostos em me ajudar, mesmo nos momentos mais inconvenientes.

Ao Allan, Hiasmyne e Eber, do Laboratório de Embalagens pela ajuda nas análises de perfil de textura, sempre dispostos a me auxiliar, mesmo que o Natal estivesse batendo à porta.

Ao Marcos e Danielle do Laboratório de Processamento de Alimentos, por me ajudarem nas análises de cor e atividade de água em pleno final de ano.

A toda a equipe do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Federal de Minas Gerais na realização das análises de amins bioativas, em especial a Patrícia Tetti por ter sido muitas vezes, intermediadora entre eu e as análises.

A Patrícia Erika (Laboratório de Higiene) e Mayara (Laboratório de Leite e Derivados) pelo empréstimo de material em um momento onde era “tudo ou nada” em meu experimento.

A Lizzy Alcântara e Alex Timóteo pela ajuda nas análises estatísticas.

A Maria Bethânia (Laboratório de Leite e Derivados) por todas as orientações em físico-química durante a execução do meu projeto.

A Geralda, Vaninha, Polyana, Marcos e todos os servidores do Departamento de Tecnologia de Alimentos por todas as orientações a ajudas nos momentos mais extremos.

Enfim, a todos aqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização desde trabalho.

BIOGRAFIA

TATIANE FERREIRA ARAÚJO, filha de Ildeu Araújo de Andrade e Romilda Ferreira Oliveira Andrade, nasceu em Ipatinga, MG, em 20 de agosto de 1982.

No ano de 2000, ingressou-se no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UNILESTE). Em 2003, graduou-se e deu início a especialização *Lato Sensu* em Microbiologia pela Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MINAS). Em 2004, foi aprovada no concurso da Secretaria de Educação de Minas Gerais para o cargo de professor do ensino médio (Biologia), sendo nomeada em 2005.

Em 2006, ingressou no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa, em nível de mestrado, sob orientação da prof. Célia Lúcia Ferreira. Atuando na linha de identificação de bactérias lácticas, com ênfase no gênero *Enterococcus* isolados do soro fermento utilizado na fabricação do queijo Minas Artesanal. Submeteu-se à defesa de dissertação em julho de 2008.

Em agosto de 2008, ingressou no curso de doutorado no mesmo departamento, atuando na linha de inocuidade dos queijos artesanais. Em julho de 2013, submeteu-se a defesa de tese intitulada: Potencial de aminas bioativas como indicadoras do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo Minas artesanal.

ÍNDICE

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. HIPÓTESES	4
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1 Queijo Minas Artesanal (QMA)	6
3.2 Tecnologia de produção do QMA	9
3.3 Maturação e segurança dos queijos artesanais	11
3.4 Microbiota endógena do leite cru	13
3.4.1 Metabolismo da microbiota láctica endógena do leite cru.....	15
3.4.2 Ácidos orgânicos	16
3.4.3 Enzimas proteolíticas e lipolíticas	19
3.4.4 Bacteriocinas	21
3.4.5 Aminoácidos bioativos	23
3.4.5.1 Aminoácidos bioativos como indicador de maturação	25
CAPÍTULO 1. MODULAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, TEXTURA E COR DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DURANTE A MATURAÇÃO.....	28
Resumo	28
1. Introdução	29
2. Material e métodos	30
2.1 Fabricação dos queijos	30
2.2 Análises físico-químicas	32
2.3 Análise do perfil de textura (TPA)	32
2.4 Análise colorimétrica	33
2.5 Análise estatística	33
3. Resultados e discussão	34
3.1 Parâmetros físico-químico do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	34
3.2 Perfil de textura do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	39
3.3 Avaliação da cor do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	40
3.3.1 Cor da casca	40
3.3.2 Cor da massa do queijo	43

3.3.3 Índice de saturação (C*) e ângulo de tonalidade (H°)	45
4. Conclusão	47
5. Referências bibliográficas	47
CAPÍTULO 2. ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DURANTE A MATURAÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES NA INOCUIDADE DO QUEIJO MINAS ARTESANAL.....	51
Resumo	51
1. Introdução	52
2. Material e métodos	55
2.1 Fabricação dos queijos	55
2.2 Análises microbiológicas.....	56
2.3 Análises físico-químicas	56
2.4 Ácidos orgânicos	57
2.4.1 Preparo das amostras	57
2.4.2 Análises de ácidos orgânicos	58
2.5 Análise estatística	58
3. Resultados e discussão	59
3.1 Características microbiológicas e físico-químicos do queijo minas artesanal fabricado com leite cru e leite pasteurizado	59
3.2 Determinação de ácidos orgânicos em queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	69
4. Conclusão	72
5. Referências bibliográficas	74
CAPÍTULO 3. POTENCIAL DE AMINAS BIOATIVAS COMO INDICADOR DE MATURAÇÃO EM QUEIJO MINAS ARTESANAL.....	79
Resumo	79
1. Introdução	70
2. Material e métodos	82
2.1 Fabricação dos queijos	82
2.2 Análises físico-químicas	84
2.3 Análises microbiológicas	84
2.4 Análise de aminos bioativas	85
2.4.1 Determinação de aminos bioativas (AB).....	85
2.4.2 Extração de aminos bioativas	85
2.4.3 Separação e quantificação das aminos bioativas usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência	85

2.5 Análise estatística	86
3. Resultados e discussão	86
3.1 Características físico-químicas do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	86
3.2 Perfil microbiológico do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado	91
3.3 Perfil de aminos bioativas	93
4. Conclusão	97
5. Referências bibliográficas	98
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

RESUMO

ARAÚJO, Tatiane Ferreira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2013. **Potencial de aminas bioativas como indicadoras do estágio de maturação e o papel da microbiota endógena do leite cru na inocuidade e características do queijo Minas artesanal.** Orientador: Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira. Coorientadores: Maria Beatriz de Abreu Glória e Ítalo Tuler Perrone.

O queijo Minas artesanal (QMA) é reconhecido por suas características sensoriais únicas. Fabricado em cinco regiões já caracterizadas (Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes, Canastra e Serro), o QMA possui duas tecnologias de fabricação diferenciadas pelo tipo de prensagem: unicamente com a pressão das mãos (Serro) e prensagem manual com a utilização de um tecido (Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes e Canastra). Tal diferença constitui a base da definição dos dois períodos mínimos de maturação atualmente praticados para os queijos do Serro (17 dias) e da Canastra (22 dias). Esses períodos mínimos de maturação foram definidos em função do tempo de permanência do micro-organismo *Staphylococcus aureus* ao longo da maturação até atingir o limite estabelecido pela legislação ($2 \log \text{UFC g}^{-1}$). No entanto, a maior parte da produção do QMA é comercializado com período inferior ao atualmente estabelecido por lei. Sabe-se que a microbiota endógena do leite por meio da maturação, contribui para a inocuidade do produto. Verificou-se também por meio de pré-experimentos no presente estudo que diferentes aminas bioativas (AB) são acumuladas ao longo da maturação dos QMA. Assim, a pesquisa teve como objetivo: a) avaliar o papel na microbiota endógena do leite cru na inocuidade do QMA; b) Verificar o potencial de AB na indicação do período de maturação do QMA. Para avaliação do fenômeno relacionado à inocuidade inferida pela maturação utilizou-se como modelo o QMA do Serro. Avaliou-se ao longo de 60 dias de maturação (8, 17, 30 e 60 dias) nos QMA feitos com leite cru (NP) e com leite pasteurizado (P) parâmetros físico químicos (pH, acidez titulável, cloretos, gordura, atividade de água, cinzas, nitrogênio total), extensão de profundidade de proteólise; perfil de ácidos orgânicos e aminas bioativas; parâmetros microbiológicos (unidades formadoras de colônias de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, mesófilos aeróbios, mofos e leveduras, *Enterobacteriaceae*, coliformes a 30°C e 45°C; *Staphylococcus aureus* e parâmetros sensoriais (textura e cor). Os resultados demonstraram diferença ($P < 0,05$) nas variáveis pH, acidez titulável, gordura, gordura no extrato seco (GES), umidade e nitrogênio

total. A proteólise mais intensa no queijo fabricado com leite cru afetou a textura e cor da massa dos queijos ($P < 0,05$) tornando possível estabelecer uma correlação com o estágio de maturação. O tratamento térmico pode ter alterado a microbiota endógena qualitativamente uma vez que as concentrações dos grupos microbianos avaliados não diferiram com exceção de *S. aureus* que permaneceu com contagens superiores (20 e 35 dias respectivamente para os queijos feitos com leite cru e pasteurizado) às definidas pela legislação atualmente. Esta constatação corrobora o papel da microbiota endógena na inocuidade do QMA feito com leite cru. O tratamento térmico afetou a microbiota, alterou o perfil de ácidos orgânicos (lático, cítrico, butírico, propiônico e acético) e de aminas bioativas. Observou-se o potencial da amina bioativa histamina como indicadora de estágio de maturação. Sugere-se uma faixa entre 8,65-9,29 mg/100g de histamina para o QMA do Serro com 17 dias de maturação, fabricado com leite cru. Além do comprometimento da inocuidade inferido pelo tratamento térmico ao leite, constatou-se também que a textura e cor foram alteradas no QMA do Serro feito com leite pasteurizado quando comparado ao produto tradicional feito com leite cru,. Sugere-se que mais estudos sejam realizados para identificar as espécies microbianas que predominam no queijo feito com leite cru e que são eliminadas pelo tratamento térmico, para um melhor entendimento do fenômeno que tem garantido um produto maturado seguro para consumo.

ABSTRACT

ARAÚJO, Tatiane Ferreira, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, august, 2013. **Potencial biactive amines as indicators of ripening stages and the role of endogenous microbiota of raw milk in harmlessness and characteristics of Minas artisanal cheese.** Adviser: Célia Lúcia de Lucas Fortes Ferreira. Co-adviser: Maria Beatriz de Abreu Glória and Ítalo Tuler Perrone.

The Minas artisanal cheese (QMA) is recognized for its unique sensory characteristics. Made in five regions already characterized (Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes, Canastra and Serro), the QMA has two manufacturing technologies differentiated by the type of press: only with the pressure of hands (Serro) and manual pressing with the use of a tissue (Araxá, Cerrado, Campo das Vertentes and Canastra). This difference is the basis of the definition of the two minimum periods of ripening presently used for cheese of Serro (17 days) and Canastra (22 days). These minimum periods of ripening were defined based on the permanence of the micro-organism *Staphylococcus aureus* during the ripening until the limit established by the legislation (2 log CFU g⁻¹). However, most production is offered for sale the QMA period less than the currently set by law. Is known that endogenous microbiota in milk through of ripening contributes to the safety of the product. It was also found by means of pre-experiments in this study different bioactive amines (AB) are accumulated along the ripening of the QMA. Thus, the research aimed to: a) evaluate the role of endogenous microbiota in raw milk safety of QMA b) Verify the potential of AB in the indication of the ripening period of the QMA. To assess the safety related phenomenon inferred by ripening was used as a model QMA Serro. Evaluated over 60 days of aging (8, 17, 30 and 60 days) in QMA made with raw milk (NP) and pasteurized (P) physico chemical parameters (pH, titratable acidity, chloride, fat, activity water, ash, total nitrogen), extended depth of proteolysis; profile of organic acids and bioactive amines, microbiological parameters (colony forming units of *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, aerobic mesophilic, molds and yeasts, Enterobacteriaceae, coliforms at 30°C and 45 ° C; *Staphylococcus aureus* and sensory parameters (texture and color). the results showed differences (P < 0,05) in pH, titratable acidity, fat, fat in dry matter (GES), moisture and total nitrogen. The more intense proteolysis in cheese made with raw milk affect the texture and color of the mass of the cheeses (P < 0,05) making it possible to establish a correlation with the stage of maturation. The heat treatment may have altered the endogenous microbiota qualitatively since the concentrations evaluated microbial groups did not differ with the

exception of *S. aureus* counts remained higher (20 and 35 days respectively for cheeses made with raw milk and pasteurized) to which the legislation today. This finding corroborates the role of endogenous microflora in the safety of the QMA made with raw milk. The heat treatment affected the microbiota altered the profile of organic acids (lactic, citric, butyric, propionic and acetic acid) and bioactive amines. There is the potential of bioactive amine histamine as an indicator of ripening stages. Suggest a range between 8.65 to 9.29 mg/100 g of histamine in QMA to Serro with 17 days of ripening, made from raw milk. Besides compromising safety inferred by the heat treatment of milk, it was also found that the texture and color were changed in QMA Serro made with pasteurized milk when compared to traditional product made with raw milk. Suggested that further studies be conducted to identify the microbial species that predominate in cheese made with raw milk and are eliminated by heat treatment, for a better understanding of the phenomenon that has secured a matured product safe for consumption.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O queijo minas artesanal (QMA) é um dos produtos brasileiros mais tradicionais e importantes, o qual apresenta características de *flavor* e textura únicas. A transformação da matéria-prima (leite cru bovino) no produto final compreende um conjunto de transformações físico-químicas que irão determinar as propriedades finais e típicas do queijo.

Entende-se por queijo Minas artesanal, “o queijo elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se em sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido”, de acordo com a Lei No 14.185, 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002). Atualmente, a coagulação é feita por coalhos de origem microbiana como opção à quimosina. Assim, os ingredientes básicos para a produção do queijo Minas artesanal são: leite cru, coalho e fermento endógeno (FE).

O FE é o soro fermentado resultante da dessoragem dos queijos já salgados, e coletados de um dia para o outro para ser utilizado na produção seguinte. Esse FE contém diferentes grupos microbianos que direcionam a fermentação desejável, devido a redução do pH, que resulta da produção de ácidos orgânicos, dentre eles, o ácido lático. Essa acidificação favorece a atuação do coalho (pH 5,6) e a inibição do crescimento de possíveis contaminantes presentes no leite. A coagulação da massa ocorre em até 50 minutos após a adição do FE e do coalho (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006; NOBREGA, 2007). Ainda compondo a microbiota do FE, encontra-se uma diversidade de leveduras, que atuam principalmente na degradação de algumas proteínas, liberando compostos que contribuem para as características típicas desses queijos (NÓBREGA, 2007).

A microbiota presente naturalmente no leite e no FE participa de diferentes processos metabólicos como: i) fermentação da lactose com produção de ácido lático (ROBISON et al., 2002), ii) quebra do citrato (HUGENHOLTZ, 1993), iii) proteólise (CURTIN et al., 2002), iv) lipólise (SMIT et al., 2005), v) descarboxilação de aminoácidos (FERNANDEZ et al., 2007; BONNETTA et al., 2008) os quais definem

as diferentes características sensoriais observadas nos queijos artesanais produzidos nas diferentes regiões do estado.

A fermentação da lactose por BAL resulta principalmente em ácido láctico, o que causa uma rápida diminuição do pH. A presença desse ácido influencia na textura e flavour em produtos fermentados, além de contribuir na estabilização da microbiota láctica e inibir o crescimento de possíveis contaminantes.

Metabólitos oriundos da atividade da microbiota endógena como ácidos orgânicos e peptídeos, além de influenciarem as propriedades sensoriais dos QMAs, podem atuar na inibição de uma possível microbiota contaminante dos queijos contribuindo para sua inocuidade (TOPISIROVIC et al., 2006).

Várias estirpes de BAL têm sido relacionadas como produtoras de bacteriocinas como: enterocinas, produzidas por espécies do gênero *Enterococcus* spp. (GONZÁLEZ et al., 2006); nisina, produzida pela espécie *Lactococcus lactis* subsp *lactis* (RODRIGUEZ et al., 2000) e pediocina, produzida por espécies do gênero *Pediococcus* spp. (GURIRA e BUYS, 2005). O incremento de BAL pela adição do FE ao leite para a fabricação dos QMAs constitui, dessa forma, um fator adicional na segurança desses queijos, pois por meio de compostos já citados, especialmente ácido láctico e bacteriocinas, são capazes de inibir o crescimento da população de contaminantes/patógenos.

Um dos problemas do QMA é sua comercialização com menos de 60 dias de maturação, que de acordo com a Portaria n° 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), regulamentada pela Resolução n° 07, de 28 de novembro de 2000, indica ser esse o período mínimo necessário para garantir a inocuidade do produto. No entanto, o QMA é colocado no mercado em quase toda sua totalidade com um período inferior de maturação ao exigido pela legislação.

No intuito de resguardar a tradição desses queijos, em 31 de janeiro de 2002, a Lei estadual n°14.185 foi promulgada com a finalidade de regulamentar a adequação e certificação das queijarias, além de outras providências no intuito de proteger a tradição dos queijos mineiros artesanais; porém, manteve-se o período mínimo de 60 dias de maturação para comercialização do produto. Sabe-se que o queijo, quando submetido a maturação por 60 dias, o produto é descaracterizado. Assim, não havendo dados que corroborem esse período, estudos foram

desenvolvidos e os períodos de 17 e 22 dias de maturação estabelecidos para os queijos do Serro (MARTINS, 2006) e Canastra (DORES, 2007), respectivamente.

O Decreto n° 44864 de 01 de agosto de 2008, que altera o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de queijo Minas Artesanal, permitiu a disponibilidade de comercialização dos QMA com período menor que 60 dias de maturação; no entanto, o produto poderia circular somente dentro do Estado de Minas Gerais. Esse paradoxo resultou numa insatisfação geral, tanto dos produtores como dos consumidores e donos de comércios em outros estados da federação. Assim, devido a grande importância desse produto na economia familiar, em 15 de dezembro de 2011, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), com a finalidade de diminuir os entraves que excluem a colocação do QMA no mercado nacional devido a Instrução Normativa (IN) n° 52, publicou a IN n° 57, que discute a possibilidade de redução do período de maturação inferior a 60 dias desde que sua segurança seja cientificamente comprovada.

Para embasamento de propostas que justifiquem essa redução do período de maturação, são necessárias informações sobre o metabolismo e evolução microbiana durante a maturação, assim como das relações da microbiota láctica endógena com a microbiota comensal do queijo.

O período de maturação dos QMA são definidos pela presença da microbiota láctica, que por meio de seus metabólitos, inibem contaminantes e comensais indesejáveis. Desta forma, é importante conhecer o efeito desses inibidores produzidos pelas BAL frente aos contaminantes e a taxa de redução dos mesmos. *Staphylococcus aureus* tem sido determinante na definição do período seguro de maturação dos QMA (MARTINS, 2006; DORES, 2007). Esse gênero além de toxinas produz aminas biogênicas que podem ser determinadas como indicadoras de seu metabolismo.

Assim, este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da alteração na microbiota endógena do leite cru e nas características do QMA e dessa forma, inferir o papel da microbiota na inocuidade dos QMA, garantindo a segurança e qualidade dos queijos artesanais comercializados.

2. HIPÓTESES

2.1 Hipótese 1

A microbiota endógena inibe o crescimento de micro-organismos indesejáveis durante a maturação de Queijo Minas Artesanal (QMA) fabricado a partir de leite cru.

2.1.1 Objetivos

- Produzir o QMA a partir de leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) de acordo com tecnologia empregada na região do Serro;
- Quantificar os grupos de bactérias lácticas (BAL) e contaminantes (descritos pela legislação) presentes nos QMA feitos com leite cru (NP) e com leite pasteurizado (P);
- Comparar as contagens dos grupos de micro-organismos contaminantes presentes nos QMA NP e P com os níveis indicados pela legislação.
- Comparar as propriedades físico-químicas do QMA NP e P ao longo da maturação.

Esta hipótese foi testada por meio dos seguintes experimentos:

- Alterações microbiológicas e suas implicações na inocuidade do queijo Minas artesanal fabricado com leite cru e pasteurizado durante a maturação.
- Alterações na concentração de ácidos orgânicos durante a maturação do queijo minas artesanal fabricado com leite cru e pasteurizado.

2.2 Hipótese 2

A produção de aminas bioativas (AB) durante o processo de cura do QMA pode ser utilizada como índice de maturação.

2.2.1 Objetivos

- Produzir o QMA a partir de leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) de acordo com tecnologia empregada na região da Serro
- Determinar o índice de extensão e profundidade da proteólise nos queijos QC e QP ao longo da maturação;
- Quantificar as aminas bioativas nos insumos e queijos NP e P;

Esta hipótese foi testada por meio dos seguintes experimentos:

- Modulação de amins bioativas durante a maturação de queijo Minas artesanal produzido na região do Serro e da Canastra: estudo preliminar.
- Potencial de amins bioativas como indicador de maturação em queijo Minas artesanal.

2.3 Hipótese 3

A composição centesimal, textura e a cor do QMA são afetados pelo processo de maturação.

2.3.1 Objetivos

- Produzir o QMA a partir de leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) de acordo com tecnologia empregada na região do Serro;
- Comparar o perfil de textura e de cor nos queijos NP e P ao longo da maturação;
- Estabelecer os principais parâmetros de textura e cor que caracterizam o QMA.

Esta hipótese foi testada por meio dos seguintes experimentos:

- Modulação dos parâmetros físico-químicos, textura e cor do queijo minas artesanal durante a maturação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Queijo Minas Artesanal (QMA)

Nas regiões do Serro, Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes, a produção de queijo tem raízes antigas. Os colonos portugueses introduziram no Brasil a técnica artesanal para a produção de queijo no século de XVIII, onde nas cidades empregava-se o leite de ovelha e extrato das flores de cardo (*Cynara cardunculus*) como coalho. Na segunda metade do século XVIII, nas serras de Minas Gerais, esses hábitos foram reinterpretados, coalhando-se o leite de vaca cru no estômago de ruminantes, dos bezerros ou de outros mamíferos locais como tatu. A adição de coalho comercial foi somente introduzida na década de oitenta, fazendo juntamente com o leite cru e o FE, parte dos ingredientes utilizados na fabricação dos QMA (REGOSA e GOVONI, 2009).

Os QMA produzidos nas diferentes regiões (Serro, Cerrado, Canastra, Araxá e Campo das vertentes - Figura 1), refletem as características da região na qual foi produzido, assim como as diferentes condições de processamento e a qualidade da matéria-prima. Apesar de serem todos fabricados com leite cru de vaca, as condições ambientais, alimentação do gado entre outros fatores, afetam as características que definem esses queijos (NÓBREGA, 2012). O QMA, de acordo com a Lei Estadual nº 14.185 é definido como “o queijo elaborado, na propriedade de origem do leite, à partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato do prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido”. A produção de queijos artesanais em Minas Gerais caracteriza-se por ocorrer em pequena escala, fabricado diretamente nas propriedades rurais nas quais o leite é obtido. Ocupa cerca de 30 mil famílias de pequenos proprietários, totalizando aproximadamente 100 mil pessoas nas cinco regiões tradicionais que produzem anualmente 29.005 toneladas/ano de queijo entre os 9.445 produtores, gerando 26.792 empregos diretos (EMATER, 2009).

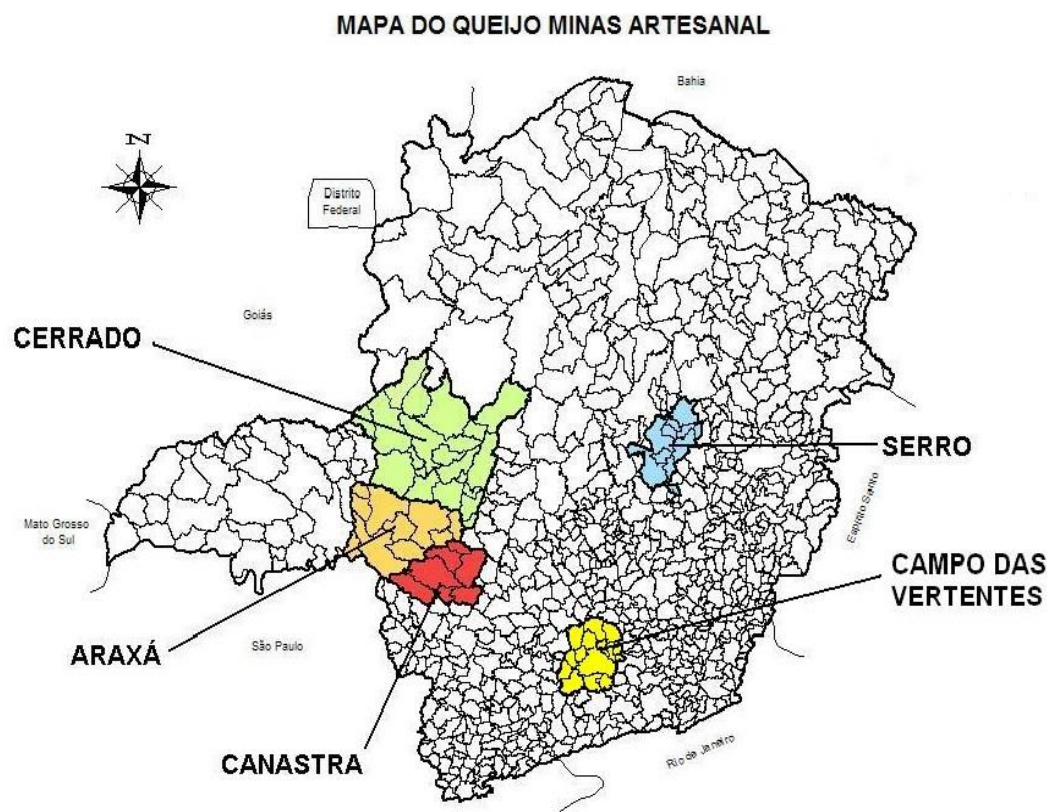


Figura 1. Regiões produtoras de queijo Minas artesanal. Fonte: Emater 2008.

Diversas portarias (Tabela 1) estabelecem as normas para a produção do queijo Minas artesanal, a definição das microrregiões produtoras de QMA entre outras atribuições relacionadas ao QMA.

Em 11 de janeiro de 2011, a Lei Estadual nº19.476 dispõe sobre a habilitação sanitária de estabelecimento agroindustrial rural de pequeno porte no estado, regularizou que todo estabelecimento agroindustrial rural de pequeno porte do estado de Minas Gerais será habilitado pelo órgão de controle ou de defesa sanitária competente para que pudesse produzir o QMA, condicionada à prévia inspeção e à fiscalização sanitária do estabelecimento e dos produtos.

Devido ao valor econômico e cultural dos QMA para o estado, o Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), em 15 de maio de 2008,

tombou como Patrimônio Cultural Imaterial o “modo artesanal de fazer queijo Minas”.

Tabela 1. Portarias que regulamentam o Queijo Minas Artesanal.

Portaria estadual (nº)	Título
517 (14 junho de 2002)	Estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para produção de queijo minas artesanal.
518 (14 de junho de 2002)	Dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do queijo minas artesanal.
523 (3 de julho de 2002)	Dispõe sobre as condições higiênico-sanitárias e boas práticas na manipulação e fabricação do queijo minas artesanal.
546 (29 outubro de 2002)	Identifica a micro região do Serro.
594 (10 de junho de 2003)	Identifica a microrregião de Araxá.
619 (1º de dezembro de 2003)	Identifica a microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo minas artesanal.
874 (2 de outubro de 2007)	Altera a denominação da microrregião do Alto Paranaíba como produtora do queijo minas artesanal (Cerrado).
694 (17 de novembro de 2004)	Identifica a microrregião da Canastra.
818 (12 de dezembro de 2006)	Baixa o regulamento técnico de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências.
1022 (03 de novembro de 2009)	Identifica a microrregião do Campo das Vertentes

Nessa mesma linha de reconhecimento e valorização, o Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) reconheceu os QMA produzidos nas regiões do Serro (13/12/2011) e Canastra (13/03/2012) com o selo de Indicação Geográfica (IG). A IG delimita a área de produção, restringindo seu uso aos produtores da região, em geral, uma associação e/ ou cooperativa. Assim, os queijos produzidos nas cidades Alvorada de Minas, Conceição do Mato Dentro, Dom Joaquim, Materlândia, Paulistas, Rio Vermelho, Sabinópolis, Santo Antonio de

Itambé, Serra Azul de Minas, Serro e Coluna, podem usar a denominação “Queijo Minas Artesanal do Serro” para comercialização de seus produtos. De forma similar, os municípios de Piumhi, Vargem Bonita, São Roque de Minas, Medeiros, Bambui, Tapirai e Delfinópolis, identificam seus queijos por “Queijos Canastra”. As regiões do Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes também estão se organizando para solicitação de IG de seus queijos.

O reconhecimento dessas microrregiões com o selo de IG fortalece o reconhecimento do QMA como uma iguaria nacional, além de fortalecer sua produção entre os pequenos produtores, objetivando a produção de um produto de melhor qualidade.

3.2 Tecnologia de produção do QMA

Apesar de cada região ter “o seu modo de fazer queijo”, a tecnologia de fabricação é similar em todas as regiões (Figura 2): a diferença está no momento da prensagem da massa. Queijos fabricados na região do Serro são prensados utilizando-se somente as mãos; os queijos das regiões Canastra, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes são prensados com o auxílio de um tecido. Essa diferença, associados a outros fatores (clima, relevo, matéria-prima) resultam nas diferentes características sensoriais dos queijos produzidos em cada uma dessas regiões.

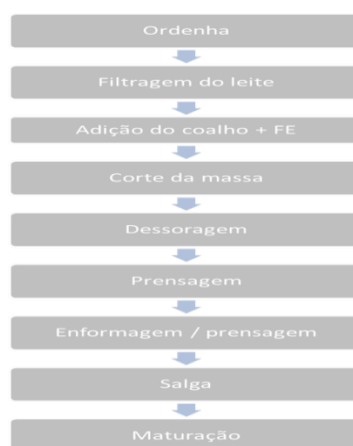


Figura 2. Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal.

- (1) A utilização de tecido no momento da prensagem (região da Canastra) difere da tecnologia utilizada na região Serro, no qual se utiliza somente as mãos.

Após a ordenha, o leite é filtrado e acondicionado em recipientes adequados, no qual se adiciona o fermento endógeno (FE), o coalho e o sal. Após repouso por cerca de 45 - 50 minutos, a massa é cortada, geralmente com uma pá. Após a separação e retirada do soro, a massa é enformada e prensada. Após enformagem, segue-se salga a seco no qual o sal, grosso ou fino, é colocado na parte superior do queijo, ainda dentro da forma. Após a salga em ambos os lados, o soro salgado e translúcido, menos abundante, que escorre na bancada ao final da dessora é então coletado e constitui o FE utilizado para inocular a próxima batelada do queijo. Os queijos são maturados em prateleiras.

Os períodos de maturação atualmente praticados são de 17 dias para o QMA do Serro (MARTINS, 2006) e 22 dias para o QMA da Canastra (DORES, 2007). O período de maturação dos QMA é definido pela presença da microbiota láctica, que por meio de seus metabólitos, inibem contaminantes e comensais indesejáveis. Desta forma, é importante conhecer o efeito desses inibidores produzidos pelas BAL frente aos contaminantes e a taxa de redução dos mesmos. *Staphylococcus aureus* tem sido determinante na definição do período seguro de maturação dos QMA (MARTINS, 2006; DORES, 2007).

A tecnologia de fabricação e a qualidade da matéria prima irão definir a dinâmica dos micro-organismos que compõe a comunidade microbiana do QMA. A microbiota dos queijos é constituída por uma comunidade complexa, que evolui por meio de sucessões microbianas (IRLINGER e MOUNIER, 2009), desde as fases de produção dos queijos até sua comercialização, resultando em características únicas para cada tipo de queijo, além de influenciar na inocuidade desse produto devido a atividade microbiana, como a síntese de substâncias tais como ácido láctico e bacteriocinas, que inibem o crescimento de micro-organismos patogênicos.

Dessa forma, existe a necessidade de se estabelecer variáveis e parâmetros de qualidade, que possam corroborar com os dados de caracterização dos QMA, assim como contribuir para a avaliação da inocuidade desses produtos por meio da indicação de seu grau de maturação. A inocuidade dos QMA está relacionado com seu grau de maturação pois, garantindo que o período mínimo de maturação seja cumprido, permite que o papel da microbiota endógena, associada as alterações físico-químicas que ocorrem durante a maturação, se consolidem na inibição e controle do crescimento de micro-organismos patogênicos.

3.3 Maturação e segurança dos queijos artesanais

A maturação é uma etapa essencial em queijos fabricados com leite cru. Nessa fase, ocorrem inúmeras reações que irão, ao fim da maturação, definir as propriedades sensoriais dos queijos (PERRY, 2004). O processo de maturação compreende diferentes reações físicas, químicas e microbiológicas em toda a extensão do queijo.

Entre as diferentes fases envolvidas no processamento e maturação dos queijos, a fase enzimática se destaca pelo envolvimento de uma série de modificações bioquímicas nos principais constituintes da massa (FOX, 2000). O teor de umidade do queijo, além de afetar sua consistência, tem grande influência sobre as modificações físico-químicas que ocorrem ao longo da maturação. O sal dissolvido no meio aquoso, além de modificar o sabor do produto, reduz a atividade de água (a_w), e dessa forma, regula a atividade enzimática e desempenha papel seletivo no desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis (SBAMPATO et al., 2000). A lipólise e a proteólise são os principais processos bioquímicos observados durante a maturação dos queijos artesanais. A lipólise está relacionada principalmente a liberação de compostos que irão conferir sabor e aromas típicos de queijos maturados (CABEZAS et al., 2005). Já a proteólise, irá atuar diretamente na textura, além da liberação de pequenos peptídeos que, de forma conjunta, definem as propriedades organolépticas únicas desses queijos (PERRY, 2004).

A população microbiana presente nos queijos é bastante diversa, ultrapassa 10^9 UFC/g e mantém essa contagem ao longo da maturação; entretanto, o equilíbrio entre os diferentes grupos microbianos está sempre em evolução, acompanhando as alterações físico-químicas que ocorrem nos queijos (IRLINGER e MOUNIER, 2009).

Na fase inicial da maturação, a umidade do queijo é mais elevada, o que pode favorecer o desenvolvimento de possíveis contaminantes provenientes do leite. *Staphylococcus aureus*, patógeno frequentemente associado a contaminação de produtos lácteos, principalmente em produtos recém produzidos, pode aumentar sua população nessas condições, o que resulta na possibilidade da expressão de genes relacionados a síntese de enterotoxinas, podendo ocasionar intoxicação alimentar. Mesmo com a eliminação do micro-organismo, essas toxinas permanecem no queijo, pois são consideradas termorresistentes (CARMO et al., 2002).

As BAL são capazes de inibir *S. aureus* por diferentes mecanismos como atividade de bacteriocinas e redução do pH devido ao acúmulo de ácido lático na matriz do queijo. A nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* possui atividade de inibição sobre diferentes patógenos, dentre eles *S. aureus* (DELBES-PAUS et al., 2010). A redução do pH em resposta ao acúmulo de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido lático, provoca uma condição de estresse em *S. aureus*, que sintetiza proteínas de superfície como forma de defesa (NOUT, 1994; NOVICK e GEISINGER, 2008). Porém, esse mecanismo é o mesmo que regula genes relacionados à expressão de enterotoxinas. Assim, o baixo pH pode influenciar na presença ou não de enterotoxinas em queijos, pois mesmo que a cepa apresente o gene, o mesmo pode não ser expresso, pois nessas condições, o micro-organismo precisa responder a essa situação de estresse; caso contrário, o mesmo será eliminado da microbiota pela atuação do ácido.

O período de maturação estabelecido para o QMA é definido pela atividade da microbiota endógena, principalmente BAL, que, por meio de seus metabólitos, inibem contaminantes e comensais indesejáveis (TOPISIROVIC et al., 2006). Associado a essa atividade, ocorrem fenômenos como redução da a_w , pH e diminuição do potencial de oxi-redução (Eh) o que dificulta o crescimento e/ou a viabilidade de micro-organismos, principalmente de patogênicos, garantindo a inocuidade do produto final (MARTINS, 2006).

Porém, um dos maiores problemas dos QMA refere-se a sua comercialização com menos de 60 dias de maturação, que de acordo com a Portaria n° 146 de 07 de março de 1996 do MAPA, regulamentada pela Resolução n° 07, de 28 de novembro de 2000, indicou ser esse o período mínimo necessário para garantir a inocuidade do produto. No entanto, o QMA é colocado no mercado em quase toda sua totalidade com um período inferior de maturação ao exigido pela legislação.

No intuito de resguardar a tradição desses queijos, em 31 de janeiro de 2002, a Lei estadual n°14.185 foi promulgada com a finalidade de regulamentar a adequação e certificação das queijarias, além de outras providências no intuito de proteger a tradição dos queijos mineiros artesanais; porém, manteve-se o período mínimo de 60 dias de maturação para comercialização do produto. Sabe-se que o queijo, quando submetido a maturação por 60 dias, é descaracterizado. Assim, não havendo dados que corroborem esse período, estudos foram desenvolvidos e os

períodos de 17 e 22 dias de maturação estabelecidos para os queijos do Serro (MARTINS, 2006) e Canastra (DORES, 2007), respectivamente.

O Decreto n° 44864 de 01 de agosto de 2008, que altera o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de queijo Minas Artesanal, permitiu a comercialização dos QMA com períodos menores do que 60 dias de maturação; no entanto, o produto poderia circular somente dentro do Estado de Minas Gerais. Esse paradoxo resultou numa insatisfação geral, tanto dos produtores como dos consumidores e donos de comércios em outros estados da federação. Assim, devido a grande importância desse produto na economia familiar, em 15 de dezembro de 2011, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) com a finalidade de diminuir os entraves que excluem a colocação do QMA no mercado nacional devido a Instrução Normativa (IN) n° 52, publicou a IN n° 57, que discute a possibilidade de redução do período de maturação inferior a 60 dias desde que sua segurança seja cientificamente comprovada.

Para embasamento de propostas que justifiquem essa redução do período de maturação, são necessárias informações sobre o metabolismo e evolução microbiana durante a maturação, assim como das relações da microbiota láctica endógena do leite cru com a microbiota comensal do queijo.

3.4 Microbiota endógena do leite cru

O leite cru é conhecido por apresentar uma comunidade microbiana complexa. Sua rica composição nutricional, alto teor de água e pH próximo da neutralidade, permitem o crescimento de um grande número de micro-organismos. As características climáticas ambientais também influenciam a composição da microbiota do leite (GRAPPIN e BEAUVIER, 1998).

Entre os diferentes micro-organismos que compõe a microbiota estão as BAL (FOX, 2000), dentre as quais os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weisella* tem sido citados. Também podem ser isoladas estirpes de *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, leveduras e fungos (NÓBREGA, 2007; COPPOLA et al., 2008; NÓBREGA, 2012).

As BAL são anaeróbias facultativas ou microaerofílicas, sacarolíticas com produção principalmente de ácido láctico a partir da degradação da glicose; são

classificadas em homo ou heterofermentativas, de acordo com o produto final da fermentação. As homofermentativas convertem a glicose a cerca de 85 % de ácido láctico, enquanto que as heterofermentativas produzem além do ácido láctico, outros compostos como dióxido de carbono, diacetil, dentre outros (HOLT et al., 1994).

De ocorrência natural no leite cru, as BAL podem ser classificadas em *iniciantes (starter)* e *não iniciantes (NSLAB)*. As bactérias starter podem ser também denominadas fermentadoras devido a rápida produção de ácido láctico na fase inicial do processo fermentativo, direcionando a fermentação e resultando em uma rápida coagulação do leite e também na inibição do crescimento de patógenos. São representadas basicamente pelo gênero *Lactococcus* e a espécie *Streptococcus thermophilus*. Na produção dos queijos, estirpes com função *iniciante* possuem papel importante na sinérese durante a formação da coalhada (ROBINSON, 2002).

As bactérias NSLAB apresentam atividade intensificada ao longo do processo de maturação, sendo também denominadas maturadoras, no qual a atividade das enzimas como proteases, peptidases e lipases, resulta em liberação de diferentes compostos que irão definir as propriedades sensoriais dos queijos (SETTANNI e MOSCHETTI, 2010). Nesse grupo, estão incluídas espécies dos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Micrococcus* dentre outros. Espécies NSLAB predominam na maturação ao passo que as espécies iniciantes predominam na fase inicial da produção dos QMA (FOX et al., 2000; SHAKEEL-UR et al., 2000).

As bactérias NSLAB apresentam capacidade de prevalecer em condições altamente seletivas, como as que ocorrem durante a maturação, dentre as quais: baixa disponibilidade de lactose em resposta ao consumo quase em sua totalidade da lactose nas primeiras horas de produção dos queijos pelas bactérias *iniciantes*; umidade abaixo de 50 %; NaCl na concentração de 4 a 6 %; baixas concentrações de oxigênio (FOX et al., 2000).

A manutenção do equilíbrio dessa microbiota é de suma importância para os queijos artesanais, pois a presença dos metabólitos oriundos da atividade microbiana das bactérias starter e NSLAB, associadas ao metabolismo de outros grupos microbianos como fungos e leveduras, desde o processo de fermentação e ao longo da maturação, contribuem no controle da microbiota patogênica, muitas vezes de ocorrência natural na microbiota do leite cru.

3.4.1 Metabolismo da microbiota láctica endógena do leite cru

A microbiota presente no queijo é resultado de diferentes variáveis que influenciam inicialmente, na composição da microbiota presente no leite, selecionando esses micro-organismos. Dentre esses fatores, o ambiente (condições de clima, relevo, vegetação entre outros) destaca-se na seleção dessa microbiota (GRAPPIN e BEUVIER, 1998), que continuará a ser selecionada durante a fermentação do leite, seguido da formação da coalhada, maturação e armazenamento dos queijos.

Na produção de queijos, bactérias starter e NSLAB são identificadas, mas em dinâmicas diferente, principalmente ao longo da maturação: as bactérias *starter* crescem inicialmente na fase de fermentação, coagulação do leite e nos primeiros estágios da maturação. A rápida produção de ácido láctico modifica o pH do meio, estimulando o crescimento de bactérias mais resistentes a condições ácidas como *Lactobacillus* e *Enterococcus*, gêneros já relacionados como NSLAB, que irão se manter durante todo o processo de maturação no qual o queijo será submetido.

A ocorrência dessa sucessão ecológica é, dentre outros fatores, em função da diferença do metabolismo entre os diferentes gêneros de BAL e das condições ambientais que se modificam ao longo da maturação. Dentre as diferentes atividades metabólicas, pode se citar a utilização do citrato como fonte de energia, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, expressão de enzimas do tipo descarboxilases e principalmente, a velocidade na conversão da lactose em ácido láctico.

A população microbiana presente nos queijos é bastante diversa, ultrapassa 10^9 UFC/g e mantém essa contagem ao longo da maturação. Essa microbiota endógena tem sido considerada o principal fator no desenvolvimento das propriedades sensoriais e inocuidade em queijos fabricados com leite cru (GRAPPIN e BEUVIER, 1997).

O perfil competitivo das BAL inseridas em nichos complexos como os queijos, exige que estes micro-organismos viabilizem sua colonização e domínio populacional em relação a outros grupos que também são capazes de sobreviver. Ao degradarem os diferentes compostos presentes no leite (lactose, lipídeos e proteínas), as BAL produzem substâncias como ácido orgânicos, enzimas e bacteriocinas que auxiliam no estabelecimento dessa população nos queijos (TOPISIROVIC et al., 2006) em detrimento da população contaminante.

Uma das implicações dessas interações microbianas refere-se a garantia da inocuidade alimentar desses queijos devido a presença de estirpes com efeito antagonista sobre micro-organismos deteriorantes. Esse antagonismo pode ocorrer pela atuação de compostos proteicos (bacteriocinas) e não proteicos (ácidos orgânicos, ácidos graxos e peróxido de hidrogênio) principalmente durante a etapa de maturação (IRLINGER e MOUNIER, 2009).

Assim, a microbiota endógena do leite naturalmente exerce essas atividades metabólicas em seus derivados lácteos. O leite, quando de boa qualidade, apresenta uma elevada população de BAL, que sobrepuja o crescimento de possíveis contaminantes, direcionando a fermentação, o que garantiria um produto final inócuo ao consumidor. Além disso, ao consideramos o leite como um complexo ecossistema, assim como os queijos, a produção de compostos antagonistas provavelmente é uma estratégia metabólica dessas bactérias para a prevalência dessa população em relação as outras possíveis populações presentes no leite cru e nos queijos.

Dessa forma, pode-se citar, entre outras substâncias, a produção de ácidos orgânicos, enzimas, bacteriocinas e aminas bioativas (TOPISIROVIC et al., 2006) como compostos sintetizados pelas BAL que auxiliam no estabelecimento dessa população nos queijos artesanais.

3.4.2 Ácidos orgânicos

A produção de ácidos orgânicos favorece a coagulação no QMA e atua na prevenção e/ ou redução de crescimento de patógenos ou micro-organismos contaminantes. A redução de coliformes, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., e outros contaminantes indesejáveis ao longo da maturação, resulta do efeito inibitório das condições estabelecidas, decorrentes do processamento e da dinâmica da microbiota.

Os ácidos orgânicos são os principais produtos resultantes do catabolismo dos carboidratos presentes no leite pelas BAL (GONZALEZ-DE-LLANO et al., 1996). Os ácidos láctico, acético, butírico, cítrico, fumárico, glicônico, itacônico, kójico, málico, propiônico, succínico e tartárico, dentre outros (CARVALHO et al., 2005) contribuem para as características de textura, sabor e inocuidade dos alimentos fermentados, incluindo os QMA.

A quantificação de ácidos orgânicos, associados aos dados já disponibilizados sobre a dinâmica microbiana em queijos durante o processamento e ao longo da maturação, é possível inferir o estágio de maturação no qual o queijo se encontra (BEVILACQUA e CALIFANO, 1992; LUES, 2000). O motivo de se avaliar essa atividade microbiana dos queijos a partir das análises de quantificação do teor de ácidos orgânicos deve-se ao fato de que uma série de rotas bioquímicas de culturas iniciantes ou NSLAB tem, entre outros metabólitos, os ácidos orgânicos como produto final ou intermediário (HUGENHOLTZ, 1993).

O efeito inibitório e/ou bacteriostático dos ácidos está associado ao valor de pK_a e sua relação com pH do meio externo. As moléculas dos ácidos, para que sejam capazes de permear a membrana celular, devem estar em sua forma não dissociada [HA]. Para que isso ocorra, o pH do meio externo deve ser menor ou igual ao pK_a do ácido. Nessas condições, ocorre um predomínio de moléculas [HA], que ao chegarem ao interior da célula, encontram um pH interno próximo a neutralidade o que faz com que o ácido passe para a forma não dissociada, liberando prótons $[H^+]$ e ânions $[A^-]$. O acúmulo de desses $[H^+]$ força a célula a ativar mecanismos de regulação, bombeando o excesso desses prótons para o meio externo para equilibrar o pH interno e externo da célula. Porém, esse processo requer gasto de ATP; com o passar do tempo, as reservas energéticas da célula são consumidas, ocorre o acúmulo excessivo desses íons no interior, ocasionando na redução drástica do pH interno, o que influencia no funcionamento de diferentes vias metabólicas, sendo as enzimas as primeiras a sofrer os danos causados pela redução do pH. Por isso, os ácidos orgânicos são considerados eficientes substâncias bacteriostáticas, principalmente em baixas temperaturas, além de contribuírem nas propriedades sensoriais em alimentos (HOLZAPFEL et al., 1995).

O ácido láctico (lactato), por exemplo, possui um amplo espectro de inibição sobre diferentes micro-organismos, além de ter aplicações como conservante, acidulante e aromatizante em alimentos (MARTIN, 1996). Em queijos, sua produção por BAL durante o processamento e ao longo da maturação, tem função coadjuvante na inibição do crescimento de micro-organismos deteriorantes/patogênicos (JAY, 2005). O ácido láctico ($pK_a = 3,85$) encontrado na matriz do queijo entra na célula por meio de difusão simples, quando se encontra em sua forma não-dissociada. Ao atingir o interior da célula (pH em torno de 7), o ácido dissocia-se, liberando prótons

[H⁺], o que reduz o pH interno da célula, alterando o metabolismo enzimático da célula.

O ácido acético contribui na composição do aroma e sabor de diferentes queijos. É produzido a partir do catabolismo da lactose ou do citrato por bactérias do gênero *Leuconostoc* spp. e estirpes de *Lactobacillus* heterofermentativos (FOX, 2000). Assim como o lactato, o acetato também apresenta efeito antagonista sobre diferentes micro-organismos. Com valor de pKa=4,76 o acetato encontra-se na forma não dissociada em maiores concentrações no queijo, o que permite um maior fluxo desse ácido para o interior da célula, e assim, alterar o metabolismo normal da célula microbiana. Em um estudo realizado por George et al. (1996) foi verificado que o ácido acético possui um efeito inibitório maior no crescimento de *Listeria monocytogenes* quando comparado com o ácido láctico. Na presença de 2500 mg/L de ácido láctico, pH = 5,0 e temperatura de 20 °C, o tempo de geração foi igual a 2.3 h, enquanto que nas mesmas condições e concentração de ácido de acético (2500 mg/l) não foi observado crescimento da estirpe em estudo. Essa maior eficiência do ácido acético é justificado devido ao seu pKa ser mais próximo ao pH do QMA, o que favorece a sua forma não dissociada.

O ácido propiônico tem papel fundamental na formação das “olhaduras” típicas de queijos suíços, é sintetizado a partir do catabolismo do lactato por espécies do gênero *Propionibacterium* spp. (CALIFANO e BEVILACQUA, 2000). Quanto ao efeito antagonista, por apresentar pKa = 4,9, próximo ao valor do ácido acético, seu mecanismo de atuação também é similar ao ácido acético.

O ácido cítrico está presente naturalmente em pequenas concentrações no leite. Em geral, em queijos, é resultado do metabolismo de fungos, nos quais o piruvato é transformado em acetil CoA, que entra no ciclo de Krebs para a formação do citrato (WALSTRA et al., 2002). Entretanto, micro-organismos como *Lactococcus*, *Leuconostoc* e algumas estirpes de *Lactobacillus*, convertem o citrato em ácido acético, etano, diacetil e acetoina, compostos que favorecem a formação de características organolépticas típicas em queijos (BUFFA et al., 2004).

A microbiota do leite é uma variável importante na presença desses ácidos orgânicos. Dessa forma, a utilização de qualquer tratamento no leite, no intuito de eliminar ou reduzir essa microbiota endógena do leite cru, ocasionará em um perfil de compostos diferentes.

Buffa et al. (2004) quantificaram diferentes ácidos orgânicos (cítrico, pirúvico, málico, láctico, fórmico, acético, propiônico e butírico) durante a maturação em queijos fabricados com leite cru (LC), pasteurizado (LP) e leite submetido a tratamento de alta pressão (PR). Os autores concluíram que a maturação (período) influencia a produção dos ácidos quantificados, pois foram encontrados ácidos em diferentes concentrações durante a avaliação. O ácido láctico foi o principal ácido orgânico encontrado nos três queijos; entretanto, a dinâmica da síntese desse ácido foi diferente entre os tratamentos. O queijo LC apresentou uma menor quantidade de ácido láctico ao término da maturação em relação aos outros. Tal fato justifica-se pela maior população de bactérias NSLAB, geralmente heterofermentativas, as quais utilizam o ácido láctico do meio em diferentes vias metabólicas, para a produção de acetato, propionato e CO₂ (CALIFANO e BEVILACQUA, 2000). Outro dado interessante é a menor quantidade de ácido cítrico no queijo RA; as bactérias NSLAB conseguem metabolizar o citrato como fonte de energia.

Em um trabalho realizado por Marino et al. (2003), ao caracterizar a microbiota do queijo Montasio PDO durante a maturação, verificou-se que a população de *Staphylococcus aureus* reduziu ao longo de 60 dias. O baixo pH e o acúmulo de ácidos orgânicos oriundos do metabolismo da microbiota endógena foram indicados como os principais fatores responsáveis pela diminuição da população de *S. aureus*.

Assim, a produção desses ácidos orgânicos pela microbiota endógena do leite cru principalmente pelas BAL, é de suma importância na inocuidade dos queijos artesanais fabricados com leite cru devido as condições do meio que são criadas, o que impede o crescimento de patógeno/deteriorantes. A alteração do equilíbrio dessa microbiota endógena, altera o perfil de ácidos orgânicos, o que pode resultar em um ambiente que favorece o crescimento de micro-organismos indesejáveis, pondo em risco a saúde do consumidor final.

3.4.3 Enzimas proteolíticas e lipolíticas

Proteólise e lipólise constituem processos bioquímicos de destaque na formação do sabor ao longo da maturação (GONZALEZ et al., 2010). Devido a atividade de proteases e lipases nos substratos disponíveis na matriz dos queijos, são

liberados compostos secundários, que serão utilizados como precursores de outras substâncias, como por exemplo, compostos aromáticos voláteis.

Os principais compostos resultantes da lipólise que interferem no aroma e sabor dos queijos são os ácidos graxos livres. Esses ácidos graxos podem ser precursores de compostos de sabor, pois ao serem metabolizados por micro-organismos, como BAL, resultam em compostos ainda mais aromáticos como metil cetonas, lactonas, ésteres, álcoois e aldeídos (SMIT et al., 2005). A lipólise inicia-se pela ativação de lipases nativas do leite; posteriormente, com a evolução da microbiota do queijo, as lipases e esterases oriundas dos micro-organismos passam a ter maior contribuição nessas reações (HOLLAND et al., 2005). As esterases bacterianas catalisam a hidrólise da gordura previamente hidrolisada, e assim liberando os ácidos graxos livres. Essas mesmas esterases catalisam ainda a síntese de estéres aromáticos a partir de glicerídeos e álcoois, impactando ainda mais o aroma dos queijos (HOLLAND et al., 2005).

A degradação da caseína é o principal fator no desenvolvimento da textura de um queijo pela ação de enzimas proteolíticas com liberação de aminoácidos livres, que podem resultar na formação de aldeídos, ácidos, ésteres e substâncias sulfuradas (CURTIN et al., 2002). Alguns peptídeos oriundos da degradação da caseína, contribuem para a formação de flavour, outros podem conferir um gosto amargo, formando “*off flavours*”.

As enzimas proteolíticas indígenas presentes no leite e no coalho usada para a coagulação das proteínas, associadas às proteinases e peptidases intracelulares liberados depois da lise celular, durante a formação da coalhada, são importantes na hidrólise da caseína durante a preparação do queijo, pois a degradação secundária dos aminoácidos tem impacto importante no desenvolvimento do sabor e textura (SARANTINOPOULOS et al., 2001).

Essas atividades enzimáticas dependem de fatores como pH e disponibilidade de substrato para que ocorram. Além disso, a microbiota endógena deve apresentar maquinaria celular para síntese e expressão dessas enzimas. Um predomínio de determinadas populações, resultará em uma maior intensidade dessas reações. Assim, a diversidade microbiana influencia diretamente essas reações.

Essa afirmativa pode ser corroborada a partir dos resultados obtidos por Albenzio et al. (2001). A pesquisa teve como objetivo avaliar as características microbiológicas e bioquímicas do queijo “Canestrato Pugliese” fabricado a partir de

leite cru (LC) e pasteurizado (LP) de ovelha. Os resultados corroboram a ideia de que os queijos fabricados com LC apresentaram melhores propriedades sensoriais se comparados aos queijos fabricados com LP. Os autores justificam essa diferença devido a uma maior atividade proteolítica e lipolítica em resposta a diversidade microbiana encontrada em queijos fabricados com leite cru. Portanto, a atividade proteolítica e lipolítica da microbiota endógena do leite cru é mais intensa do que aquela do leite pasteurizado, contribuindo para maior intensidade de *flavour*.

3.4.4 Bacteriocinas

Estirpes selvagens precisam resistir a competição com outros micro-organismos para que consigam sobreviver no nicho ecológico no qual estejam inseridos. Assim, os micro-organismos são estimulados a sintetizarem compostos antimicrobianos, dentre os quais, as bacteriocinas (AYAD et al., 2002).

As bacteriocinas são proteínas (ou complexos proteicos) biologicamente ativas que tem ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias gram positivas e espécies relacionadas (MORENO et al, 2000; CLEVELAND et al., 2001). São sintetizadas por BAL a partir de informação ribossomal, e caracterizadas por pequenos peptídeos, são catiônicas, amfifílicas e variam em espectro, atividade, estrutura e massa molecular, estabilidade térmica, atividade em pH e determinantes genéticos (DE VUYST e VANDAMME, 1994; CLEVELAND et al., 2001).

Quanto à sua atividade, as bacteriocinas podem variar conforme a espécie bacteriana sensível e o ambiente em que se encontram (CLEVELAND et al., 2001). De maneira geral, as bacteriocinas podem apresentar efeito bactericida em decorrência da lise celular ou efeito bacteriostático, impedindo a multiplicação celular (DALIE et al., 2010). Segundo Devlignere et al. (2004), as bacteriocinas atuam na membrana plasmática, formando poros na bicamada lipídica, o que causa desbalanço iônico e fluxo de fosfato e potássio.

Espécies de BAL têm sido reconhecidas como os principais micro-organismos produtores de bacteriocinas, dentre as quais: *Lactococcus lactis subsp lactis* (nisina - RODRIGUEZ et al., 2000), *Enterococcus faecium* (enterocina - GONZÁLEZ et al. , 2006), *P. acidolactici* (pediocina- GURIRA e BUYS, 2005). A capacidade de síntese dessas substâncias pelas BAL faz com esses micro-organismos

apresentem um importante papel biológico, no controle do crescimento de patógenos principalmente em alimentos fermentados (CLEVELAND et al., 2001).

Diversos estudos (GURIRA and BUYS, 2005; GONZÁLEZ et al., 2006; GHRAIRI et al., 2008) têm sido realizados para avaliar os efeitos dessas bacteriocinas em patógenos frequentemente encontrados em queijos.

Em estudo realizado por González et al. (2006), no qual avaliou-se a capacidade antagonística de 409 bactérias lácticas isoladas do queijo Genestoso, produzido na região noroeste da Espanha, fabricado a partir da mistura de leites cru de vaca, cabra e ovelha. As cepas previamente isoladas foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Quanto à capacidade antagonista, todas as 409 cepas apresentaram capacidade de inibir o crescimento de um ou mais dos micro-organismos patogênicos testados (*Lactobacillus plantarum* CECT 748, *Listeria monocytogenes* CECT 4031, *Clostridium tyrobutyricum* CECT4011, *Enterococcus faecalis* CECT 481 e *Staphylococcus aureus* CECT 240).

Em outro estudo, Gurira e Buys (2005) caracterizaram a atividade de isolados de espécies de *Pediococcus* obtidos em amostras de queijos. As espécies predominantes foram *P. acidolactici* e *P. pentosaceus* que ao serem submetidas ao antagonismo, demonstraram níveis variáveis de inibição sobre as espécies patogênicas *L. monocytogenes* ATCC 7644 e baixa inibição de *Bacillus cereus* ATCC 1178.

Em estudos *in vitro* realizados por Ghrairi et al. (2008) enterocinas produzidas por *Enterococcus faecium* MMT21 inibiram *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* spp. Os autores citam o potencial destas enterocinas na preservação de alimentos sobre patógenos emergentes. Essa bacteriocina foi caracterizada como termostável o que possibilita a sua utilização em processos industriais que envolvam tratamentos térmicos.

Assim, dada a diversidade microbiana presente no leite cru, e por consequência nos queijos artesanais, a possibilidade de estirpes apresentarem a capacidade de síntese de bacteriocinas é mais elevada, pois esses micro-organismos, por estarem inseridos em uma microbiota complexa, desenvolvem alternativas de adaptação que permitam sua permanência nesse nicho ecológico.

A microbiota endógena dos queijos fabricados com leite cru, por apresentarem uma diversidade microbiana superior a microbiota de queijos

fabricados com leite pasteurizado, tem uma maior probabilidade de apresentar estirpes produtoras de bacteriocinas, e dessa forma, garantir a qualidade e segurança desses produtos.

3.4.5 Aminas bioativas

Aminas bioativas (AB) são compostos nitrogenados de baixo peso molecular que se originam principalmente devido à atividade de enzimas descarboxilases liberadas por micro-organismos descarboxilases positivos em aminoácidos precursores disponíveis. Podem ser classificadas de acordo com o número de grupo aminas, estrutura química, funções fisiológicas e biossíntese (HALASZ et al., 1994; GLORIA, 2005).

Considerando-se a via biossintética, as AB podem ser classificadas como naturais (sintetizadas a partir de precursores, ou seja, biossíntese *de novo*) ou biogênicas (formadas a partir da descarboxilação de aminoácidos livres na matriz devido a ação de enzimas descarboxilases de origem microbiana). Quanto a atividade fisiológica, as AB podem ser denominadas por aminas biogênicas (função neuro ou vasoativas) ou poliaminas (associada a crescimento e renovação celular) (BARDÓCZ, 1995; GLORIA, 2005).

A formação de AB é um processo natural em todos os seres vivos. Podem ser sintetizadas a partir da amônia, hidrólise de compostos nitrogenados, transaminação de aldeídos ou cetonas, decomposição térmica ou descarboxilação de aminoácidos como apresentado na figura 3 (BARDÓCZ, 1995; SHALABY, 1996; KALAC, 2006).

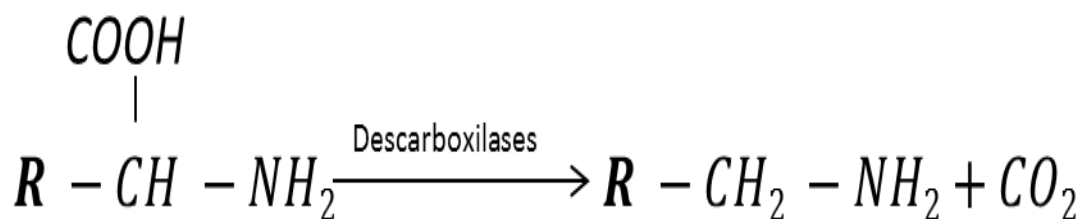


Figura 3. Reação de descarboxilação de aminoácidos.

O processo de descarboxilação de aminoácidos pode ocorrer por duas vias biossintéticas: (1) ação de enzimas descarboxilases endógenas presentes nos alimentos ou por (2) meio de descarboxilases de origem microbiana, associadas a microbiota natural, adicionadas intencionalmente ou contaminante do alimento. Entretanto, a maior fonte dessas descarboxilases é resultado da atividade microbiana (SANTOS, 1996; SHALABY, 1996 FLICK e GRANATA, 2005).

De forma geral, a síntese de aminas biogênicas é uma resposta às condições do meio no qual a bactéria está inserida. A descarboxilação aumenta a sobrevivência ao estresse ácido. Nessa situação, ocorre o consumo de prótons com liberação de CO₂ e síntese de amina, com a finalidade de reequilibrar o pH, propiciando a permanência da célula nesse ambiente

O pH ótimo de ação das descarboxilases está na faixa de 4,0 – 5,5 (SANTOS, 1996). Certos queijos podem alcançar pH nessa faixa durante seu período de maturação, o que naturalmente, inibe o crescimento de vários micro-organismos. As estirpes capazes de expressar descarboxilases, havendo substrato disponíveis, acumulam as AB no meio, a fim de manter um pH no queijo que permita sua permanência. Assim, BAL (principalmente as NSLAB) e outras bactérias endógenas descarboxilases positivas, possuem uma vantagem competitiva no estabelecimento de sua população, sendo essa, uma das estratégias de sobrevivência.

A produção de enzimas do tipo descarboxilases não é uma característica comum a todos os micro-organismos. Entre os diferentes gêneros, podemos destacar *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* (PARENTE et al., 2001; SUZZI e GARDINI, 2003), *Morganella*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* (LAPA-GUIMARÃES, 2004), *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Micrococcoccus* (KALAC, 2006), os quais são descritos como descarboxilases positivos (HALÁSZ et al., 1994).

A produção de aminas por bactérias é afetada pelo pH, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e cofatores, disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares fermentescíveis. A atividade da descarboxilase depende da fase de crescimento do micro-organismo, sendo maior na fase estacionária (GLORIA e VIEIRA, 2007). Assim, de forma resumida, entre as condições necessárias para a síntese dessas aminas, pode-se citar disponibilidade de aminoácidos livres, condições favoráveis ao crescimento microbiano e atividade da descarboxilase (GLORIA e VIEIRA, 2007).

Os gêneros *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, possuem algumas espécies reconhecidas como produtoras de AB. Estes micro-organismos podem estar presentes na própria microbiota natural do leite ou por contaminação, seja durante a obtenção da matéria prima ou durante o processamento e/ou pós-produção.

Em alimentos fermentados, especialmente em queijos, as bactérias gram positivas, como as BAL, são os principais produtores de histamina e tiramina. Nesse tipo de alimento, os metabólitos das BAL tais como ácidos orgânicos, álcoois, peróxidos, acetaldeídos (HOLT et al., 1994) entre outros, se por um lado são úteis como conservantes naturais dos alimentos, podem em determinadas condições, favorecer a atuação das enzimas descarboxilases, e dessa forma, permitir a síntese de AB, o que não seria desejável, pois a ingestão de determinadas aminas podem provocar intoxicação, alergias e dentre outros distúrbios.

Características inerentes aos queijos como acidez e pH, podem propiciar ou inibir a formação de AB. Enquanto o baixo pH estimula a liberação de descarboxilases, a presença de elevadas concentrações de NaCl reduz a síntese de AB. Isso ocorre devido ao efeito inibidor do NaCl no crescimento de micro-organismos, dentre eles, os que apresentam atividade descarboxilase positiva (ROSEIRO et al., 2006).

Fisiologicamente, a síntese de aminas bioativas, é um mecanismo de proteção das bactérias contra ambientes ácidos. Assim, a presença em alimentos fermentados é inevitável, mas em níveis relativamente baixos. Entretanto, teores de determinadas AB (como cadaverina, putrescina e histamina) também podem sugerir contaminação no processo de fabricação, indicando falhas no controle de micro-organismos contaminantes (PAPAVERGOU, 2011).

Em alimentos fabricados com leite cru e/ou em matrizes alimentares caracterizados por elevado conteúdo de proteínas, a concentração de AB é variável. Em queijos, a atividade proteolítica pela microbiota presente ao longo da maturação, disponibiliza uma maior concentração de aminoácidos livres, o que possibilita a formação dessas aminas. Essa influência da proteólise pode ser verificada quando são comparados os teores de aminas biogênicas em queijos de maturação curta e longa (acima de 60 dias). Em queijos que apresentam maturação prolongada, a concentração de AB aumenta de 10 a 2000 vezes, dependendo do tipo de queijo e do tempo de maturação (INNOCENTE e D'AGOSTIN, 2002).

Uma vez que as AB estão presentes em alimentos fermentados, acompanhando-se o tipo e concentração das mesmas, pode-se inferir o estágio de maturação dos queijos.

3.4.5.1 Aminas bioativas como indicador de maturação

A determinação das aminas biogênicas é importante, não só do ponto de vista da sua toxicidade, mas devido ao fato de poderem ser utilizadas como indicadores do grau de contaminação microbiana, grau de frescor ou deterioração dos alimentos (HALÁSZ et al., 1994; SAAID et al., 2009; GIROTO et al., 2010). Em queijos, os teores de aminas aumentam ao longo do processo e maturação; sendo assim, a quantificação de determinadas aminas pode-se relacionar ao período de maturação no qual o queijo se encontra.

A concentração e o tipo de AB em queijos pode estar relacionada (i) a qualidade microbiológica da matéria-prima, (ii) utilização de fermentos, (iii) condições higiênicas praticadas em todo o processo de fabricação e (iv) as condições (umidade e temperatura) e tempo de maturação (NOVELLA-RODRIGUES et al., 2004).

Por ser um alimento rico em proteínas, o queijo apresenta uma diversidade de AB em concentrações variadas. A síntese de AB está associada a condições de pH do queijo, a disponibilidade de substrato e de uma microbiota descarboxilase positiva. Juntos, esses fatores irão direcionar a diversidade e concentração de AB em queijos (HALÁSZ et al., 1994; GLORIA, 2005). Enquanto alguns estudos têm definido o perfil de AB em alguns tipos de queijos como queijo Feta (VALSAMAKI et al., 2000) e tipo Pecorino (SCHIRONE et al., 2011), outros tem sido direcionados para relacionar a concentração/tipo de AB com a qualidade do produto

Os principais gêneros microbianos produtores de aminas em queijos são *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, micro-organismos classificados como BAL, naturalmente presentes em leite cru (FERNANDEZ et al., 2007; BONNETTA et al., 2008). Estirpes da família *Enterobacteriaceae* com destaque para os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* e *Clostridium*, também são capazes de sintetizar AB, sendo a cadaverina uma das principais aminas produzidas por esses micro-organismos.

A formação de aminas por meio da atividade enzimática microbiana depende, dentre outros fatores, da disponibilidade de aminoácidos livres. Dessa forma, a proteólise da caseína durante a maturação dos queijos é um fator crítico em relação à produção de aminas, uma vez que são liberados diferentes aminoácidos, o que permite a reação de formação dessas substâncias (SHALABY, 1996). Por isso, o período de maturação pode influenciar na concentração dessas AB em queijos, já que reações de proteólise ocorrem de forma intensificada ao longo da maturação.

Dentre as AB predominantes em queijo, a tiramina tem sido a mais divulgada nos produtos fabricados com leite cru. A caseína, ao se desdobrada, libera na matriz do queijo, altas concentrações de tirosina, substrato para síntese de tiramina. Assim, a hipótese da tiramina ser a de maior predomínio entre as aminas presentes em queijo, se justifica uma vez que o principal produtor dessa amina são espécies pertencentes ao gênero *Enterococcus* (FERNANDEZ et al., 2007). Considerado NSLAB, esse micro-organismo compõe a microbiota endógena do leite cru, e mantém uma população relativamente elevada durante todo o processo de maturação, seja em estágios iniciais ou após longos períodos (BONNETTA et al., 2008). Portanto, a produção de tiramina tende a ser contínua ao longo da maturação.

Assim, pode-se estabelecer uma relação direta do estágio de maturação no qual o queijo se encontra com a concentração/tipo de AB presentes, visto que as aminas, quando sintetizadas, tendem a acumular-se na matriz alimentar. Como a comunidade microbiana evolui e alterna-se ao longo do tempo, espera-se que as aminas presentes também sejam variadas, já que são reflexo da atividade metabólica do ecossistema existente no queijo.

Em resumo, os tipos e teores de aminas presentes em queijos variam de acordo com o tipo de queijo, tempo e temperatura de maturação, tipos de micro-organismos presentes, atividade proteolítica e condições do processo de fabricação (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2000). O aumento do conteúdo de aminoácidos, provenientes da proteólise, e a atividade descarboxilase bacteriana podem favorecer o aumento de aminas biogênicas em queijos (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2002).

CAPÍTULO 1

MODULAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS, PROTEÓLISE, TEXTURA E COR DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DURANTE A MATURAÇÃO

Physicochemical properties, proteolysis, color and texture modulation of Minas artisanal cheese as result of ripening

Resumo

Avaliou-se o efeito da alteração da microbiota endógena do leite cru nos parâmetros físico-químico, intensidade de proteólise, textura e cor em queijo Minas artesanal em função do processo térmico da pasteurização ao longo da maturação (60 dias). Foram fabricados queijos com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) (63 °C/30 min), de acordo com a tecnologia tradicional estabelecida pela legislação. Dentre os parâmetros físico-químicos, avaliou-se pH, acidez, cloretos, atividade de água, umidade, extrato seco, gordura (GES), cinzas, nitrogênio total. Determinou-se a extensão e profundidade da proteólise. Dentre os parâmetros sensoriais, foram definidos aspectos de textura (TPA) e cor. Os resultados demonstraram que os queijos NP e P apresentam diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao pH, acidez, gordura, GES, umidade e nitrogênio total. Foram verificados maiores índices de proteólise no queijo NP em relação ao queijo P. Em relação a textura, a principal diferença entre os queijos foram nos parâmetros de mastigabilidade (mais alta no queijo P) e coesividade (mais alta no queijo NP). Os resultados para determinação da cor demonstraram que a coloração da casca dos queijos NP e P diferenciaram-se somente no período de 8 dias. Entretanto, a cor da massa do queijo apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) em praticamente todas as coordenadas avaliadas, com destaque a coordenada b^* , utilizada como determinante na indicação do período de maturação. Valores de hue foram similares tanto na casca do queijo quanto na massa; contudo, o índice de saturação (croma) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) na massa de ambos os queijos. Foi possível associar a cor da massa do queijo com o estágio de maturação no qual o queijo se encontra. Dessa forma, conclui-se que

modificação da microbiota endógena do leite cru pela pasteurização resulta em um queijo com propriedades diferentes em relação ao queijo Minas artesanal tradicional.

Palavras chaves: leite cru, microbiota endógena, queijo artesanal.

1. Introdução

Atualmente, o queijo Minas artesanal (QMA), produto tradicional do estado de Minas Gerais, é produzido em cinco regiões tradicionais caracterizadas (Serra da Canastra, Serro, Cerrado, Araxá e Campo das Vertentes), totalizando uma produção anual de 29 mil toneladas, sendo 9.445 produtores envolvidos em sua fabricação (EMATER, 2012).

De acordo com a Lei nº 14.185, 31 de janeiro de 2002, definem-se por QMA “o queijo elaborado na propriedade de origem do leite, a partir do leite cru, hígido, integral e recém-ordenhado, utilizando-se em sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato da prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido”. Atualmente, a coagulação é feita por coalhos de origem microbiana como opção à quimosina.

O FE é soro fermentado resultante da dessoragem dos queijos já salgados, e coletados de um dia para o outro para ser utilizado na produção seguinte. Esse FE contém diferentes grupos microbianos endógenos que direcionam a fermentação desejável, devido a redução do pH, que resulta da produção de ácidos orgânicos, dentre os quais, o ácido lático. Essa microbiota endógena, com destaque para as bactérias ácido lácticas (BAL), além de facilitar a formação da coalhada pela redução parcial do pH, contribui para a maturação dos queijos com os produtos resultantes de seu metabolismo, dentre os quais os compostos aromáticos diacetil, acetoína, acetaldeído (QUINTANS et al., 2008), bacteriocinas (CLEVELAND et al., 2001), proteases (SARANTINOPOULOS et al., 2001) e lipases (SMIT et al., 2005) entre outros, que irão definir as características desse queijo.

O queijo artesanal fabricado em cada região demarcada é diferente em sua microbiota e composição físico-química (SOBRAL, 2012). Durante a maturação, as enzimas endógenas do leite cru e do coalho residual, associadas às enzimas de origem microbiana e do FE atuarão especificamente nos constituintes da massa do queijo, definindo características típicas dos QMA sob os aspectos sensoriais de cor, aroma, sabor e textura (BACHMANN et al., 2011; FOX et al., 2004).

Assim, a microbiota presente no leite cru, associada a fatores climáticos, técnica de fabricação, condições de maturação, raça e alimentação do gado irão definir as características típicas do QMA, de acordo com a região no qual é produzido. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações nos parâmetros físico-químicos, proteólise, textura e cor durante a maturação (60 dias) do queijo Minas Artesanal fabricado com leite cru e com leite pasteurizado, no intuito de verificar o efeito da alteração da microbiota endógena do leite cru sobre as variáveis citadas.

2. Material e Métodos

2.1 Fabricação dos queijos

Os queijos foram produzidos em uma fazenda não cadastrada no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) na cidade de Serro, Minas Gerais. O leite foi obtido por ordenha mecânica. O produtor aplica boas práticas agropecuárias durante o manejo com os animais e boas práticas de fabricação no processamento do leite para produção do QMA.

Para a produção dos queijos, seguiu-se a tecnologia utilizada pelo produtor. Em todas as bateladas, somente o queijeiro realizou todo o processo, no intuito de manter a padronização do processo e minimizar as variáveis que poderiam influenciar nas características dos queijos.

Foram utilizados 40 litros de leite cru para a produção dos queijos não pasteurizados (NP) e 40 litros de leite cru submetidos à pasteurização (63°C/30min) para a produção de queijos pasteurizados (P), de acordo com a figura 1. Adicionaram-se proporções iguais de cloreto de cálcio (20 mL) em ambos os queijos para minimizar as perdas ocasionadas em função da desnaturação das proteínas e liberação do cálcio no soro. Adicionou-se cerca de 7 mL de coalho (marca Bela

Vista[®] - coalho líquido BV – 1:3.000). O tempo médio de coagulação foi de 45 min para o leite cru e 55 min para o leite pasteurizado. O ponto de corte foi observado ao introduzir a faca na massa e esta não apresentar resíduos de leite.

Em seguida, a massa foi cortada utilizando-se uma pá para obtenção de grãos menores e agitada lentamente por 20-30 min para permitir a dessoragem da massa. A prensagem/enformagem é feita por compressão da massa utilizando-se as mãos. A salga a seco é feita utilizando-se sal grosso em um dos lados e após duas horas, o lado posterior. No dia seguinte, o queijo foi retirado das formas para maturação. No presente estudo, os queijos foram embalados e transportados em caixas térmicas para serem maturados no laboratório de Culturas Lácteas (DTA/UFV) por 60 dias. Os queijos foram retirados das embalagens e dispostos em prateleiras para maturação em temperatura ambiente.



Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal.

Foram produzidas quatro peças de queijo por tratamento (pasteurizado/cru) em três diferentes bateladas, totalizando 24 peças de queijo. Os queijos foram submetidos à maturação em temperatura ambiente, sendo amostrados nos tempos 8, 17, 30 e 60 dias de maturação.

2.2 Análises físico-químicas

A determinação do pH do queijo foi realizada pelo método potenciométrico utilizando-se medidor de pH modelo Tecnal, (pH Meter Tec-2, Piracicaba, São Paulo, Brasil) introduzindo-se o eletrodo na parte interna do queijo. A determinação da atividade de água foi realizada, utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T (Decagon Devices, Washington, USA).

As demais análises (acidez, cloretos, gordura, gordura no extrato seco, umidade, extrato seco, cinzas e nitrogênio total) foram realizadas conforme metodologia descrita na Instrução Normativa nº 68 (BRASIL, 2006).

A extensão de maturação foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT), multiplicando o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$EM = \frac{(NSpH4,6)}{NT} \times 100$$

A profundidade de maturação (PM) foi quantificada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) e nitrogênio total (NT), multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$PM = \frac{(NSTCA\ 12\%)}{NT} \times 100$$

2.3 Análise do perfil de textura (TPA)

Para a realização do perfil de textura (TPA), utilizou-se o aparelho Universal de Testes Instron (Modelo 3367, Instron Ltd., Norwood, Massachusetts, EUA).

Foram retirados três cubos (20 x 20 x 20 mm) em cada amostra de queijo e submetido às seguintes condições de análise: probe (55 mm), compressão em dois tempos a uma distância de 10 mm e velocidade de compressão 1mm s⁻¹ (AWAD, 2006). As resistências exercidas pelas amostras foram automaticamente registradas e a adesividade, mastigabilidade, coesividade, e elasticidade foram calculadas pelo software Blue Hill 2.0 (Instron - Norwood, Massachusetts, EUA), utilizando dados de força (N) x tempo (s) obtidos durante os ensaios, em três repetições.

2.4 Análise Colorimétrica

A determinação da cor instrumental foi realizada em colorímetro Konica Minolta, modelo CECF-9, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1986). No espaço colorimétrico CIELAB, definido por L*, a*, b*, a coordenada L* corresponde à luminosidade, a* coordenadas de cromaticidade verde (-) / vermelho (+) e b* às coordenadas de cromaticidade azul (-) / amarelo (+). As medições foram realizadas em três pontos aleatórios, na superfície (casca) e massa interna dos queijos, com três repetições.

Para a determinação do índice de saturação (C*) foi utilizada a equação:

$$C^* = \sqrt{a^2 + b^2}$$

Para a determinação do ângulo de tonalidade (H°) foi utilizada a equação:

$$H^\circ = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right)^2$$

2.5 Análise estatística

Para análise dos resultados, foi utilizado o programa SigmaPlot v.11, no qual foi realizado teste *t* de Student para as variáveis que apresentaram distribuição normal e teste de Mann Whitney para aquelas que não apresentaram tal distribuição. O nível de significância considerado foi de P<0,05. Para verificação de correlação

entre determinadas variáveis, utilizou-se a correlação de Pearson, com o programa já citado.

3. Resultados e discussão

3.1 Características físico-químicas do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

Os resultados dos parâmetros físico-químicos dos queijos Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado ao longo de 60 dias de maturação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Média dos valores e desvio padrão dos parâmetros físico-químico do queijo Minas Artesanal fabricado com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P)

	Tratamento	8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
pH	NP	4,82±0,05 ^a	4,81±0,07 ^a	4,83±0,04 ^a	5,07±0,01 ^a
	P	4,6±0,00 ^b	4,71±0,02 ^a	4,7±0,02 ^b	4,84±0,02 ^b
Acidez (% ác. láctico)	NP	0,67±0,14 ^a	0,86±0,1 ^a	0,89±0,04 ^a	2,96±0,31 ^a
	P	0,79±0,05 ^b	0,83±0,07 ^a	1,01±0,1 ^b	2,37±0,09 ^b
Cloretos (%)	NP	1,15±0,36 ^a	1,59±0,46 ^a	1,64±0,07 ^a	1,75±0,08 ^a
	P	1,21±0,09 ^a	1,61±0,14 ^a	1,62±0,07 ^a	2,45±0,18 ^b
A _w	NP	0,9665±0,01 ^a	0,9561±0,00 ^a	0,9328±0,00 ^a	0,8847±0,01 ^a
	P	0,9639±0,01 ^a	0,9545±0,1 ^a	0,9279±0,01 ^a	0,8417±0,03 ^b
Gordura (%)	NP	30,17±0,26 ^a	32,83±0,75 ^a	36,58±0,97 ^a	37,28±0,86 ^a
	P	27,83±0,26 ^b	31,0±0,32 ^b	35,92±0,92 ^a	38,25±1,47 ^a
Cinzas (%)	NP	5,09±1,24 ^a	4,54±0,66 ^a	4,73±0,29 ^a	4,97±0,38 ^a
	P	4,33±0,37 ^a	5,10±0,69 ^a	5,72±1,90 ^a	6,16±0,57 ^b
Nitrogênio total (%)	NP	3,05±0,10 ^a	3,16±0,11 ^a	3,49±0,09 ^a	3,91±0,13 ^a
	P	2,40±0,08 ^b	2,70±0,10 ^b	2,89±0,06 ^b	3,45±0,13 ^b
Umidade (%)	NP	38,92±0,88 ^a	32,26±4,36 ^a	27,45±0,56 ^a	23,02±0,3 ^a
	P	43,06±1,86 ^b	34,04±3,77 ^a	28,35±1,39 ^a	18,72±0,84 ^b
Extrato seco (%)	NP	61,08±0,88 ^a	67,64±4,36 ^a	72,55±0,56 ^a	76,98±0,3 ^a
	P	56,95±1,86 ^b	65,96±3,77 ^a	71,66±1,39 ^a	81,29±0,84 ^b
GES (%)	NP	49,39±0,65 ^a	48,70±3,87 ^a	50,42±1,00 ^a	48,44±1,22 ^a
	P	48,52±0,97 ^b	46,05±1,35 ^a	50,15±1,96 ^a	46,95±1,11 ^b

Em relação ao pH, observa-se que tanto no queijo NP quanto no queijo P houve um aumento gradativo ao longo da maturação. Houve diferença significativa

($P < 0,05$) nos tempos 8, 30 e 60 dias. As variações de pH em queijos artesanais podem ser justificadas em função de diferentes fatores, no qual destaca-se a quantidade de FE utilizado, assim como do metabolismo da microbiota que compõe esse fermento (MACHADO et al., 2004). Em relação ao queijo tradicional, ou seja, fabricado com leite cru (NP), os valores de pH do presente estudo foram similares aos encontrados por Machado et al. (2004) e Martins et al (2004) para queijos fabricados na região do Serro.

Em relação à acidez, foi observado um aumento nos valores nos queijos NP e P ao longo da maturação. Observa-se uma acidez mais elevada inicialmente no queijo P no tempo 8 dias. Essa maior acidez pode ser justificada em razão da pasteurização, que possivelmente selecionou estirpes termodúricas, no qual se destaca a espécie *Streptococcus thermophilus*, micro-organismos frequentemente utilizado como cultura fermentadora devido a sua alta capacidade acidificante. Ao longo da maturação, ocorre uma inversão da acidez: o queijo NP apresenta uma acidez maior do que o queijo P. Possivelmente, a divide ácido láctico na matriz do queijo.

A concentração de cloretos não diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) entre os queijos NP e P durante 30 dias de maturação, se diferenciando posteriormente aos 60 dias de maturação. Existe uma tendência natural da concentração no teor de cloretos nos queijos ao longo da maturação em função da perda de umidade do queijo para o ambiente. A adição de sal ao queijo tem dentre suas finalidades, dificultar a multiplicação de micro-organismos contaminantes como coliformes e *Escherichia coli*. Porém, micro-organismos como *Staphylococcus aureus* são tolerantes a elevadas concentrações de sal, podendo ter seu crescimento favorecido em detrimento da eliminação de competidores, como BAL (BORGES et al., 2008).

A atividade de água (a_w) apresentou comportamento similar ao de teor de cloretos, no qual os queijos diferiram-se somente após 60 dias de maturação. A evolução da a_w nos queijos NP e P estão apresentadas na figura 2.

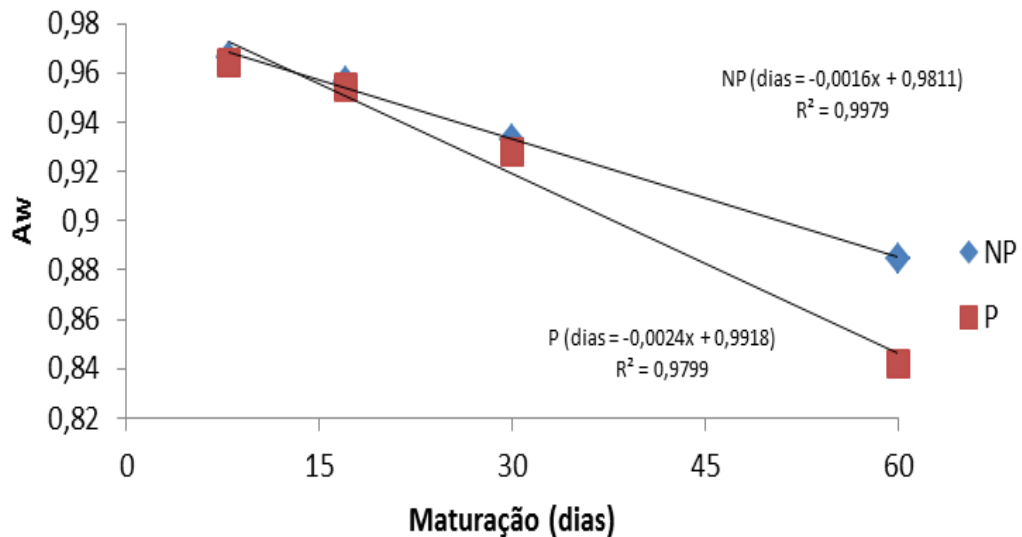


Figura 2. Média dos valores de atividade de água (a_w) dos queijos Minas artesanais fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo dos 60 dias de maturação.

Observa-se um menor valor de a_w no queijo P em relação ao queijo NP. Essa redução possivelmente interfere diretamente na atividade da microbiota do queijo P, visto que quanto menor a a_w , menor a taxa de crescimento microbiano. Resultados similares foram encontrado por Pinto et al. (2011) no qual foram encontrados valores de a_w que variaram de 0,94 a 0,83 durante um período de 7 a 60 dias de maturação em queijos do Serro. Entretanto, não foi possível estabelecer uma correlação ($P > 0,05$) entre a_w e concentração de cloretos pela correlação de Pearson no queijo NP, já no queijo P essa correlação foi verificada ($p = 0,888$). Assim, quanto maior a concentração de cloretos no queijo P, menor a atividade de água.

Para o teor de gordura, ambos os queijos apresentaram diferenças ($P < 0,05$) até 17 dias de maturação. Com 30 e 60 dias de maturação, a porcentagem de gordura apresentou teores similares ($P > 0,05$) em ambos os queijos. Resultados similares foram encontrados por Martins et al. (2004) e Pinto et al. (2011) em queijos artesanais do Serro. Assim como na concentração de cloretos, o aumento no teor de gordura ao longo da maturação é esperado em função da perda de umidade com aumento na proporção dos constituintes sólidos (SOBRAL, 2012). Existe uma correlação linear negativa ($\rho = -0,820$) entre a concentração de gordura com a atividade de água no queijo NP e no queijo P ($\rho = 0,831$), ou seja, quanto menor a atividade de água, maior o teor de gordura. Observa-se uma tendência na diminuição

da umidade ao longo da maturação, o que de fato, aumenta a proporção de sólidos totais.

Considerando-se a gordura no extrato seco (GES), ambos os queijos são classificados como queijos gordos (entre 45 e 59,9% GES) sendo que apresentaram diferenças ($P < 0,05$) nos tempos 8 e 60 dias.

De acordo com a umidade, os queijos são classificados como de média umidade (entre 36 e 45,9% de umidade) com 8 dias e após 30 dias, baixa umidade (até 35,9% de umidade) e também diferiram ($P < 0,05$) nos tempos 8 e 60 dias.

Não houve diferença significativa no teor de cinzas até o tempo de 30 dias entre os queijos NP e P, no qual se diferenciam após 60 dias de maturação. O teor de cinzas do queijo tende a não variar durante a maturação, variando apenas a proporção de acordo com o aumento do extrato seco total.

O conteúdo de nitrogênio total nos queijos NP e P diferiram entre si ($P < 0,05$) em todos os tempos avaliados ao longo da maturação. O comportamento da evolução da concentração de proteínas nos queijos NP e P estão apresentados nas figuras 3.

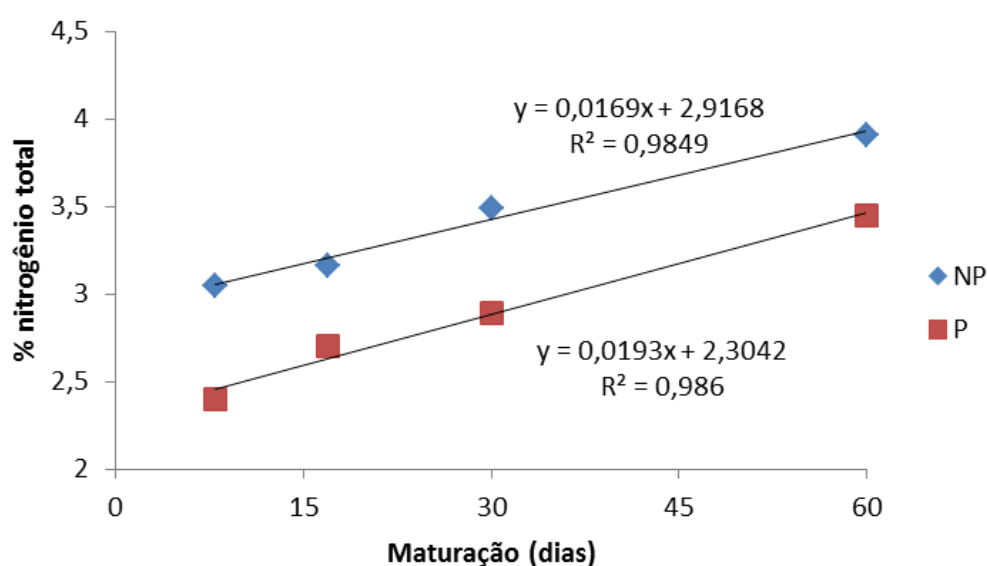


Figura 3. Teor de nitrogênio total dos queijos Minas artesanais fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo dos 60 dias de maturação.

Observa-se um aumento linear da concentração de nitrogênio total ao longo da maturação. Esse aumento, novamente, é justificado em função da perda de umidade por evaporação pela superfície do queijo ao longo da maturação. Além disso, a pasteurização ao provocar alterações nas estruturas das proteínas do soro em

função do calor no qual o leite foi submetido, permite uma maior perda dessas proteínas no soro durante a dessoragem/prensagem e principalmente de cálcio. Apesar da adição de cloreto de cálcio, houve perda de proteínas no queijo P (ROBINSON, 2002).

A extensão e profundidade da maturação permite avaliar o grau de proteólise de queijo, assim como predizer a disponibilidade de peptídeos (extensão) e aminoácidos (profundidade) na matriz. Além disso, um queijo com maior grau de proteólise irá influenciar diretamente na textura do queijo. Os resultados da extensão e profundidade da proteólise nos queijos NP e P estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Evolução da proteólise do queijo Minas artesanal fabricado com leite cru (NP) e pasteurizado (P) durante a maturação (60 dias).

Tratamento		8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
EP (%)	NP	6,93±0,05 ^a	15,15±0,96 ^a	20,63±1,76 ^a	34,11±5,9 ^a
	P	3,39±1,25 ^b	13,46±4,44 ^a	13,13±0,25 ^b	24,16±2,74 ^b
PP (%)	NP	4,78±1,69 ^a	14,22±1,95 ^a	15,82±0,62 ^a	22,81±0,87 ^a
	P	3,75±2,51 ^a	13,66± 1,35 ^a	15,98±0,97 ^a	20,77±0,09 ^a

EP: extensão da proteólise PP: profundidade da maturação

A extensão da proteólise é a relação entre % nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a concentração de nitrogênio total da amostra e é uma resposta da ação proteolítica das enzimas do coalho e naturais do leite sobre a caseína do queijo, liberando peptídeos de alto peso molecular (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1983). Observa-se que houve diferença entre os queijos NP e P ($P < 0,05$) ao longo da maturação, com exceção do tempo 17 dias.

A profundidade da proteólise é resultado da relação entre % nitrogênio solúvel em TCA 12% e a concentração de nitrogênio total da amostra, e permite inferir o grau de formação de substâncias de baixo peso molecular, principalmente aminoácidos, em função da atividade proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados resultantes da degradação da caseína (SILVA et al., 1995).

Não foram observadas diferenças significativas para essa variável entre os queijos ao longo da maturação.

3.2 Perfil de textura do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

O resultado das análises de perfil de textura dos queijos Minas artesanais fabricados com leite cru e leite pasteurizado está apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Média dos valores e desvio padrão do perfil de textura (TPA) em queijo Minas Artesanal fabricado com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P)

Parâmetro	Maturação (dias)	Tratamento	
		NP	P
Adesividade (J)	8	0,0001±0,0000 ^a	-0,0002±0,0000 ^b
	17	0,0001±0,0000 ^a	-0,0001±0,0000 ^b
	30	-0,0001±0,0000 ^a	-0,0001±0,0000 ^a
	60	0,0001±0,0000 ^a	0,0000±0,0000 ^a
Mastigabilidade (N)	8	324,0527±168,0152 ^a	177,509±31,9511 ^b
	17	231,7418±48,8614 ^a	222,4001±76,9772 ^a
	30	371,4770±254,0840 ^a	387,8985±84,3117 ^a
	60	570,9689±81,3364 ^a	895,4347±298,9489 ^b
Coesividade (N)	8	0,7153±0,0544 ^a	0,7008±0,0573 ^a
	17	0,7194±0,0329 ^a	0,6555±0,0484 ^b
	30	0,7164±0,0428 ^a	0,6491±0,0574 ^b
	60	0,6711±0,0688 ^a	0,6447±0,0179 ^a
Elasticidade (mm)	8	7,6066±0,5695 ^a	7,2587±0,5674 ^a
	17	7,2754±0,6876 ^a	6,7767±0,3311 ^a
	30	6,3880±0,6761 ^a	6,3577±0,3159 ^a
	60	5,8219±1,3280 ^a	5,7874±0,3433 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ em uma mesma linha, em cada tempo avaliado.

A adesividade é a quantidade de força requerida para simular o trabalho necessário que sobreponha as forças de atração entre a superfície do alimento e a superfície em contato com este (GUNASEKARAN e AK, 2003). Observa-se uma diferença entre os queijos no até 17 dias de maturação, sendo que posteriormente essa variável apresentou valores similares nos dois queijos.

A mastigabilidade é o esforço necessário para que o alimento sólido esteja pronto para ser deglutido. Indiretamente, pode-se deduzir a dureza do alimento a partir da mastigabilidade, pois quanto maior os valores de mastigabilidade, mais duro é o alimento (FOX et al., 2000).

Assim, observa-se que o queijo NP requer inicialmente uma força maior de mastigação em relação ao queijo P. Porém, ocorre uma inversão ao término de 60 dias, no qual o queijo P requer uma força 56,82% maior do que a exigida para o queijo NP. Possivelmente, essa diferença refere-se a atividade de proteases e lipases endógenas do leite cru, assim como de origem microbiana, reduzidas no queijo P em função da pasteurização, inativando-as. Os resultados de extensão da proteólise (tabela 2) demonstram que o queijo NP apresentou uma proteólise mais intensado que o queijo P nos tempos 8 e 60 dias ($P<0,05$). Contudo, a mastigabilidade do queijo P apresentou menores índices quando comparado ao queijo NP no mesmo período. Dessa forma, observa-se o queijo NP mais “duro” nos primeiros 8 dias e o queijo P mais macio, visto que o complexo caseína- β lactoglobulina é mais hidratável (WALSTRA et al., 2002); já o queijo P apresentou maior dureza a partir de 30 dias até o término da maturação em função da maior perda de umidade ao longo da maturação (tabela 1).

Observa-se uma diferença significativa ($P<0,05$) nos valores de coesividade durante 30 dias de maturação, tendo o queijo NP valores mais elevados, e apresentando similaridade entre os queijos com 60 dias de maturação. A coesividade é a força dos laços internos que compõem o corpo do produto (FOX et al., 2000). O pH pode ter influenciado a coesividade nos queijos, visto que em pH mais elevado, como o observado no queijo NP (tabela 1), tem-se uma maior quantidade de cálcio ligado a caseína, o que resulta em um queijo menos quebradiço (FOX et al., 2004).

A elasticidade é a tendência do queijo a recuperar sua forma original após a remoção de uma força aplicada (FOX et al., 2000). Observa-se uma tendência na redução desses valores ao longo da maturação em ambos os queijos. Essa tendência é justificada em decorrência da proteólise da caseína, principal proteína responsável pela rigidez do queijo (TUNICK et al., 1993).

Não foi observada diferença significativa ($P<0,05$) nos valores obtidos entre os queijos NP e P para essa variável. Ou seja, ambos possuem a mesma capacidade de recuperação de sua altura original quando submetidos a uma tensão.

3.3 Avaliação da cor do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

3.3.1 Cor da casca

Os valores obtidos na determinação das coordenadas de cor (a^* , b^* e L^*) cor para a casca dos queijos NP e P estão apresentados na tabela 4.

Com relação a cor da casca do queijo NP houve uma variação de 5,0 nos valores de L^* entre 8 e 60 dias, enquanto no queijo P essa variação foi de 12,10. O parâmetro L^* indica a luminosidade e refere-se à capacidade do objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de zero a 100. Quanto maior o valor de L^* , mais claro o objeto.

Tabela 4. Média dos valores e desvio padrão das coordenadas L^* , a^* e b^* para determinação da cor da casca do queijo Minas Artesanal fabricado com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P).

Casca	L^*				a^*				b^*			
	8 d	17 d	30 d	60d	8 d	17 d	30 d	60 d	8 d	17 d	30 d	60 d
NP	60,9 ^a ±2,09	58,5 ^a ±3,46	55,4 ^a ±1,65	55,9 ^a ±2,36	6,11 ^a ±0,63	6,26 ^a ±1,51	6,4 ^a ±0,85	6,15 ^a ±1,07	38,4 ^a ±1,16	38,0 ^a ±2,64	37,8 ^a ±0,72	38,7 ^a ±2,91
P	68,5 ^b ±2,12	60,1 ^a ±1,49	57,0 ^a ±0,84	56,4 ^a ±1,9	5,10 ^b ±0,43	7,58 ^a ±0,31	5,88 ^a ±0,49	6,51 ^a ±0,85	36,8 ^a ±1,60	42,9 ^b ±1,60	38,2 ^a ±2,57	38,1 ^a ±1,69

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na coluna.

Assim, a casca do queijo NP com oito dias já apresentava uma coloração mais “amarelada” (figura 4), característica confirmada pelos valores de b^* , no qual valores positivos indicam uma cor mais próxima ao amarelo. O queijo PA com 8 dias apresentou uma cor mais “branca” (figura 4).

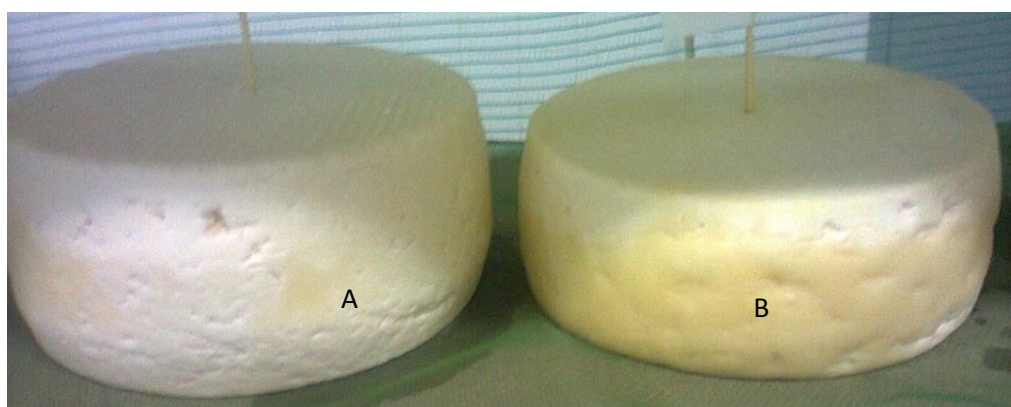


Figura 4. Coloração da casca dos queijos com 8 dias de maturação. A: queijo pasteurizado (P). B: queijo não pasteurizado (NP).

A cor da casca diferenciou os tipos de queijos somente no tempo 8 dias; ao longo de 60 dias de maturação, essa coloração foi estabilizada em ambos os queijos a partir de 17 dias (figura 5).

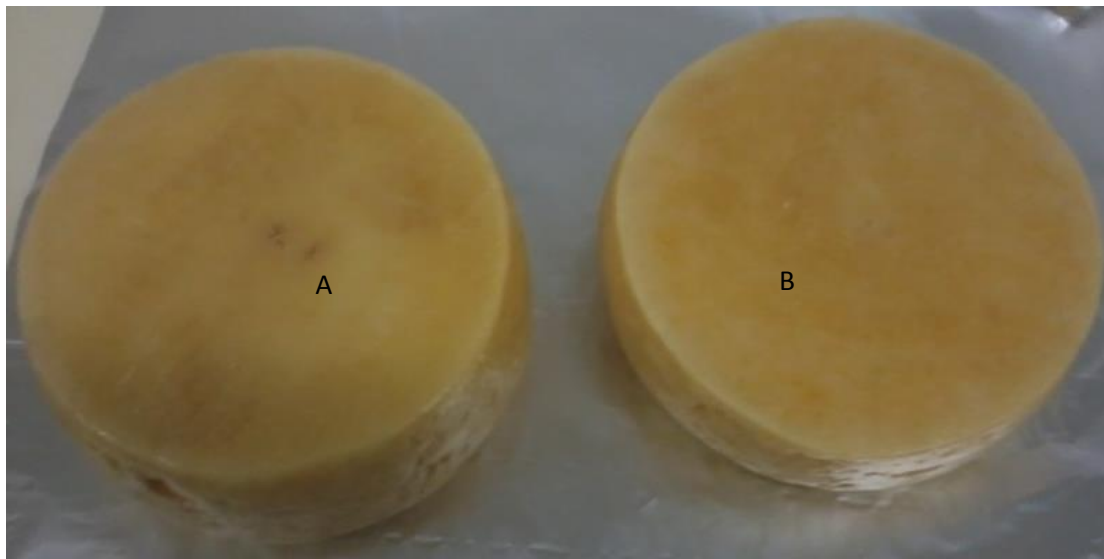


Figura 5. Queijos com 60 dias de maturação. A: queijo pasteurizado (P). B: queijo não pasteurizado (NP).

A cor da casca dos queijos é resultado da interação entre a atividade da comunidade microbiana presente e influência das condições ambientais na qual o queijo é submetido durante a maturação associado a tecnologia de fabricação (GALAUP et al., 2007). As leveduras são os principais micro-organismos presentes na superfície dos queijos. Essa população tende a ser mais estável do que a microbiota bacteriana presente na matriz do queijo, visto que essa região sofre uma menor variação e interferência dos processos físico-químicos que ocorrem durante a maturação, que se inicia após a neutralização parcial do ácido láctico pelas leveduras devido a síntese de produtos alcalinos, difundindo-se pelo interior do queijo, com elevação do pH interno, o que permite o crescimento de bactérias e atividade enzimática (REPS, 1993). Além disso, o crescimento de leveduras evita que a superfície do queijo resseque durante a maturação e influencia diretamente no sabor por meio da produção de ácidos voláteis e de compostos carbonílicos (BRENNAN et al., 2004).

Não existe na literatura estudos sobre a formação da cor da casca em queijos Minas artesanal. Entretanto, bactérias do grupo corineformes e gênero

Brevibacterium, especialmente *Br. Linens* tem sido associado à formação da coloração laranja-avermelhada devido à síntese de carotenóides e outros pigmento (DUFOSSÉ et al., 2005). A cor amarelo-laranja também pode ser formada devido a interações entre bactérias pigmentadas (amarelo) tais como *Arthrobacter arilaitensis* e *Microbacterium* spp., e outros micro-organismos pigmentados tais como estafilococos e *Micrococci* (GALAUP et al., 2007).

3.3.2 Cor da massa do queijo

Os valores obtidos na determinação da cor para cada coordenada na casca estão apresentados na tabela 5. Quanto à cor da massa, houve diferença nos resultados entre os queijos NP e P nas coordenada L* e todos os tempos amostrados. Já para a coordenada a*, as amostras foram estatisticamente diferentes nos tempos oito e 17 dias; houve uma similaridade entre as amostras com 30 dias de maturação, tornando a diferenciar-se com 60 dias. Para a coordenada b* as amostras foram estatisticamente diferentes até o tempo 30 dias, passando a não apresentar diferença estatística com 60 dias de maturação.

Tabela 5. Média dos valores e desvio padrão das coordenadas L*, a* e b* para determinação da cor do interior da massa do queijo Minas Artesanal.

Interio r	L*				a*				b*			
	8 d	17 d	30 d	60 d	8 d	17 d	30 d	60 d	8 d	17 d	30 d	60 d
NP	71,6 ^a ±0,57	70,06 ^a ± 0,46	65,6 ^a ± 0,05	61,1 ^a ±3,17	4,02 ^a ± 0,22	4,39 ^a ± 0,13	4,1 ^a ± 0,3	3,35 ^a ±0,56	35,04 ^a ± 0,16	37,41 ^a ± 0,67	36,4 ^a ± 3,12	37,71 ^a ±1,57
P	74,56 ^b ± 1,8	74,21 ^b ± 0,42	68,26 ^b ± 1,43	65,18 ^b ±1,49	3,56 ^b ± 0,06	4,02 ^b ± 0,1	4,23 ^a ± 0,11	4,17 ^b ±0,25	31,8 ^b ± 0,2	33,22 ^b ± 0,06	32,48 ^b ± 1,82	37,41 ^a ±1,11

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05 na mesma coluna.

De forma geral, o interior da massa do queijo foi diferente entre as amostras avaliadas ao longo da maturação (figura 6). A coordenada a* refere-se à variação das cores entre verde (-) e vermelho (+). Avaliando-se os valores, observa-se uma tendência à coloração vermelha que associado aos valores de +b* (azul (-) / amarelo (+)), explica a coloração “amarelada” observada nos queijos. Essa coloração foi mais intensa nos queijos NP quando comparado com o queijo P.

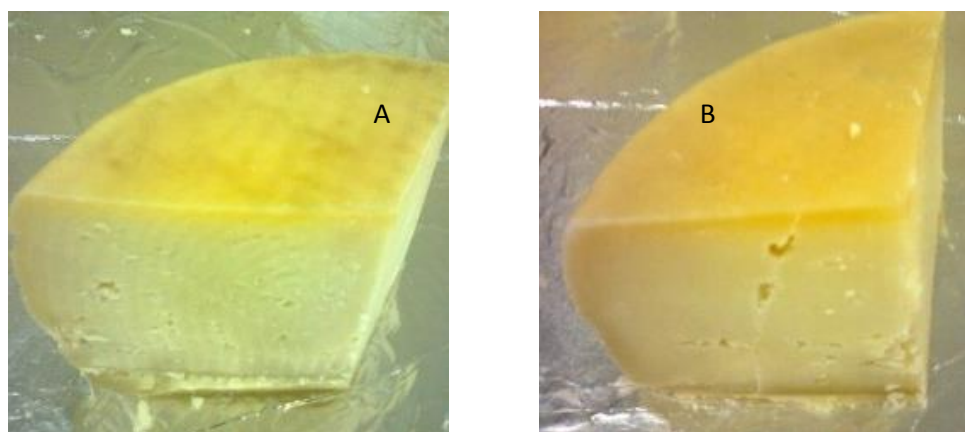


Figura 6. Coloração da massa dos queijos com 30 dias de maturação. A: queijo pasteurizado (P). B: queijo não pasteurizado (NP).

A maturação de um queijo pode ser associada às coordenadas de cor, no qual se observa um decréscimo dos valores de L^* e aumento dos valores de a^* e b^* (Rohn e Jaros, 1996). Como a coordenada b^* refere-se a faixa de cor azul (-) a amarela (+), tem se associado seus valores ao período de maturação no qual o queijo se encontra (GIZINGER et al., 1999).

Atualmente, sabe-se que o período mínimo de maturação no qual os QMA fabricados na região do Serro devem ser submetidos são de 17 dias. Esse período foi estabelecido a partir de resultados de diversos trabalhos, no qual considerou-se a microbiologia do queijo, sendo o *S. aureus* o micro-organismo indicador. Assim, com 17 dias de maturação, o QMA do Serro atenderia aos padrões da legislação vigente para esse micro-organismo.

Se considerássemos a cor, como um parâmetro coadjuvante na indicação da idade do QMA, pelos dados obtidos teríamos um queijo considerado “maturado” com valores de coordenada b^* em torno de 37 (figura 7). Vale ressaltar que o QMA fabricado com leite pasteurizado, atingiu esse mesmo índice somente após 60 dias de maturação, o que sugere que os queijos P possuem uma velocidade de maturação mais lenta quando comparada com o queijo NP.

Os queijos fabricados com leite cru, sem tratamento térmico são conhecidos pela maior diversidade microbiana quando comparados aos queijos fabricados com leite pasteurizado. Com isso, a interação microbiana existente permite a ocorrência de uma maior atividade metabólica, o que influencia diretamente nas características

sensoriais, incluindo a cor/maturação desses queijos (GRAPPIN e BEUVIER, 1997; IRLINGER e MOUNIER, 2009).

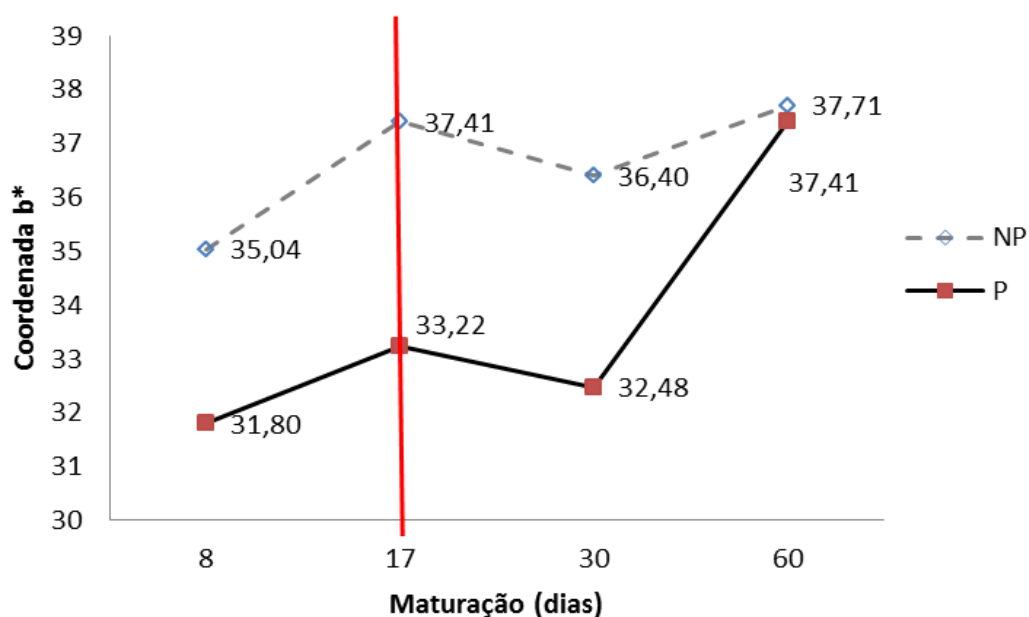


Figura 7. Indicação do período de maturação do queijo QMA de acordo com a cromaticidade da coordenada b*. NP: não pasteurizado. P: pasteurizado. A linha vermelha delimita o período mínimo de maturação.

O queijo NP ao alcançar valor de b* igual a 37,41 pouco variou até atingir 60 dias de maturação, ao contrário do queijo P, que teve um aumento de 4,19 no valor dessa coordenada. Possivelmente, a relação ecológica existente na microbiota do queijo NP estabiliza-se e mantém seu metabolismo durante o tempo de maturação, o que não ocorre no queijo P.

Observa-se que no tempo 30 dias, houve uma pequena redução nos valores de b* em ambos os queijos. Tal fato pode ser justificado por alguma variação da cor nos pontos amostrados, visto que com 60 dias houve uma certa elevação nos índices quando comparados com o tempo de 17 dias.

3.3.3 Índice de saturação (C*) e ângulo de tonalidade (H°)

A relação entre as coordenadas a* e b* estão apresentadas nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6. Índice de saturação (%) dos queijos não pasteurizado (NP) e pasteurizado (P) ao longo do período de maturação.

C*		Maturação (dias)			
		8	17	30	60
Casca	NP	38,93 ^a ±3,85	38,56 ^a ±4,72	38,34 ^a ±2,61	39,25 ^a ±3,21
	P	37,24 ^a ±5,10	43,56 ^b ±2,53	38,68 ^a ±2,23	38,66 ^a ±1,78
Centro	NP	35,27 ^a ±0,89	37,67 ^a ±0,83	36,63 ^a ±3,27	37,86 ^a ±1,61
	P	32,00 ^b ±0,88	33,46 ^b ±0,31	32,75 ^b ±3,27	37,64 ^a ±1,12

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ em uma mesma coluna.

Tabela 7. Ângulo de tonalidade (em graus) dos queijos não pasteurizado (NP) e pasteurizado (P) ao longo do período de maturação.

H°		Maturação (dias)			
		8	17	30	60
Casca	NP	88,60 ^a ±0,01	88,5±0,01	88,4±0,01	88,6±0,01
	P	88,95±0,01	88,26 ^a ±0,01	88,69±0,0	88,37±0,01
Centro	NP	89,29 ^a ±0,00	89,26±0,00	89,32 ^a ±0,00	89,59 ^a ±0,00
	P	89,33 ^a ±0,00	89,21±0,00	89,07 ^a ±0,00	89,39 ^a ±0,00

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ em uma mesma coluna.

O índice de saturação (Croma, C*) mede o grau de saturação da cor. O valor de C* é igual a 0 no centro e aumenta conforme aumenta a distância em relação ao centro (KONICA MINOLTA, 1998). Valores de C* mais elevados estão relacionados a pigmentação ou saturação de cor. Assim, observa-se que os valores de C* na casca de ambos os queijos divergiram somente com 17 dias de maturação. Porém, esse mesmo índice diferiu entre os queijos até 30 dias de maturação em relação a coloração da massa.

Já o ângulo de tonalidade (hue, H°) específica a tonalidade da cor e é expresso em graus, onde 0° está no eixo +a*, 90° no eixo +b*, 180° no eixo -a* , e 270° no eixo -b* (KONICA MINOLTA, 1998). Associadas ao índice de saturação, o valor de hue resulta em um vetor que direcionam para a determinação da cor e intensidade do objeto em estudo.

Assim, de acordo com a figura 8, observa-se que os queijos NP e P estão situados praticamente na mesma faixa de cor após 60 dias de maturação.

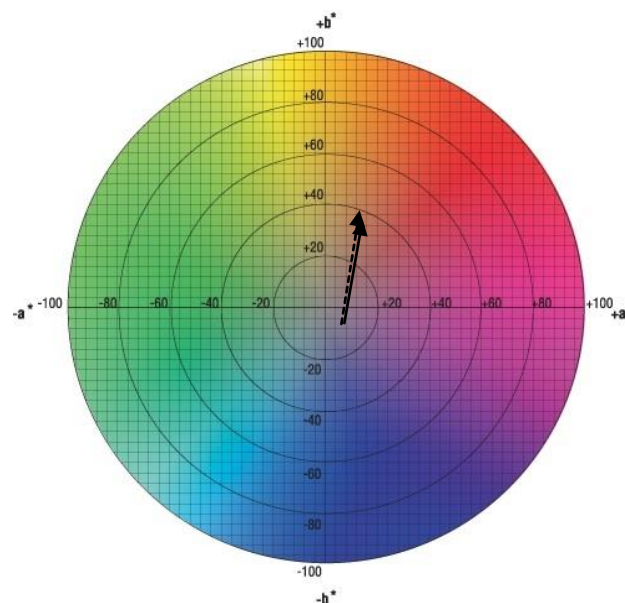


Figura 8. Diagrama de cromaticidade de a^*b^* para a cor da casca dos queijos minas artesanais fabricados com leite cru (NP) e com leite pasteurizado (P).

4. Conclusão

De acordo com os resultados do presente estudo, a pasteurização influenciou em diferentes parâmetros analisados, tanto físico-químicos quanto nos atributos de cor e textura. O queijo feito com leite pasteurizado resultou em um produto com propriedades distintas em diferentes variáveis analisadas em relação ao queijo tradicional, fabricado com leite cru, mas que ao longo da maturação, tendeu-se a aproximar das características do queijo tradicional. Possivelmente, a adição do fermento endógeno ao leite pasteurizado foi capaz de restaurar alguns grupos microbianos eliminados pelo tratamento térmico, que ao longo da maturação vão se reequilibrando dentro de uma dinâmica ecológica peculiar em cada tipo de queijo.

5. Referência bibliográficas

BACHMANN, H.P.; FRÖHLICH-WYDER, M.T.; JAKOB, E.; ROTH, E.; WECHSLER, D. Raw Milk cheeses. In: **Encyclopedia of dairy science**. London: Elsevier, p. 652-660, 2011.

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e

genes associados: revisão. **BOLETIM CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

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

BRENNAN, N.M.; COGAN, T.M.; LOESSNER, M.; SCHERER, S. Bacterial surface-ripened cheeses. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, 2004. v 2: Major Cheese Groups, 3 ed., pp 199-225.

CIE - Commission Internationale de l'Éclairage. Colorimetry. Vienna: CIE publication, 2 ed., 1996.

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. 01-20, 2001.

DUFOSSÉ, P.L.; GALAUP, P.; CARLET, E.; FLAMIN, C.; VALLA, A. Spectrocolorimetry in the CIE $L^*a^*b^*$ color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheese. **Food Research International**, v. 38, p. 919-924, 2005.

EMATER-MG. Empresa de assistência técnica e extensão rural de Minas Gerais. **Programa Queijo Minas Artesanal/Mapa do Queijo**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc/intranet/upload/MAPA_QUEIJO/mapa%20do%20araxá.doc>. Acesso em: 23 junho 2012.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H.; COGAN, T.M.; GUINEE, T.P. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, v.1, 617, p. 2004.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of Cheese Science**. Aspen Publishers, Inc. Gatherburg, Maryland, 544p. 2000.

GALAUP, P.; GAUTIER, A.; PIRIOU, Y.; DE VILLEBLANCHE, A.; VALLA, A.; DUFOSSÉ, L. First pigment fingerprints from the rind of French PDO red-smear

ripened soft cheeses Epoisses, Mont d'Or and Maroilles. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 373-378, 2007.

GINZINGER, W.; JAROS, D.; LAVANCHY, P.; ROHM, H. Raw milk flora affects composition and quality of Bergkase. Physical and sensory properties, and conclusions. **Lait**, v. 79, p. 411–421, 1999.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.

GUNASEKARAN, S.; AK, M.M. **Cheese Rheology and Texture**. CRC Press LLC, Florida, 2003, 637p.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, p. 142-148, 2009.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; JUNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do serro, minas gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(4), p. 516-521, out.-dez., 2004.

MARTINS, J.M.; PINTO, M.S.; BARBOSA, T.S.; OLIVEIRA, F.A.; OLIVEIRA, R. C.; RIBEIRO JUNIOR, J.I.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L.L.F. Características físico-químicas dos queijos artesanais produzidos na região do Serro. **Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 339, v. 59, p. 331-334, 2004.

KONICA MINOLTA. Konica Minolta Sensing. Japan 1998. **Precise color Communication: Color control from perception to instrumentation**. Disponível em: < <http://www.konicaminolta.com>>. Acesso em: 10 jul. 2013.

OLIVO, R.; GUARNIERI, P. D.; SHIMOKOMAKI, M. Fatores que influenciam na cor de filés de peito de frango. **Revista Nacional da Carne**, n. 289, p. 44-49, 2001.

QUINTANS, N. G.; BLANCATO, V.; REPIZO, G.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. **Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications**, p. 65-88, 2008.

REPS, A.. Bacterial surface-ripened cheeses. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. London: Chapman & Hall, 1993. Volume 2: Major Cheese Groups, 2 ed., pp 137-172.

RAPHAELIDES, S. N.; GRIGOROPOULOU, S.; PETRIDIS, D. Quality attributes of pariza salami as influenced by the addition of mechanically deboned chicken meat. **Food Quality and Preference**, v. 9, n. 4, p. 237-242, 1998.

SARANTINOPOULOUS; P.; ANDRIGHETTO, V.; GEORGALAK, M. D.; R. E. A M. C, LOMBADI. A Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International of Dairy Journal**, v. 11, p. 621-647, 2001.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M., Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 591-610, 2005.

SOBRAL, D. **Efeitos da nisina na contagem de Staphylococcus aureus e nas características do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2012. 100p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

TUNICK, M.H; MALIN, E.L.; SMITH, P.W.; SHIEH, J.J.; SULLIVAN, B.C.; MACKEY, K.L.; HOLSINGER, V.H. Proteolysis and rheology of low fat and full fat Mozzarella cheeses prepared from homogenized milk. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.12, p. 3621-3628,1993.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES MICROBIOLÓGICAS DURANTE A MATURAÇÃO E SUAS IMPLICAÇÕES NA INOCUIDADE DO QUEIJO MINAS ARTESANAL

*Changes in microbiology during ripening and implications in food safety of Minas
artisanal*

Resumo

Avaliou-se a qualidade microbiológica do queijo minas artesanal (QMA) fabricado com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P; 63 °C/ 30 min) e suas implicações na segurança microbiológica desse produto com 17 dias de maturação, período preconizado para esse tipo de queijo produzido na região do Serro, Minas Gerais. Foram fabricados queijos experimentais (NP e P) em três bateladas a fim de avaliar a população microbiana durante 60 dias de maturação e também parâmetros físico-químicos (pH, acidez, cloretos, atividade de água e umidade) e concentração dos seguintes ácidos orgânicos: láctico, acético, cítrico, propiônico e butírico. Foram quantificados os seguintes grupos microbianos *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, coliformes totais e *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, mofos e leveduras e mesófilos aeróbios. Avaliou-se também a presença de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Todos esses micro-organismos também foram avaliados no leite cru, pasteurizado e soro fermento utilizados para fabricação do QMA. Os resultados indicaram diferença significativa entre os queijos avaliados ao longo da maturação nos parâmetros físico-químicos acidez e pH. Para as variáveis cloreto e atividade de água, os queijos apresentaram similaridade durante os 60 dias de maturação. Nas análises microbiológicas, os resultados demonstram que os queijos NP e P são semelhantes quantitativamente aos grupos microbianos avaliados, com exceção de *S. aureus*, no qual foi observada a persistência desse micro-organismo em até 30 dias de maturação no queijo P; no queijo NP, não foi detectado esse micro-organismo no tempo 30 dias. Não foram detectados *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em nenhuma das amostras. Entretanto, houve diferença significativa ($P < 0,05$) na concentração dos ácidos cítrico, propiônico e acético. A concentração de ácido láctico diferiu somente no tempo 30 dias. O ácido butírico não apresentou diferença ($P > 0,05$) entre os queijos NP e P. Os resultados obtidos nesse estudo sugerem que a pasteurização do leite

elimina uma importante microbiota endógena presente no leite cru. Porém, a adição do fermento endógeno repõe parcialmente essa microbiota, visto que em função da concentração de sal, baixo pH e acidez elevada no fermento, seleciona previamente estirpes resistentes a essas condições. A adição desse fermento também influenciou na concentração dos ácidos orgânicos em função da inserção dessa microbiota endógena. A alteração da microbiota endógena do leite cru interfere na diversidade microbiana do queijo artesanal uma vez que o pH e acidez diferiram ($P < 0,05$) entre os queijos NP e P e consequentemente nos processos bioquímicos que ocorrem ao longo da maturação. Isso poderia implicar em uma redução da garantia da inocuidade do QMA, visto que a espécie *S. aureus* manteve-se por mais tempo no queijo P em relação ao queijo NP. O queijo NP atendeu a legislação para *S. aureus* ao atingir 20 dias de maturação, ao passo que o queijo P necessitaria de 35 dias para ser comercializado com segurança.

Palavras-chaves: metabolismo microbiano, ácidos orgânicos, inocuidade, maturação.

1. Introdução

O principal objetivo da pasteurização do leite ou de qualquer outro tratamento térmico é a eliminação de possíveis patógenos presentes no leite (GRAPPIN e BEUVIER, 1997). Entretanto, parte da microbiota láctica endógena responsável pelas propriedades sensoriais nos queijos também é eliminada com o tratamento térmico, o que pode resultar em um produto final diferente daquele produzido com leite cru. Reduzir ou eliminar essa microbiota endógena pode interferir diretamente na bioquímica do queijo ao longo do processo de maturação.

Diferentes pesquisadores têm verificado diferenças entre os queijos fabricados com leite cru daqueles cujo leite foi submetido a algum tratamento térmico (pasteurização, termização) (GRAPPIN e BEUVIER, 1997; ALBENZIO et al., 2001; BUFFA et al., 2001; BUFFA et al., 2004). Observa-se que queijos fabricados com leite cru tendem a apresentar um sabor mais intenso e geralmente maturam mais rápido do que os queijos fabricados com leite pasteurizado devido a inativação de enzimas e eliminação da microbiota sensível ao calor (GRAPPIN e BEUVIER, 1997).

O queijo minas artesanal (QMA) é uma iguaria nacional, tendo “o modo de fazer artesanal” tombado como Patrimônio Cultural Imaterial pelo Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN) em 15 de maio de 2008. A lei estadual nº. 14.185, de janeiro de 2002, em seu Art. 3º define o QMA como “o queijo elaborado, na propriedade de origem do leite, à partir do leite cru, hígido, integral e recém ordenhado, utilizando-se na sua coagulação somente a quimosina de bezerro pura e no ato do prensagem somente o processo manual, e que o produto final apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido” (MINAS GERAIS, 2002).

Tradicionalmente, o QMA é produzido a partir do leite cru, sem nenhum tratamento térmico, adicionado de coalho e fermento endógeno (FE). Esse soro fermento é resultado da dessoragem dos queijos já salgados, e coletados de um dia para o outro para ser utilizado na produção de queijos seguinte. Esse FE contém diferentes grupos microbianos que direcionam a fermentação desejável devido a redução do pH, que resulta da produção e acúmulo de ácidos orgânicos, dentre os quais, o ácido láctico. (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; ORNELAS, 2005; BORELLI, 2006; NOBREGA, 2007).

Por meio da quantificação de ácidos orgânicos em queijos, é possível monitorar a atividade e crescimento da microbiota, em função desses compostos serem importantes fontes secundária de carbono para a maioria dos micro-organismos (CALIFANO e BEVILACQUA, 2000; LUES, 2000; WITTHUHN et al., 2004). Os ácidos orgânicos têm sido utilizados como parâmetros de classificação para diferentes tipos de queijos, em modelos para prever o tempo de maturação em função da síntese e acúmulo ao longo da maturação (LUES, 2000; BUFFA et al., 2004).

Além de contribuírem nas propriedades sensoriais dos queijos, os ácidos orgânicos influenciam na inocuidade desse tipo de produto, principalmente de queijos fabricados com leite cru, devido ao efeito inibitório (bactericida ou bacteriostático) no crescimento de micro-organismos. Pode-se citar dentre os diferentes ácidos orgânicos, os ácido láctico e acético, pois apresentam um amplo espectro de inibição sobre diferentes micro-organismos, além ter aplicações como conservante, acidulante e aromatizante em alimentos (HOLZAPFEL et al., 1995).

Em queijos, a produção desses ácidos por BAL durante o processamento e ao longo da maturação, tem função coadjuvante na inibição do crescimento de micro-organismos deteriorantes/patogênicos (JAY, 2005).

O incremento de BAL pela adição do FE ao leite para fabricação dos queijos artesanais constitui, dessa forma, um fator adicional na segurança desses queijos, pois por meio de compostos já citados, especialmente ácido lático e bacteriocinas, são capazes de inibir o crescimento da população de contaminantes e/ou patógenos.

Staphylococcus aureus tem sido relatado como o principal patógeno associado a surtos de intoxicação devido ao consumo de QMA. A possibilidade de expressão de genes associados a síntese de enterotoxinas o torna o principal alvo no estabelecimento de níveis de segurança para o consumo seguro desse tipo de produto.

No intuito de garantir a comercialização de um produto seguro, a legislação federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), portaria n° 146 de 07 de março de 1996, regulamentada pela Resolução n° 07, 28 de novembro de 2000, indica um período mínimo de maturação de 60 dias. Porém, o QMA é comercializado em quase toda sua totalidade com um período de maturação de cerca de 10 dias, tempo inferior ao exigido pela legislação. Assim, a venda de QMA seria considerada ilegal, dentro dos parâmetros da legislação federal.

No intuito de regularizar a situação comercial do QMA, o Decreto estadual n° 44864 de 01 de agosto de 2008, que altera o regulamento da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de queijo Minas Artesanal, permitiu a disponibilidade para comercialização dos QMA com períodos inferiores a 60 dias de maturação. Atualmente, após pesquisas realizadas, os períodos mínimos de maturação atualmente praticados são de 17 dias para o QMA do Serro (MARTINS, 2006) e 22 dias para o QMA da Canastra (DORES, 2007). *Staphylococcus aureus* tem sido determinante na definição do período seguro de maturação dos QMA (MARTINS, 2006; DORES, 2007).

A legislação federal, em razão da grande importância desse produto na economia familiar, em 15 de dezembro de 2011, publica a Instrução Normativa (IN) n° 57, que discute a possibilidade de redução do período de maturação inferior a 60 dias desde que sua segurança seja cientificamente comprovada (BRASIL, 2011).

Dessa forma, são necessárias informações sobre o metabolismo e evolução microbiana durante a maturação, assim como das relações da microbiota láctica endógena do leite cru com a microbiota comensal do queijo para corroborar a

hipótese de que o queijo fabricado com leite cru pode ser inócuo, desde que implementadas boas práticas de fabricação (BPF) e o período mínimo de maturação dos QMA.

2. Material e métodos

2.1 Fabricação dos queijos

Os queijos foram produzidos em uma fazenda não cadastrada no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) na cidade de Serro, Minas Gerais. O leite foi obtido por ordenha mecânica. O produtor aplica boas práticas agropecuárias durante o manejo com os animais e boas práticas de fabricação no processamento do leite para produção do QMA.

Para a produção dos queijos, seguiu-se a tecnologia utilizada pelo produtor. Em todas as bateladas, somente o queijeiro realizou todo o processo, no intuito de manter a padronização do processo e minimizar as variáveis que poderiam influenciar nas características dos queijos.

Foram utilizados 40 litros de leite cru para a produção dos queijos não pasteurizados (NP) e 40 litros de leite cru submetidos à pasteurização (63°C/30min) para a produção de queijos pasteurizados (P), de acordo com a figura 1. Adicionaram-se proporções iguais de cloreto de cálcio (20 mL) em ambos os queijos para minimizar as perdas ocasionadas em função da desnaturação das proteínas e liberação do cálcio no soro. Adicionou-se cerca de 7 mL de coalho (marca Bela Vista® - coalho líquido BV – 1:3.000). O tempo médio de coagulação foi de 45 min para o leite cru e 55 min para o leite pasteurizado. O ponto de corte foi observado ao introduzir a faca na massa e esta não apresentar resíduos de leite.

Em seguida, a massa foi cortada utilizando-se uma pá para obtenção de grãos menores e agitada lentamente por 20-30 min para permitir a dessoragem da massa. A prensagem / enformagem é feita por compressão da massa utilizando-se as mãos. A salga a seco é feita utilizando-se sal grosso em um dos lados e após duas horas, o lado posterior. No dia seguinte, o queijo foi retirado das formas para maturação. No presente estudo, os queijos foram embalados e transportados em caixas térmicas para serem maturados no laboratório de Culturas Lácteas (DTA/UFV) por 60 dias. Os queijos foram retirados das embalagens e dispostos em prateleiras para maturação em temperatura ambiente.



Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal.

Foram produzidas quatro peças de queijo por tratamento (pasteurizado/cru) em três diferentes bateladas, totalizando 24 peças de queijo. Os queijos foram submetidos à maturação em temperatura ambiente, sendo amostrados nos tempos 8, 17, 30 e 60 dias de maturação.

2.2 Análises microbiológicas

Para análise do leite (cru e pasteurizado) e fermento endógeno (FE), foram coletadas amostras (1 mL) e diluídas em 99 mL de tampão fosfato esterilizado. Para análises dos queijos, foram coletadas 25 g de cada amostra nos tempos 8, 17, 30 e 60 dias de maturação e diluídas em 225 mL de tampão fosfato esterilizado. Após

homogeneização em um stomacher, por 2 minutos, foram preparadas diluições seriadas, e as amostras foram plaqueadas em duplicatas em diferentes meios seletivos para enumeração dos seguintes micro-organismos: aeróbios mesófilos em Plate Count Agar (PCA) a 37 °C/48 h; lactobacilos em De Man Rogosa Sharp (MRS) a 30 °C e 37 °C/48 h; lactococos em ágar M17 a 30 °C e 37 °C/48 h; *Staphylococcus aureus* em placa Petrifilm® Staph Express a 37 °C/24 h; enterococos em ágar bile esculina a 37 °C /48 h; *Enterobacteriace* em agar VRBG a 37 °C/24 h, coliformes totais e *E. coli* em placas Petrifilm™ EC a 35 °C/24-48 h; mofos e leveduras em Potato Dextrose Agar (PDA) a 25 °C/ 3 a 5 dias (DOLCI et al., 2008; SCHIRONE et al., 2011). A presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* foram realizadas por meio de utilização dos kits Reveal® (Neogen) para cada micro-organismo, de acordo com o protocolo do fabricante.

2.3 Análises físico-químicas

Foram realizadas de pH, acidez titulável (% de ácido láctico), umidade e concentração de cloretos de acordo com Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A determinação da atividade de água foi realizada, utilizando-se medidor digital Aqualab modelo CX2T (Decagon Devices, Washington, USA).

2.4 Análise de ácidos orgânicos

2.4.1 Preparo das amostras

Para extração dos ácidos orgânicos foram pesados 0,5 g de queijo em um béquer de 100 mL, adicionado de 50 mL de água destilada a 50 °C e homogeneizado com bastão magnético com máxima agitação por 5 min. Posteriormente, o béquer com amostra foi transferido para um banho maria a 50 °C com agitação suave. Uma parcela de 10 mL da solução foi retirada com seringa abaixo da superfície para evitar a inclusão de gordura. Uma unidade filtrante de 0,45 U de poro, 13 mm (Millipore) foi anexada ao conector da seringa, e então, o líquido foi então forçado a passar pelo filtro. O filtrado foi congelado a -20 °C e posteriormente, analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (MULLIN e EMMONS, 1997).

2.4.2 Análises de ácidos orgânicos

Os ácidos láctico, acético, butírico e propiônico foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando os padrões da marca Sigma – Aldrich®. A análise foi realizada em cromatógrafo marca SHIMADZU, modelo SPD-10A VP acoplado ao Detector Ultra Violeta (UV) utilizando-se um comprimento de ondas 210 nm e coluna C18. A fase móvel utilizado foi uma solução de água com 1% de ácido fosfórico até pH de 4,5 (MULLIN e EMMONS, 1997).

2.5 Análise estatística

Para análise dos resultados microbiológicos e físico-químicos, foi utilizado o programa SigmaPlot v.11, no qual foi realizado teste t de *Student* para as variáveis que apresentaram distribuição normal e teste de Mann Whitney para aquelas que não apresentaram tal distribuição. O nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

As análises estatísticas na quantificação dos ácidos orgânicos foram realizadas no pacote estatístico *Statistical Analysis System*® versão 9,0, procedimento GLM (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), licenciado pela Universidade Federal de Viçosa. A confiabilidade da equação do modelo quadrático obtido foi avaliada verificando-se a falta de ajustamento do modelo (FAJ), o coeficiente de determinação R^2 , o resultado das análises de variância (ANOVA) e o nível de significância estatístico ($P < 0,05$) pelo teste de Fisher (F). As médias dos resultados foram posteriormente submetidas ao teste de Tukey. Os coeficientes do modelo foram analisados empregando o procedimento GLM e REG (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e o nível de significância dos coeficientes da regressão foi obtido pelo teste de Student (*t*).

3. Resultados e discussão

3.1 Resultados das características microbiológicas e físico-química do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

A pasteurização do leite, além de eliminar patógenos que por ventura estejam presentes, também elimina parte da microbiota lática endógena, interferindo na ecologia microbiana do queijo e nos processos bioquímicos decorrentes ao longo da maturação.

Na tabela 1, observa-se uma redução ou eliminação nas contagens de micro-organismos avaliados após o procedimento de pasteurização.

Tabela 1. Análise microbiológica do leite cru, pasteurizado e soro fermento utilizados na fabricação dos queijos não pasteurizados e pasteurizados.

	MRS 30°C	MRS 37°C	M17 30°C	M17 37°C	Ent	Entero	E C	CT	SA	ML	MA
LC	4,53 ± 0,24	4,64 ± 0,33	4,95 ± 0,28	4,87 ± 0,57	4,07 ± 0,98	5,45 ± 0,15	0,0 0	1,61 ± 0,49	2,52 ± 0,21	2,99 ± 0,55	4,75 ± 0,49
LP	2,66 ± 0,44	2,94 ± 0,69	3,91 ± 0,34	3,43 ± 0,35	1,65 ± 1,18	0,00	0,0 0	0,00	1,53 ± 0,08	2,21 ± 0,54	3,28 ± 0,37
FE	6,25 ± 0,68	6,61 ± 0,56	6,69 ± 0,62	7,63 ± 0,18	4,76 ± 1,52	5,30 ± 0,60	0,0 0	2,74 ± 0,95	3,48 ± 1,6	4,55 ± 0,73	5,19 ± 0,4

LC= leite cru; LP= leite pasteurizado; FE= fermento endógeno; Ent= *Enterococcus*; Entero= Enterobactérias; EC=E. coli; CT=Contagem total; AS= *S. aureus*; ML=Mofos e Leveduras; MA= mesófilos aeróbios. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

Os resultados demonstram que a pasteurização foi eficiente ao eliminar os grupos de coliformes, *E.coli* e *Enterobacteriaceae*. A presença de *S. aureus*, e baixos níveis de mofos e leveduras e mesófilos aeróbios no leite pasteurizado podem ser justificados por contaminação pós-processamento, visto que o tratamento térmico (63°C/30 min) no qual o leite foi submetido eliminaria esses micro-organismos. Assim, esse resultado sugere falhas no processamento do leite a ser utilizado na fabricação do queijo.

O crescimento bacteriano pós-pasteurização, principalmente dos grupos de BAL pode ser explicado pela diversidade de espécies termodúricas como *Streptococcus thermophilus*, algumas espécies do gênero *Lactobacillus* e *Enterococcus*, além de grupos microbianos com capacidade de esporulação presentes no leite cru, e assim, serem capazes de persistir no leite pós-pasteurização (JAY, 2006)

A utilização de fermentos endógenos, técnica conhecida por “*backslopping*”, na produção de queijos artesanais, insere na microbiota endógena do leite, uma diversidade de micro-organismos que irão contribuir na formação das propriedades sensoriais típicas dos queijos fabricados com leite cru (DEMARIGNY et al., 2011). A microbiota presente nos soros fermentos artesanais pode auxiliar na inferência sobre a qualidade microbiológica da matéria prima utilizada na produção dos queijos, assim como da aplicação de boas práticas de fabricação (HERREROS et al., 2003).

Dessa forma, uma matéria prima de má qualidade, com predomínio da microbiota contaminante sobre a microbiota láctica endógena, e a não observância de cuidados básicos de higiene durante o processamento, resultará em um soro fermento de má qualidade, que ao ser utilizado em uma próxima batelada, influenciará diretamente na qualidade dos queijos.

Observa-se que a microbiota do FE é quantitativamente superior a microbiota do leite cru e pasteurizado. Assim, a adição desse FE no leite pasteurizado poderia repor parcialmente a microbiota endógena do leite cru. O FE ao apresentar acidez e pH mais alto (tabela 2) em relação ao leite cru e pasteurizado, seleciona uma microbiota mais resistente à essas condições, o que irá influenciar de maneira diferente na microbiota do queijo cru e pasteurizado.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos do leite cru (LC), pasteurizado (LP) e fermento endógeno (FE) utilizado na fabricação do queijo Minas artesanal.

	pH	acidez ¹	NaCl (%)
LC	6,28	0,48±0,05 ^a	---
LP	6,36	0,41±0,07 ^a	---
FE	4,91	1,26±0,14 ^b	7,19

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

O FE também pode ser um veículo de inoculação de contaminantes. Se o queijo fabricado para coleta do FE apresentar níveis de contaminantes elevados, uma parte desses micro-organismos irá compor a microbiota do FE. Dessa forma, como a pasteurização elimina grande parte da microbiota endógena do leite cru, esses contaminantes, ao serem adicionados ao leite pasteurizado encontram uma microbiota totalmente modificada, no qual seus principais competidores e /ou inibidores, como BAL foram eliminados. Assim, patógenos como *S. aureus* teriam

uma maior capacidade de sobrevivência, pois as condições físico-químicas e microbiológicas favorecem tal situação (tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos do queijo Minas artesanal fabricado com leite cru (NP) e pasteurizado (P) durante a maturação (60 dias).

	Tratamento	8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
pH	NP	4,82±0,05 ^a	4,81±0,07 ^a	4,83±0,04 ^a	5,07±0,01 ^a
	P	4,6±0,00 ^b	4,71±0,02 ^a	4,7±0,02 ^b	4,84±0,02 ^b
Acidez (% ác. láctico)	NP	0,67±0,14 ^a	0,86±0,1 ^a	0,89±0,04 ^a	2,96±0,31 ^a
	P	0,79±0,05 ^b	0,83±0,07 ^a	1,05±0,1 ^b	2,37±0,09 ^b
a _w	NP	0,9665±0,01 ^a	0,9561±0,00 ^a	0,9328±0,00 ^a	0,8847±0,01 ^a
	P	0,9639±0,01 ^a	0,9545±0,1 ^a	0,9279±0,01 ^a	0,8417±0,03 ^b
Umidade (%)	NP	38,92±0,88 ^a	32,26±4,36 ^a	27,45±0,56 ^a	23,02±0,3 ^a
	P	43,06±1,86 ^b	34,04±3,77 ^a	28,35±1,39 ^a	18,72±0,84 ^b
NaCl (%)	NP	1,15±0,36 ^a	1,59±0,46 ^a	1,64±0,07 ^a	1,75±0,08 ^a
	P	1,21±0,09 ^a	1,61±0,14 ^a	1,62±0,07 ^a	2,45±0,18 ^b

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Quanto ao pH, observa-se uma aumento contínuo no queijo P; já no queijo NP a variação do pH é constante, com leve aumento no período de 60 dias de maturação. A acidez (% ácido láctico) apresentou diferença significativa ao longo da maturação em ambos os queijos, exceto no tempo 17 dias. Tanto no queijo NP quanto no queijo P, observa-se um aumento da acidez durante a maturação.

O aumento do pH durante a maturação dos queijos pode ser em decorrência da degradação proteica proveniente da atividade de proteases endógenas do leite e possivelmente, presente no FE, com formação de compostos alcalinos (MARTINS et al., 2004). Além disso, a síntese de compostos aromáticos como diacetil, acetoína em decorrência do metabolismo do citrato por bactérias heterofermentativas também poderia contribuir no aumento do pH da matriz do queijo. Descarboxilases de origem microbiana também poderia atuar sobre diferentes aminoácidos, dando origem a compostos aminados que também neutralizariam o baixo pH, criando condições mais favoráveis para o desenvolvimento da microbiota.

Os resultados das análises de a_w e cloretos indicam similaridade estatística entre os queijos, no qual se diferem no tempo 60 dias. Existe uma relação entre a concentração de cloretos no queijo com a_w; quanto maior o teor de sal presente na massa do queijo, menor será a quantidade de água livre, ou seja, o queijo irá

apresentar uma menor a_w (FURTADO, 1991). Entretanto, essas variáveis relacionam-se de forma diferente com o período de maturação no queijo NP (Figura 2) e no queijo P (figura 3).

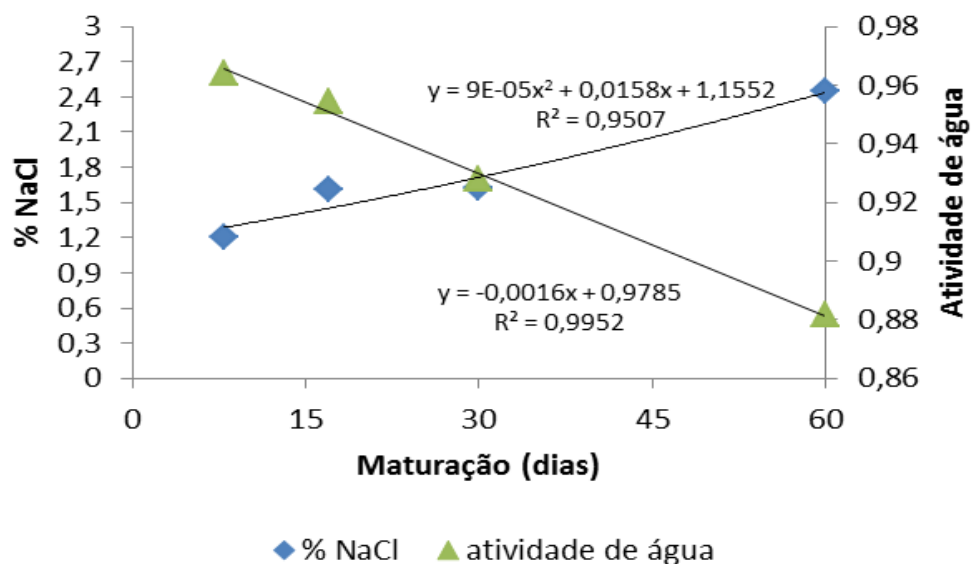


Figura 2. Correlação da concentração de NaCl e atividade de água com o período de maturação no queijo não pasteurizado (NP).

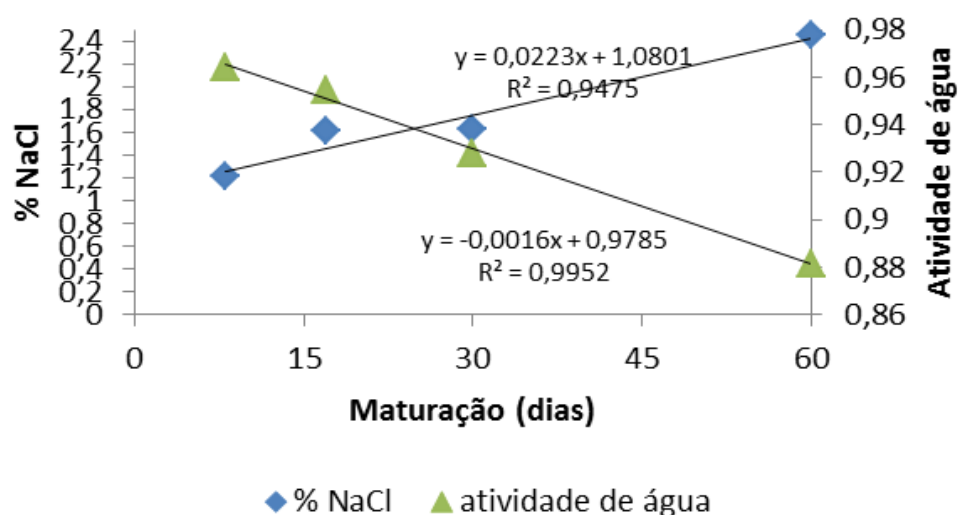


Figura 3. Correlação da concentração de NaCl e atividade de água com o período de maturação no queijo pasteurizado (P).

A concentração de cloretos no queijo NP relaciona-se com o período de maturação em função de uma equação quadrática no qual 95% de sua concentração é

explicada pelo quadrado da variação do tempo. Já no queijo P, observa-se uma tendência linear em função do período de maturação. A a_w em ambos os queijos apresentam um comportamento linear, com forte correlação com o estágio de maturação em ambos os queijos. Assim, tanto no queijo NP quanto no queijo P, o efeito dessas variáveis (cloretos e a_w) possivelmente atua de forma similar, no crescimento microbiano, visto que só foi possível observar diferença significativa ($P<0,05$) ao término do período de maturação.

O sal, além de influenciar no sabor dos queijos, regula a atividade enzimática e seleciona a microbiota, evitando o crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deterioradores.

Os valores de umidade diferiram entre os queijos ($P<0,05$) nos tempos 8 e 60 dias, sendo estatisticamente similares nos tempos 17 e 30 dias. Contudo, ao longo da maturação, a umidade do queijo NP reduziu 15,9 % enquanto o queijo P teve uma perda de umidade de 24,34 % no mesmo período (60 dias). O teor de umidade afeta diretamente a consistência do queijo além de influenciar nas características físico-químicas que ocorrem durante a maturação.

O queijo fabricado com leite cru apresenta uma proteólise mais intensa quando comparado a queijos fabricados com leite pasteurizado em função da presença de enzimas endógenas do leite, assim como da atividade microbiana preservada em função da não aplicação da pasteurização. A hidrólise de ligações peptídicas originam grupos iônicos que competem pela água disponível na matriz do queijo, resultando em uma maior retenção dessa água, e por consequência maior umidade. Isso justifica a menor perda de umidade do queijo NP em relação ao queijo P.

As variáveis físico-químicas, associadas a condições como disponibilidade de substrato entre outros parâmetros, pode influenciar diretamente na microbiota dos queijos, tanto em queijos artesanais fabricados com leite cru quanto aqueles fabricados com leite pasteurizado. A eliminação de BAL, ativação-inativação de enzimas endógenas do leite e desnaturação de proteínas são algumas alterações ocasionadas ao leite quando submetido a algum tratamento de calor, como a pasteurização. Esses efeitos podem variar de acordo com o tipo de queijo fabricado (GRAPPIN e BEUVIER, 1997) em função da matéria prima utilizada, fermento entre outros.

As tabelas 4, 5 e 6 apresentam os resultados quantitativos nas contagens de diferentes grupos de BAL nos queijos NP e P ao longo de 60 dias de maturação.

Tabela 4. Contagem de *Lactobacillus* spp em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d		17d		30d		60d	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
NP	7,54±0,24 ^a	8,04±0,04 ^a	7,39±0,78 ^a	7,26±0,39 ^a	6,67±0,16 ^a	7,03±0,27 ^a	5,58±0,21 ^a	5,54±0,29 ^a
P	8,08±0,88 ^a	8,61±0,08 ^b	7,25±0,45 ^a	7,04±0,41 ^a	6,39±0,47 ^a	6,73±0,71 ^a	5,61±0,13 ^a	5,57±0,03 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 5. Contagem de *Lactococcus* spp em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d		17d		30d		60d	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
NP	8,05±0,12 ^a	8,01±0,18 ^a	9,70±0,35 ^a	8,14±0,57 ^a	8,39±3,73 ^a	10,07±1,70 ^a	7,70±0,62 ^a	6,73±0,05 ^a
P	8,21±0,49 ^a	8,27±0,59 ^a	9,53±0,51 ^a	8,55±0,70 ^a	9,99±0,77 ^a	9,99±0,78 ^a	7,52±0,06 ^a	6,49±0,09 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 6. Contagem de *Enterococcus* spp em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d	17d	30d	60d
NP	7,14±0,30 ^a	6,09±0,39 ^a	5,42±0,65 ^a	3,09±0,61 ^a
P	6,92±0,38 ^a	6,19±0,61 ^a	5,54±1,04 ^a	2,48±0,18 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Os resultados demonstram que o queijo fabricado com leite pasteurizado não se diferenciou quantitativamente das contagens dos grupos de BAL do queijo fabricado com leite cru. Tal resultado pode ser justificado pela reposição parcial da microbiota do leite cru devido a adição do FE ao leite pasteurizado.

Esse mesmo resultado foi observado nas contagens de mesófilos aeróbios e mofos e leveduras (tabela 7 e tabela 8).

Tabela 7. Contagem de mesófilos aeróbios em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d	17d	30d	60d
NP	7,82±0,32 ^a	7,46±0,78 ^a	6,86±0,21 ^a	5,35±0,44 ^a
P	7,13±0,72 ^a	6,87±0,29 ^a	6,56±0,29 ^a	5,27±0,37 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Tabela 8. Contagem de mofos e leveduras em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d	17d	30d	60d
NP	6,70±0,40 ^a	6,36±0,24 ^a	5,54±0,84 ^a	5,01±0,36 ^a
P	4,64±1,19 ^a	5,45±0,04 ^b	5,87±0,37 ^a	5,27±0,24 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$.

Apesar da similaridade quantitativa entre os queijos em estudo, não se pode afirmar que a microbiota dos queijos NP e P sejam similares, visto que houve uma seleção da microbiota com a inclusão do tratamento térmico na tecnologia tradicional da fabricação do QMA. E tal fato pode ser justificado se considerarmos os valores de pH e acidez encontrados em ambos os queijos. Essas duas variáveis, entre outros parâmetros, podem estar associados ao tipo de micro-organismo presente na microbiota dos queijos. Como os resultados foram estatisticamente diferentes em cada tempo avaliado, praticamente ao longo de todo o período de maturação (60 dias), infere-se que o metabolismo microbiano também seja diferente entre os queijos NP e P, o que indiretamente, sugere a ocorrência de uma microbiota diferente em cada um dos queijos.

A adição do FE no leite pasteurizado possivelmente repôs quantitativamente parte da microbiota eliminada no processo de pasteurização. Entretanto, como o FE apresenta características físico químicas capazes de selecionar micro-organismos resistentes a condições extremas (baixo pH e elevada acidez) e a pasteurização de selecionar micro-organismos termodúricas, infere-se que as espécies que compõe a microbiota do queijo P sejam diferentes das espécies que compõe a microbiota do queijo NP.

Essa similaridade quantitativa também foi observada na contagem de micro-organismos contaminantes (tabela 9, 10 e 11).

Tabela 9. Contagem de Enterobacteriaceae em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d	17d	30d	60d
NP	6,23±0,05 ^a	4,99±1,14 ^a	2,61±0,36 ^a	3,49±0,57 ^a
P	6,87±0,77 ^a	4,86±0,59 ^a	2,81±0,64 ^a	2,71±0,10 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05 na mesma coluna.

Tabela 10. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8d		17d		30d		60d	
	CT	EC	CT	EC	CT	EC	CT	EC
NP	2,87±1,61 ^a	0,00 ^a	2,44±0,66 _a	0,00 ^a	0,00	0,00	0,00	0,00
P	4,29±0,55 ^a	1,30±0,00 _a	2,98±0,47 _a	1,04±1,06 ^a	0,00	0,00	0,00	0,00

CT: Coliformes totais EC: *E. coli* Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05 na mesma coluna.

Ao analisarmos a microbiota contaminante dos queijos NP e P ao longo de 60 dias de maturação em temperatura ambiente, observa-se uma redução contínua desses grupos microbianos, sendo essa redução mais acentuada nos queijos NP. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, observa-se uma contagem maior de coliformes totais e *E. coli* nos queijos P quando comparados aos queijos NP no tempo 8 dias. *E. coli* somente foi considerada ausente nas amostras a partir de 30 dias de maturação. Com 17 dias de maturação, ambos os queijos atendiam aos padrões da legislação para queijos fabricados com leite cru. Com 30 dias de maturação, essa microbiota contaminante foi reduzida a índices abaixo dos níveis avaliados em ambos os queijos.

A contagem inicial de coliformes termotolerantes no leite apresentou baixos níveis; esses mesmos micro-organismos desaparecem rapidamente durante a maturação do queijo NP. Provavelmente esse efeito inibitório é devido ao acúmulo de ácido láctico produzido pela BAL endógena do leite, assim como daqueles micro-organismos presentes no FE (MARINO et al., 2003). Resultado similar foi obtido nas contagens de *E.coli* no queijo P.

Esse resultado demonstra a importância da maturação como fator preponderante no estabelecimento da inocuidade dos QMAs. Observa-se a redução,

com total eliminação dessa microbiota contaminante ao final de 30 dias de maturação. Porém, ressalta-se que no NP não foi observado a presença de *E.coli*, que apesar de presente no queijo P em baixa quantidade, o micro-organismo persistiu por 17 dias até ser eliminado da microbiota do queijo.

O perfil competitivo das BAL inseridas em nichos complexos como os queijos, exige que estes micro-organismos viabilizem sua colonização e domínio populacional em relação a outros grupos que também são capazes de sobreviver (IRLINGER e MOUNIER, 2009). Produção de ácido lático, outros ácidos orgânicos e bacteriocinas (TOPISIROVIC et al., 2006) sintetizados pelas BAL auxiliam no estabelecimento dessa população nos queijos artesanais, e por consequência, na inibição do crescimento de populações contaminantes e/ou patogênicas.

Em queijos fabricados com leite cru, a espécie *Staphylococcus aureus* é considerada um dos principais contaminante. Com relação a essa espécie, as contagens microbiológicas estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11. Contagem de *Staphylococcus aureus* em queijos fabricados com leite cru e leite pasteurizado

	8d	17d	30d	60d
NP	4,42±0,66 ^a	2,79±0,47 ^a	0,00 ^a	0,00
P	4,64±1,19 ^a	3,14±0,12 ^a	2,48±0,85 ^b	0,00

NP: queijo não pasteurizado P: queijo pasteurizado. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ na mesma coluna.

Atualmente, o período mínimo de maturação indicado para os queijos fabricados na região do Serro são de 17 dias (IMA, 2013). Esse período foi estabelecido a partir de resultados encontrados por Martins (2006), uma vez que *S. aureus* permaneceu por um período maior em contagens acima da legislação ao longo da maturação no QMA da região do Serro. Ou seja, com 17 dias de maturação, o QMA atinge ao padrão estabelecido pela legislação ($2 \log \text{ufc.g}^{-1}$) para contagem de *S. aureus*. Diante dos resultados do presente estudo, o queijo feito com leite cru, que manteve sua microbiota endógena inalterada, está numericamente ($2,79 \text{ ufc g}^{-1}$) mais próximo ao exigido pela legislação do que o queijo fabricado com leite pasteurizado (1 ciclo log acima do nível permitido). Os resultados ainda indicam que o queijo P manteve uma contagem de *S. aureus* por 30 dias de maturação, ao contrário do

queijo NP, que nesse mesmo tempo de maturação, indicava níveis não detectados desse micro-organismo.

S. aureus, quando presente em queijos pode expressar genes produtores de toxinas. Entretanto, de acordo com Nout (1994), *S. aureus* é inibido na presença de microbiota endógena do queijo; a presença e atividade de BAL (produção de ácido láctico, o que ocasiona na redução do pH do meio) reduzem consideravelmente a expressão dos genes relacionados a síntese de enterotoxinas. De fato, o sistema que regula a expressão de síntese de toxinas é o mesmo que regula a produção de proteínas de membrana em respostas a condições ácidas do meio para adaptação (NOVICK e GEISINGER, 2008). Denominado sistema *agr*, sua ativação é regulada pelo mecanismo *quorum sensing*, no qual moléculas sinalizadoras denominadas auto-indutoras, ao atingirem determinada concentração em resposta a uma elevada densidade populacional (cerca de 10^6 células) são percebidas por receptores específicos que irão desencadear a ativação de um sistema de expressão ou não de genes em resposta as condições ambientais (NOVICK e GEISINGER, 2008). Esse sistema é dependente de densidade populacional. Assim, a acidez do queijo provavelmente estimula a síntese das proteínas de superfície, ao invés de ativar os genes relacionados a produção de toxinas, pois dessa forma, permitiriam a manutenção da população de *S. aureus* na presença de BAL.

Os modelos de regressão ajustados ao comportamento da população de *S. aureus* nos queijos NP e P estão apresentados na figura 4.

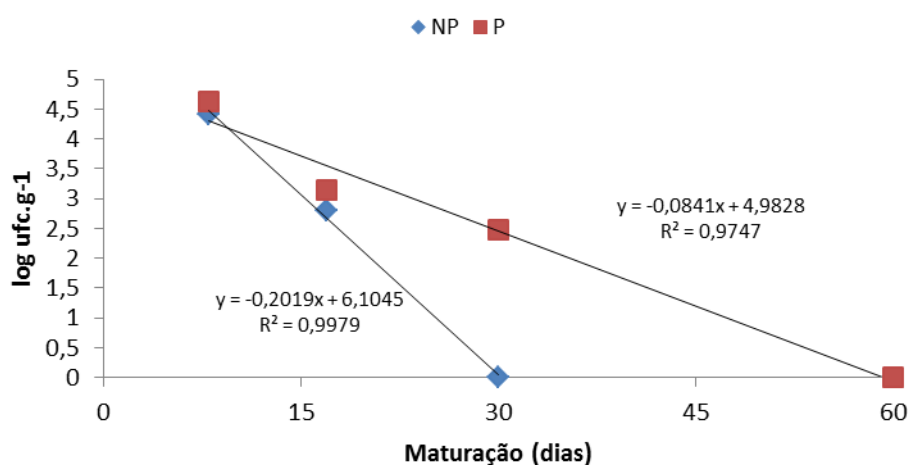


Figura 4. Evolução da população de *S. aureus* no queijo não pasteurizado (NP) e pasteurizado (P) durante a maturação (60 dias).

Assim, de acordo com a equação de regressão (figura 4), considerando-se o limite de 10^2 ufc g⁻¹, o queijo NP estaria próprio para o consumo com 20 dias de maturação ao passo que o queijo P necessitaria de 35 dias de maturação para ser comercializado dentro dos padrões exigidos pela legislação.

3.2 Quantificação de ácidos orgânicos em queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado.

Os resultados da quantificação dos ácidos láctico e acético em queijos Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Concentração de ácidos lácticos e acético (mg/kg⁻¹) em queijos fabricados com leite cru (NP) e com leite pasteurizado (P) ao longo do período de 60 dias de maturação.

Dias	Lático		Acético	
	NP	P	NP	P
8	187,38±19,76 ^a	176,38±14,40 ^a	28,90±19,93 ^a	57,27±36,78 ^b
17	175,39±3,36 ^a	194,69±6,85 ^a	192,01±38,30 ^a	259,56±61,42 ^b
30	143,31±5,91 ^a	219,58±2,10 ^b	326,06±12,00 ^a	330,30±15,15 ^s
60	251,99±68,82 ^a	232,61±1,14 ^a	641,04±85,33 ^a	519,60±97,42 ^b

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$ em uma mesma linha, dentro de um mesmo tratamento.

Observa-se que a concentração de ácido láctico no queijo NP apresentou uma redução ao longo da maturação (17 e 30 dias) elevando-se no tempo 60 dias. Já no queijo P, a concentração de ácido láctico eleva-se durante todo o período de maturação. Essa variação pode ser explicada em função (1) do metabolismo heterofermentativo da microbiota NSLAB, no qual a lactose possivelmente foi convertida em outros compostos como ácido fórmico, acético ou (2) a microbiota endógena pode ter utilizado o ácido láctico em diferentes vias metabólicas, como a produção de propionato, acetato ou CO₂ (CALIFANO e BEVILACQUA, 2000).

Em relação à concentração de ácido acético, observa-se baixa concentração de nos queijos, sendo estatisticamente superior no queijo P. Aos 30 dias de maturação, os queijos NP e P apresentaram concentração similar de ácido acético; com 60 dias, a concentração desse ácido no queijo NP é cerca de 23 % superior em relação ao queijo P. A concentração de ácido acético pode indicar o grau da atividade

heterofermentativa da microbiota (BOUZAS et al., 1993). Como não houve diferença na contagem microbiana dos grupos de BAL avaliados, acredita-se que haja diferença na composição das espécies que estejam presentes na microbiota de cada queijo. Assim, considerando-se a concentração de ácido acético, infere-se que até 30 dias, a microbiota do queijo P possua uma proporção de espécies heterofermentativas maior do que o queijo NP. Após 30 dias de maturação, possivelmente houve alguma sucessão ecológica no queijo NP, visto que a concentração de ácido acético foi maior do que no queijo P.

O ácido láctico (lactato) e ácido acético (acetato) possuem um amplo espectro de inibição sobre diferentes micro-organismos. O ácido láctico ($pK_a = 3,85$) encontrado na matriz do queijo entra na célula por meio de difusão simples, quando se encontra em sua forma não-dissociada. Ao atingir o interior da célula (pH em torno de 7), dissocia-se, liberando prótons $[H^+]$, o que reduz o pH interno da célula, alterando o metabolismo enzimático da célula. De forma similar, o ácido acético ($pK_a=4,76$) encontra-se na forma não dissociada em maiores concentrações no queijo, o que permite um maior fluxo desse ácido para o interior da célula, e assim, alterar o metabolismo normal da célula microbiana. Assim, esses ácidos possuem papel fundamental na inocuidade de queijos fabricados com leite cru.

Os resultados da quantificação dos ácidos cítricos, propiônico e butírico estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Concentração de ácidos cítrico, propiônico e butírico (mg/kg^{-1}) em queijos fabricados com leite cru (NP) e com leite pasteurizado (P) ao longo do período de 60 dias de maturação.

Dias	Cítrico		Propiônico		Butírico	
	NP	P	NP	P	NP	P
8	23,85±3,62 ^a	9,45±0,44 ^b	14,97±8,38 ^a	31,64±1,83 ^b	5,53±2,23 ^a	5,45±0,24 ^a
17	29,2±0,07 ^a	9,79±0,01 ^b	18,62±8,00 ^a	61,15±0,53 ^b	5,86±1,81 ^a	4,41±1,29 ^a
30	37,96±0,71 ^a	21,03±1,32 ^b	18,09±3,59 ^a	100,76±3,55 ^b	5,71±1,60 ^a	5,39±0,01 ^a
60	67,44±8,72 ^a	37,39±0,36 ^b	9,44±3,91 ^a	13,09±3,62 ^b	6,43±0,60 ^a	6,50±0,44 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P<0,05$ em uma mesma linha, dentro de um mesmo tratamento.

Em relação à concentração de ácido cítrico, o queijo NP apresentou teores superiores aos valores encontrados no queijo P, sendo a concentração estatisticamente diferente ($P<0,05$). O ácido cítrico pode ser usado como substrato

por bactérias fermentadoras de ácido cítrico com produção de ácido pirúvico, dióxido de carbono e ácido acético (BOUZAS et al., 1993).

O catabolismo do citrato realizado por BAL pode produzir diacetil, acetoína e butanodiol, compostos com propriedades aromáticas, e CO₂. Presente naturalmente em pequenas concentrações no leite, seu metabolismo ocorre de forma concomitante com o metabolismo de outros compostos como a glicose, também sendo resultado do metabolismo de fungos, no qual o piruvato é transformado em acetil CoA, que entra no ciclo de Krebs para a formação do citrato (WALSTRA et al., 2002). O co-metabolismo do citrato com a glicose produz efeitos fisiológicos diferentes de acordo com a via fermentativa (homofermentativa ou heterofermentativa) da BAL.

O citrato presente no leite é metabolizado por várias BAL, como os *Enterococcus* e *Leuconostoc* (HUGENHOLTZ, 1993). Em BAL homofermentativas, a utilização do citrato é mecanismo de proteção contra estresse ácido, pois são gerados compostos aromáticos (diacetil, por exemplo), que neutraliza a acidez do meio. Em bactérias heterofermentativas, para cada mole de citrato, ocorre a geração de um ATP, o que torna o citrato uma fonte energética para esse grupo de micro-organismos (QUINTANS et al., 2008).

Pereira et al. (2010) ao avaliar a influência da dinâmica microbiana na determinação das características sensoriais em queijos portugueses, correlacionou a complexidade da microbiota presente no queijo a uma maior concentração de ácido cítrico. Aplicado ao presente estudo, tal resultado pode sugerir que o queijo NP apresente uma diversidade microbiana superior ao queijo P.

Já a concentração de ácido propiônico, observou-se diferença estatística ($P < 0,05$) em todos os tempos avaliados, no qual se ressalta sempre uma maior concentração desse ácido orgânico no queijo P. O ácido propiônico é sintetizado a partir do catabolismo do lactato por espécies do gênero *Propionibacterium* spp. (CALIFANO e BEVILACQUA, 2000). Também pode apresentar efeito antagonista ($pK_a = 4,9$) tendo seu mecanismo de atuação similar ao ácido acético, em função da similaridade dos valores de pK_a .

Para a concentração de ácido butírico, não houve diferença estatística entre os queijos NP e P em nenhum dos tempos avaliados ao longo de 60 dias de maturação. Esse ácido é formado principalmente por lipases endógenas do leite cru ou de origem microbiana (micro-organismos *starter* ou *non-starter*) (BUFFA et al., 2004). De acordo com um estudo realizado por Buffa et al. (2001), normalmente a concentração

de ácido butírico é menor em queijos fabricados com leite pasteurizado em comparação aos queijos fabricados com leite cru. Esses autores atribuem à baixa atividade lipolítica em queijos feitos com leite pasteurizado, que devido ao tratamento térmico, reduz a atividade das lipases endógenas do leite.

Os ácidos orgânicos podem ser ao mesmo tempo, produto ou substrato a serem utilizados pela microbiota do queijo. Dessa forma, o acúmulo desses ácidos está diretamente relacionado com a composição dessa microbiota. Na figura 5, está apresentada a tendência da concentração total dos ácidos orgânicos quantificados.

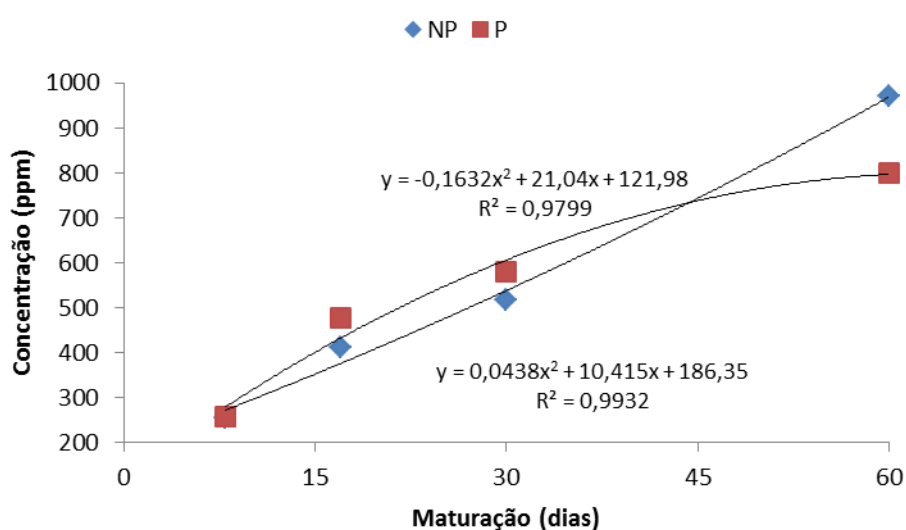


Figura 5. Concentração de ácidos orgânicos totais em queijo Minas artesanal durante 60 dias de maturação.

De forma geral, esses ácidos tendem a acumular-se ao longo da maturação dos queijos. Observa-se uma redução mais acentuada na concentração desses compostos no queijo P em relação ao queijo NP. Essa diferença pode ser associada uma microbiota mais diversificada no queijo NP ou mesmo um maior consumo desses ácidos orgânicos como fonte secundária de carbono pela microbiota do queijo P.

4. Conclusão

Entre os parâmetros físico-químicos, não houve diferença ($P < 0,05$) nas variáveis cloreto e atividade de água. O queijo tipo minas artesanal fabricado com

leite pasteurizado apresentou diferenças significativas nas variáveis de pH, acidez e umidade ao longo da maturação. Essa diferença não foi perceptível quantitativamente nos grupos microbianos avaliados, com exceção de *S. aureus*. Entretanto, como a produção de ácido está relacionada às espécies com capacidade acidificante presentes na microbiota, infere-se que a diversidade de micro-organismos nos queijos avaliados seja diferente, sendo essa microbiota pré-selecionada no queijo feito com leite pasteurizado em função da pasteurização e da microbiota presente no fermento, que seleciona micro-organismos resistentes ao sal e ao baixo pH. Além disso, a contagem de *S. aureus* persistiu por mais tempo no queijo feito com leite pasteurizado, sendo quantificados até 30 dias de maturação nesse queijo. Já o queijo fabricado com leite cru, esse mesmo micro-organismo já não estava presente com 30 dias de maturação.

A concentração de ácido láctico diferiu somente no tempo 30 dias. O ácido butírico não apresentou diferença ($P>0,05$) entre os queijos NP e P. A concentração de ácidos orgânicos demonstra diferenças significativas entre esses queijos, o que resulta em propriedades sensoriais distintas, visto que os ácidos orgânicos tem um importante papel na composição das propriedades de flavour em queijos, além de influenciarem na inocuidade desse produto.

O tratamento térmico afetou a dinâmica microbiana presente no leite cru, já que a contagem de *S. aureus* nos queijos NP e P no tempo de 8 dias eram de 4 log ufc g⁻¹ em ambos os queijos e, após 17 dias, houve redução de um ciclo log no queijo P e dois ciclos logs no queijo NP, indicando em outras palavras, que a microbiota endógena do leite cru tem um importante papel no antagonismo de patógenos. Dessa forma, mesmo com a adição do FE ao leite pasteurizado, a dinâmica populacional do queijo P foi diferente, o que permitiu a manutenção de *S. aureus* por mais tempo durante a maturação devido a eliminação da microbiota competidora natural presente no leite. Assim, a maturação associada a microbiota endógena presente no leite cru, tem papel fundamental na inocuidade do queijo Minas artesanal, pois ao longo desse processo, a microbiota endógena desenvolve-se de forma equilibrada, inibindo o crescimento da população contaminante em função dos metabólitos desse microbiota endógena.

5. Referências bibliográficas

ALBENZIO, M.; CORBO, M.R.; REHMAN, S.U.; FOX, P.F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 35–48, 2001.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo minas artesanal da região de Araxá**. Viçosa: UFV. 2004. 148 p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

BORELLI, B. M., **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 119p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006.

BOUZAS, J.; KANT, C.A.; BODYFELT, F. TORES, J.A. Time and temperature influence on chemical again indicators for a commercial cheddar cheese. **Journal of Food Science**. v. 58, p. 1307-1312, 1993.

BUFFA, M.; BUENAVENTURA, G.; SALDO, J.; TRUJILLO, A. J. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 37, p. 247-253, 2004.

BUFFA, M.; GUAMIS, B.; ROYO, C.; TRUJILLO, A. J. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. **Food Microbiology**, v.18, p 45-51, 2001.

CALIFANO, A. N.; BEVILACQUA, A. E. Multivariate analysis of the organic acids content of gouda type cheese during ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 949-960, 2000.

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. 01 – 20, 2001.

DEMARIGNY, Y.; DALMASSO, M.; TONLEU, A.; RIGOBELLO, V.; BEUVIER, E.; LY-CHATAIN, M. H.; BOUTON, Y. Influence of the Backslopping Practice on the Microbial Diversity of the *Lactococcus* Population in a Model Cheesemaking. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2, p 618-627, 2011.

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

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 20 ed. São Paulo: Globo, 295p. 1991.

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J. M.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v.18, p. 716-722, 2006.

GONZÁLEZ DE LANO, D.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, P. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening—analysis by HPLC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 570–276, 1996.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.

GURIRA, O.Z.; BUYS, E.M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. **Food Microbiology**, v. 22, p. 159-168, 2005.

HERREROS, M. A.; FRESNO, J. M.; GONZALEZ-PRIETO, M. J.; TORNADIJO, E. Technological Characterization of Lac-tic Acid Bacteria Isolated from Armada Cheese (a Spanish Goats' Milk Cheese). **International Dairy Journal**, v. 13, n. 6, 2003, p. 469-479, 2003.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International of Food Microbiology**, v.24, p.343-362, 1995.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, p. 142-148, 2009

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

LUES, J.F.R. Organic acid and residual sugar variation in South African cheddar cheese and possible relationships with uniformity. **Journal of Food Composition and Analytics**, v. 13, p. 819-825, 2000.

MULLIN, W.J. ; EMMONS, D.B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 30.n 2, p 147 – 151, 1997.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 133–140, 2003.

MARTINS, J. M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro**. Viçosa: UFV. 2006. 158p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MARTINS, J. M.; PINTO, M. S.; BARBOSA, T. S.; OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, R.C.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; FURTADO, M. M.; FERREIRA, C. L. L. F. Características físico-químicas dos queijos Minas artesanais produzidos na região do Serro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, MG. v. 59, nº 339, p. 331 - 334, 2004.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 10 de junho de 2012.

NOBREGA, J. E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em**

leveduras. 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum Sensing in Staphylococci. **Annual Review Genetic**, v. 42, p. 541-564, 2008.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

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

PEREIRA, C.I.; GRAÇA, J.A.; OGANDO, N.S.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Influence of bacterial dynamics upon the final characteristics of model Portuguese traditional cheeses. **Food Microbiology**, v. 27, p. 339-346, 2010.

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

QUINTANS, N. G.; BLANCATO, V.; REPISO, G.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. **Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications**, p. 65-88, 2008.

ROBINSON, R. K. **Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products**, 3. Ed., 2002.

RODRIGUEZ, E.; ARQUES, J. L.; GAYA, P.; TOMILLO, J.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 633–635, 2000.

SARANTINOPOULOUS, P.; ANDRIGHETTO, V.; GEORGALAK, M. D.; LOMBADI, R. E. A M. C. A Biochemical properties of enterococci relevant to their

technological performance. **International of Dairy Journal**, v. 11, p. 621-647, 2001.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691-697, 2010.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M., Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 591–610, 2005.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v.112, p. 230-235, 2006.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. **Dairy technology. Principles of milk properties and processes**. Marcel Dekker, p. 37, 2002.

WITTHUHN, R.C, SCHOEMAN, T, BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African Kefir grains. **International Dairy Journal**, v. 57(1), p. 33-37, 2004.

CAPÍTULO 3

POTENCIAL DE AMINAS BIOATIVAS COMO INDICADOR DE MATURAÇÃO EM QUEIJO MINAS ARTESANAL

*The potential of bioactive amines as indicators of ripening in Minas Artisanal
Cheese*

Resumo

Avaliou-se o potencial de aminos bioativas como uma variável alternativa para indicação do período de maturação em queijos Minas artesanal, atualmente de 17 e 22 dias para os queijos Serro e Canastra, respectivamente. Foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez, cloretos, nitrogênio total, extensão e profundidade da proteólise), microbiológicas (quantificação de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, mofos e leveduras, *Staphylococcus aureus* e *Enterobacteriaceae*) e quantificação das aminos histamina (HIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), tiramina (TIM), serotonina (SRT), agmatina (AGM), espermidina (EPD), espermina (EPM), 2-feniletilamina (FEM) e triptamina (TRM) em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P). Os resultados demonstraram similaridade ($P>0,05$) entre os queijos quanto a caracterização microbiológica. Nos parâmetros físico-químicos, o queijo NP apresentou maiores valores de pH, enquanto o queijo P apresentou maiores valores de acidez. Não houve diferença ($P>0,05$) na concentração de cloretos. Foram verificados maiores índices de proteólise no queijo NP em relação ao queijo P, o que permitiu maior disponibilidade de aminoácidos livres para a síntese de aminos bioativas, comprovado na análise da concentração total de aminos, que foi maior em no queijo NP em relação ao queijo P. A histamina foi sintetizada ao longo de todo o período de maturação em ambos os queijos, e por isso, apresentou potencial como parâmetro de indicação de maturação para o queijo artesanal, sendo proposto uma faixa entre 8,65-9,29 mg/100 g de histamina para indicação o período mínimo de maturação para esse tipo de queijo (17 dias). A utilização da histamina como indicadora de maturação demonstrou-se uma alternativa viável para garantir a inocuidade do queijo Minas artesanal, associada ao estágio de maturação.

Palavras-chaves: metabolismo, maturação, aminos bioativas, inocuidade.

1. Introdução

O queijo Minas artesanal (QMA) tem uma importância social, econômica e histórica para o estado de Minas Gerais, onde em 15 de maio de 2008, o Instituto de Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN), o tombou como Patrimônio Cultural Imaterial o “modo artesanal de fazer queijo Minas” (IPHAN, 2008).

Tradicionalmente, o QMA é fabricado com leite cru de vaca, adicionado de coalho e soro fermento. Esse soro fermento é resultado do processo de dessoragem, coletado após o momento da salga, sendo utilizado na próxima batelada de queijo a ser produzida no dia seguinte.

Os QMA são comercializados em sua grande maioria como queijos “frescos”, com poucos dias de maturação. Porém, para que se tenha um típico QMA, esse queijo tem que ser maturado por um período mínimo, para que se desenvolvam os aromas e flavour típicos que caracterizam o QMA, além de garantir um produto mais seguro para o consumo. Durante essa fase, ocorrem reações físicas, químicas e microbiológicas que irão definir as propriedades sensoriais, e até mesmo condições para que seja estabelecida uma garantia da inocuidade desse tipo de queijo (PERRY, 2004).

Dessa forma, observa-se a importância da garantia de que os queijos fabricados com leite cru sejam maturados pelo período mínimo estabelecido de acordo com cada tipo de queijo. Atualmente, com embasamento científico, definiu-se para o QMA do Serro um período mínimo de 17 dias de maturação (MARTINS, 2006) e para o QMA produzido na Serra da Canastra, 22 dias de maturação (DORES, 2007). Esses períodos foram estabelecidos tendo a espécie *Staphylococcus aureus* como micro-organismo limitante na definição do período seguro de maturação dos QMA (MARTINS, 2006; DORES, 2007).

Porém, como já citado, grande parte dos QMA comercializados não atendem a esse período de maturação, o que pode resultar no consumo de um produto fora dos parâmetros de segurança microbiológica estabelecidos pela legislação. Assim, outras variáveis devem ser investigadas a fim de complementarem essa legislação para garantir ainda mais um produto inócuo ao consumidor, e caracterizar o queijo de acordo com o estágio de maturação em que ele se encontra.

Uma alternativa seria determinar e quantificar metabólitos resultantes da atividade microbiana. Sabe-se que ao longo da maturação, a complexa comunidade encontrada nos queijos sofre diferentes sucessões ecológicas, onde populações são reduzidas em função do crescimento de outras espécies, devido às alterações físico-químicas que ocorrem na matriz do queijo. Com isso, em função da atividade metabólica dessa microbiota, pode-se citar o acúmulo de aminas bioativas ao longo da maturação dos queijos.

Aminas bioativas (AB) são compostos nitrogenados de baixo peso molecular que se originam principalmente devido à síntese de descarboxilases por micro-organismos, sobre aminoácidos precursores disponíveis (HALASZ et al., 1994; GLORIA, 2005). Podem ainda ser produzidas pela presença de enzimas descarboxilases endógenas presentes nos alimentos. Entretanto, a maior fonte dessas descarboxilases é resultado da atividade microbiana (SANTOS, 1996; SHALABY, 1996; FLICK e GRANATA, 2005).

De forma geral, a síntese de AB é uma resposta às condições do meio no qual a bactéria está inserida. A descarboxilação aumenta a sobrevivência ao estresse ácido. Nessa situação, ocorre o consumo de prótons com liberação de CO₂ e síntese de amina, com a finalidade de reequilibrar o pH, propiciando a permanência da célula nesse ambiente (HALAZ et al., 1994). A produção de aminas por bactérias é afetada pelo pH, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e cofatores, disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares fermentescíveis. (GLORIA e VIEIRA, 2007).

Características inerentes aos queijos como acidez e pH, podem propiciar ou inibir a formação de AB. Enquanto o baixo pH estimula a liberação de descarboxilases, a presença de elevadas concentrações de NaCl reduz a síntese de AB. Isso ocorre devido ao efeito inibidor do NaCl no crescimento de micro-organismos, dentre eles, os que apresentam atividade descarboxilase positiva (ROSEIRO et al., 2006).

Outro fator importante na síntese dessas aminas é disponibilidade de aminoácidos livres precursores (GLORIA e VIEIRA, 2007). Por isso, a associação de uma alta atividade proteolítica em queijos fabricados com leite cru tem sido associada a uma elevada concentração dessas aminas bioativas ao longo do processo de maturação. Essa influência da proteólise pode ser verificada quando são comparados os teores de aminas biogênicas em queijos de maturação curta e longa

(acima de 60 dias). Em queijos que apresentam maturação prolongada, a concentração de AB aumenta de 10 a 2000 vezes, dependendo do tipo de queijo e do tempo de maturação (INNOCENTE e D'AGOSTIN, 2002).

Uma vez que as AB estão presentes em alimentos fermentados, acompanhando-se o tipo e concentração das mesmas, pode-se inferir o estágio de maturação dos queijos. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial das aminas bioativas como indicador do estágio de maturação em queijo Minas artesanal, como forma de estabelecer uma variável alternativa na garantia de um produto inócuo para o consumo.

2. Material e métodos

2.1 Fabricação dos queijos

Os queijos foram produzidos em uma fazenda não cadastrada no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) na cidade de Serro, Minas Gerais. O leite foi obtido por ordenha mecânica. O produtor aplica boas práticas agropecuárias durante o manejo com os animais e boas práticas de fabricação no processamento do leite para produção do QMA.

Para a produção dos queijos, seguiu-se a tecnologia utilizada pelo produtor. Em todas as bateladas, somente o queijeiro realizou todo o processo, no intuito de manter a padronização do processo e minimizar as variáveis que poderiam influenciar nas características dos queijos.

Foram utilizados 40 litros de leite cru para a produção dos queijos não pasteurizados (NP) e 40 litros de leite cru submetidos à pasteurização (63 °C/30 min) para a produção de queijos pasteurizados (P), de acordo com a figura 1. Adicionaram-se proporções iguais de cloreto de cálcio (20 mL) em ambos os queijos para minimizar as perdas ocasionadas em função da desnaturação das proteínas e liberação do cálcio no soro. Adicionou-se cerca de 7 mL de coalho (marca Bela Vista[®] - coalho líquido BV – 1:3.000). O tempo médio de coagulação foi de 45 min para o leite cru e 55 min para o leite pasteurizado. O ponto de corte foi observado ao introduzir a faca na massa e esta não apresentar resíduos de leite.

Em seguida, a massa foi cortada utilizando-se uma pá para obtenção de grãos menores e agitada lentamente por 20-30 min para permitir a dessoragem da massa. A

prensagem/enformagem é feita por compressão da massa utilizando-se as mãos. A salga a seco é feita utilizando-se sal grosso em um dos lados e após duas horas, o lado posterior. No dia seguinte, o queijo foi retirado das formas para maturação. No presente estudo, os queijos foram embalados e transportados em caixas térmicas para serem maturados no laboratório de Culturas Lácteas (DTA/UFV) por 60 dias. Os queijos foram retirados das embalagens e dispostos em prateleiras para maturação em temperatura ambiente.

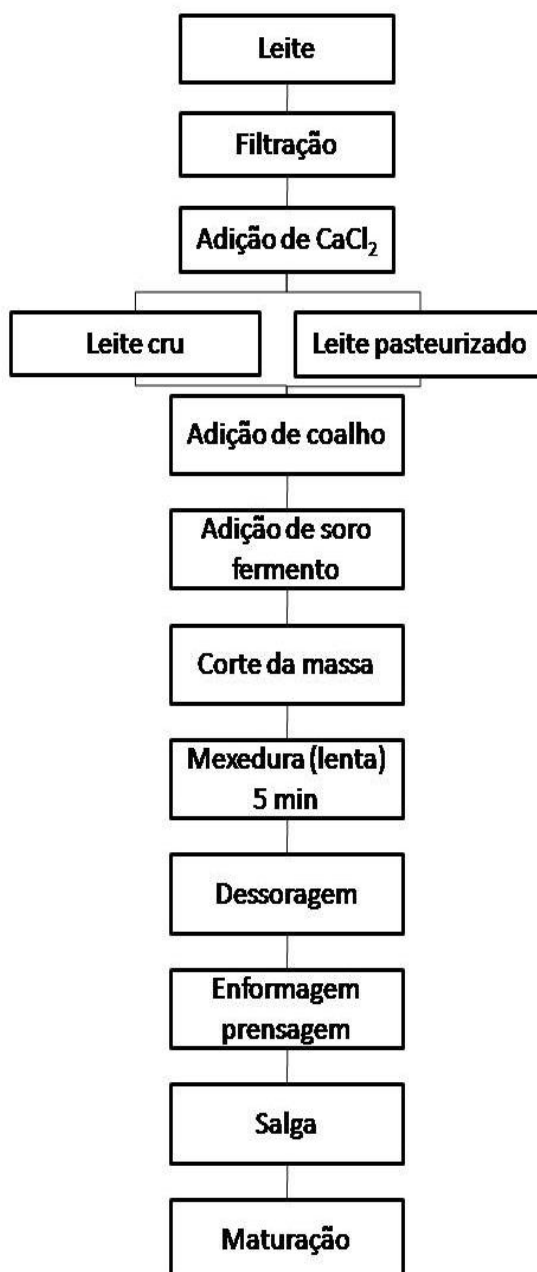


Figura 1. Fluxograma de produção do queijo Minas artesanal.

Foram produzidas quatro peças de queijo por tratamento (pasteurizado/cru) em três diferentes bateladas, totalizando 24 peças de queijo. Os queijos foram submetidos à maturação em temperatura ambiente, sendo amostrados nos tempos 8, 17, 30 e 60 dias de maturação.

2.2 Análises físico-químicas

Foram realizadas de pH, acidez titulável (% de ácido láctico) e concentração de cloretos de acordo com Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A determinação de nitrogênio total foi realizada pelo método Kjeldhal (BRASIL, 2006). A extensão de maturação foi calculada indiretamente por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS pH 4,6) e nitrogênio total (NT), multiplicando o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$EM = \frac{(NS_{pH4,6})}{NT} \times 100$$

A profundidade de maturação (PM) foi quantificada de forma indireta por meio da razão entre a percentagem de nitrogênio solúvel em TCA 12% (NS TCA 12%) e nitrogênio total (NT), multiplicando-se o resultado por 100 (WOLFSCHOON-POMBO, 1983).

$$PM = \frac{(NSTCA\ 12\%)}{NT} \times 100$$

2.3 Análises microbiológicas

Para análises dos queijos, foram coletadas 25g de cada amostra nos tempos 8, 17, 30 e 60 dias de maturação e diluídas em 225 mL de tampão fosfato esterilizado. Após homogeneização em um stomacher, por 2 minutos, foram preparadas diluições seriadas, e as amostras foram plaqueadas em duplicatas em diferentes meios seletivos para enumeração dos seguintes micro-organismos: aeróbios mesófilos em Plate Count Agar (PCA) a 37 °C/48 h; lactobacilos em De Man Rogosa Sharp (MRS) a 30

°C e 37 °C/48 h; lactococos em ágar M17 a 30 °C e 37 °C/48 h; *Staphylococcus aureus* em placa Petrifilm® Staph Express a 37 °C/24 h; enterococos em ágar bile esculina a 37°C/48 h; *Enterobacteriace* em agar VRBG a 37 °C/24 h; mofos e leveduras em Potato Dextrose Agar (PDA) a 25 °C/ 3 a 5 dias (DOLCI et al., 2008; SCHIRONE et al., 2011).

2.4 Análises de aminos bioativas

2.4.1 Determinação de aminos bioativas (AB)

A determinação de AB foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFMG. Foram determinadas as seguintes aminos: histamina (HIM), putrescina (PUT), cadaverina (CAD), tiramina (TIM), serotonina (SRT), agmatina (AGM), espermidina (EPD), espermina (EPM), 2-feniletilamina (FEM) e triptamina (TRM).

2.4.2 Extração de aminos bioativas

Para extração das AB, foram utilizadas 10 g de cada amostra, adicionadas de 1,5 % de ácido sulfosalicílico, seguidos por agitação (40 s/ 4 °C) e centrifugação (5 min/14.000 g). Foram realizadas quatro extrações sucessivas para obtenção do sobrenadante a ser quantificado.

2.4.3 Separação e quantificação das aminos bioativas usando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com derivação pós-coluna e detecção por fluorescência

Após a extração, o sobrenadante foi filtrado em membrana HAWP em éster de celulose, com diâmetro de 13 mm e tamanho de poro de 0,45 µm. As aminos HIM, PUT, CAD, TIM, SRT, AGM, EPD, EPM, FEM e TRM foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de par iônico em fase reversa e quantificadas por fluorimetria após derivação pós-coluna com o-ftalaldeído (OPA), segundo Vale e Glória (1997).

Para a separação das aminas, foram empregadas como fases móveis acetonitrila (fase B) e solução tampão acetato de sódio-octanossulfonato de sódio (fase A).

A derivação pós-coluna foi realizada por meio de uma câmara de mistura instalada após a saída da coluna em um tubo de teflon de 2 m de comprimento conectando a câmara ao detector de fluorescência. A identificação das aminas foi realizada por comparação entre o tempo de retenção dos picos encontrados nas amostras com o das aminas da solução padrão, em HCl. A quantificação das aminas foi realizada por interpolação em curva analítica externa e o valor encontrado na amostra multiplicado pelo fator de correção correspondente a cada amina.

2.5 Análise estatística

Para análise dos resultados, foi utilizado o programa SigmaPlot v.11, no qual foi realizado teste *t* de Student para as variáveis que apresentaram distribuição normal e teste de Mann Whitney para aquelas que não apresentaram tal distribuição. Para verificar correlação entre as variáveis, foi realizada a correlação de Pearson, tendo o nível de significância considerado foi de $P < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1 Características físico-químicas do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

Os resultados dos parâmetros físico-químicos pH, acidez e cloretos dos queijos Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado ao longo de 60 dias de maturação estão apresentados na tabela 1.

Observa-se uma evolução semelhante entre as variáveis pH e acidez (% ácido láctico) nos queijos NP e P, com aumento gradativo ao longo da maturação (60 dias). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) nos tempos 8, 30 e 60 dias entre essas variáveis. Em relação à acidez, foi observado um aumento nos valores nos queijos NP e P ao longo da maturação. Observa-se uma acidez mais elevada inicialmente no queijo P no tempo 8 dias, e posteriormente a maior porcentagem de ácido láctico foi observada no queijo NP aos 60 dias de maturação.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos do queijo Minas artesanal fabricado com leite cru (NP) e pasteurizado (P) durante a maturação (60 dias).

	Tratamento	8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
pH	NP	4,82±0,05 ^a	4,81±0,07 ^a	4,83±0,04 ^a	5,07±0,01 ^a
	P	4,6±0,00 ^b	4,71±0,02 ^a	4,7±0,02 ^b	4,84±0,02 ^b
Acidez (% ác. láctico)	NP	0,67±0,14 ^a	0,86±0,1 ^a	0,89±0,04 ^a	2,96±0,31 ^a
	P	0,79±0,05 ^b	0,83±0,07 ^a	1,01±0,1 ^b	2,37±0,09 ^b
NaCl (%)	NP	1,15±0,36 ^a	1,59±0,46 ^a	1,64±0,07 ^a	1,75±0,08 ^a
	P	1,21±0,09 ^a	1,61±0,14 ^a	1,62±0,07 ^a	2,45±0,18 ^b

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

As variações de pH em queijos artesanais podem ser justificadas em função de diferentes fatores, no qual destaca-se a quantidade de FE utilizado, assim como do metabolismo da microbiota que compõe esse fermento (MACHADO et al., 2004). Hipótese provável também para justificar a variação da acidez entre os queijos NP e P, ou seja, esse acúmulo de ácido seria uma resposta ao metabolismo da microbiota presente em cada queijo.

A concentração de cloretos não diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) entre os queijos NP e P durante 30 dias de maturação, se diferenciando posteriormente aos 60 dias de maturação. A adição de sal ao queijo tem dentre suas finalidades, dificultar a multiplicação de micro-organismos contaminantes como coliformes e *Escherichia coli*. Porém, micro-organismos como *Staphylococcus aureus* são tolerantes a elevadas concentrações de sal, podendo ter seu crescimento favorecido em detrimento da eliminação de competidores, como BAL (BORGES et al., 2008).

A associação desses fatores físico-químicos influencia diretamente no crescimento da população microbiana, incluindo estirpes com capacidade de síntese de enzimas descarboxilases, produzindo aminas bioativas (LINARES et al., 2011).

A produção de aminas bioativas é uma resposta ao estresse ácido, condições normalmente encontradas em queijos em função do acúmulo de ácidos na matriz do queijo (WOLKEN et al., 2006). Quanto mais baixo o pH, maior a atividade e síntese de AB (FERNÁNDEZ et al., 2007b). A concentração de cloretos também interfere no acúmulo de AB em produtos fermentados, incluindo os queijos. Como já citado, a adição de sal no queijo inibe o crescimento de micro-organismos contaminantes, e por consequência, também reduz a taxa de crescimento de micro-organismos

descarboxilase positivos (LINARES et al., 2011). Assim, considerando-se os parâmetros físico-químicos avaliados, observa-se que ambos os queijos apresentam condições iniciais que favoreçam a síntese de AB.

Outro importante fator na síntese de AB é a disponibilidade aminoácidos precursores. A maturação e proteólise são importantes variáveis no acúmulo de AB em queijos (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2000). O processo de maturação é iniciado por *BAL starter* e posteriormente pela microbiota NSLAB, propionibactérias, mofos e leveduras. As bactérias starter contribuem na degradação das proteínas enquanto que a NSLAB são responsáveis pelo processo de hidrólise de peptídeos (MARTUSCELLI et al., 2005). Assim, a taxa de proteólise aumenta progressivamente ao longo da maturação, liberando aminoácidos livres precursores de AB, que serão descarboxilados e acumulados na matriz do queijo. De forma geral, quanto maior o período de maturação, maior o teor de AB (FERNÁNDEZ et al., 2007a).

A extensão e profundidade da maturação permite avaliar o grau de proteólise de queijo, assim como predizer a disponibilidade de peptídeos (extensão) e aminoácidos (profundidade) na matriz.

Os resultados da extensão e profundidade da proteólise nos queijos NP e P estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Evolução da proteólise do queijo Minas artesanal fabricado com leite cru (NP) e pasteurizado (P) durante a maturação (60 dias).

Tratamento		8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
Nitrogênio total (%)	NP	3,05±0,10 ^a	3,16±0,11 ^a	3,49±0,09 ^a	3,91±0,13 ^a
	P	2,40±0,08 ^b	2,70±0,10 ^b	2,89±0,06 ^b	3,45±0,13 ^b
EP (%)	NP	6,93±0,05 ^a	15,15±0,96 ^a	20,63±1,76 ^a	34,11±5,9 ^a
	P	3,39±1,25 ^b	13,46±4,44 ^a	13,13±0,25 ^b	24,16±2,74 ^b
PP (%)	NP	4,78±1,69 ^a	14,22±1,95 ^a	15,82±0,62 ^a	22,81±0,87 ^a
	P	3,75±2,51 ^a	13,66± 1,35 ^a	15,98±0,97 ^a	20,77±0,09 ^a

EP: extensão da proteólise PP: profundidade da maturação. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

A concentração de nitrogênio total apresentou diferenças significativas ao longo do período de maturação. Essa diferença era esperada visto que a pasteurização desnatura parcialmente algumas proteínas que são liberadas juntamente com o soro no momento da prensagem/dessoragem.

A extensão da proteólise é a relação entre % nitrogênio solúvel em pH 4,6 e a concentração de nitrogênio total da amostra e é uma resposta da ação proteolítica das enzimas do coalho sobre a caseína do queijo, liberando peptídeos de alto peso molecular (WOLFSCHOON-POMBO e LIMA, 1983). Observa-se que houve diferença entre os queijos NP e P ($P < 0,05$) ao longo da maturação, com exceção do tempo 17 dias, sendo que o queijo NP apresentou maiores valores em relação ao queijo P.

A profundidade da proteólise é resultado da relação entre % nitrogênio solúvel em TCA 12% e a concentração de nitrogênio total da amostra, e permite inferir o grau de formação de substâncias de baixo peso molecular, principalmente aminoácidos, em função da atividade proteolítica das enzimas microbianas sobre compostos nitrogenados resultantes da degradação da caseína (SILVA et al., 1995). Não foram observadas diferenças significativas para essa variável entre os queijos ao longo da maturação.

A evolução da extensão e profundidade da proteólise nos queijos NP e P estão apresentadas nas figuras 2 e 3.

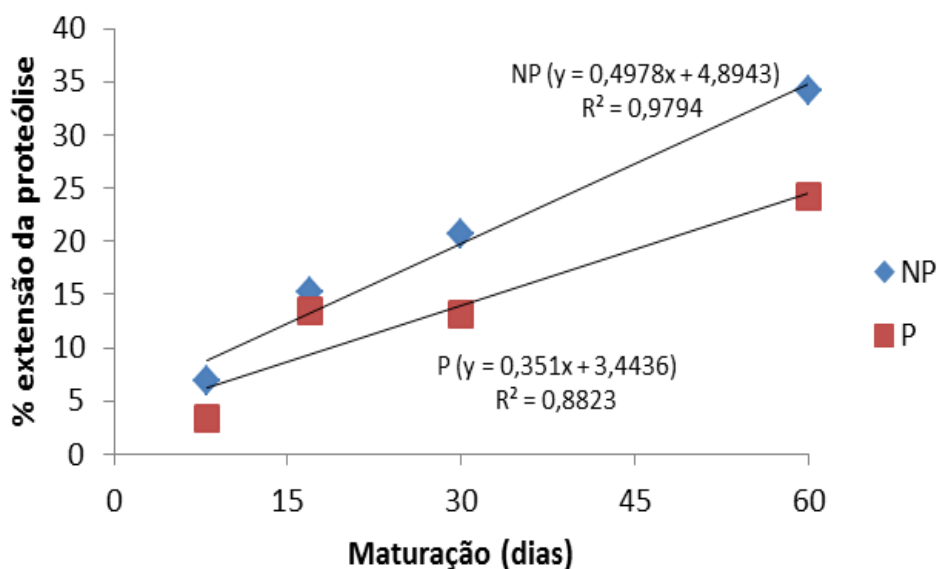


Figura 2. Extensão da proteólise (%) em queijo Minas artesanal fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação.

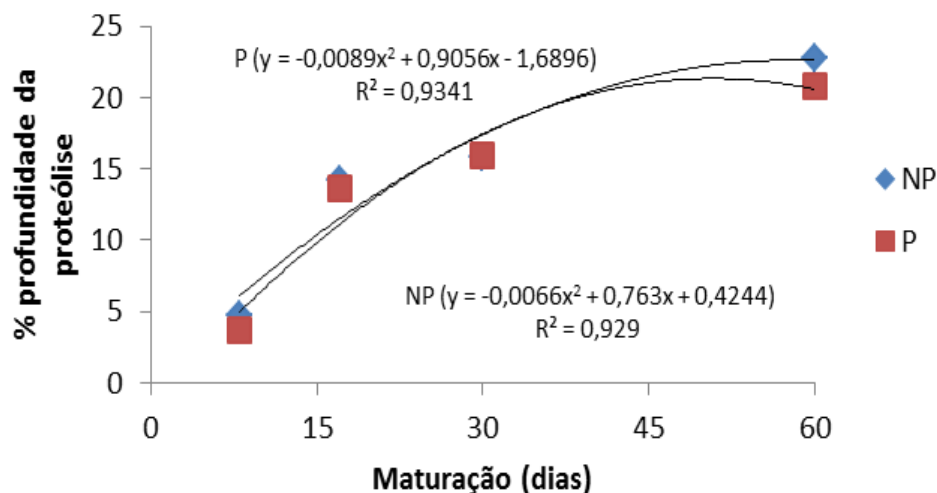


Figura 3. Profundidade da proteólise (%) em queijo Minas artesanal fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação.

Observa-se que o queijo NP apresentou uma melhor relação de linearidade do que o queijo P em relação a extensão da proteólise. Já para o índice de profundidade da proteólise, o modelo polinomial de segunda ordem foi o modelo que melhor se ajustou aos dados obtidos.

A atividade proteolítica observada nos queijos NP e P está relacionada com a atividade microbiana e enzimática em cada queijo e com a estrutura da caseína. No queijo NP, a caseína possui seus sítios ativos mais expostos, o que permite uma maior atividade de enzimas proteolíticas, hidrolisando-a. Entretanto, no queijo P a caseína associa-se a proteínas do soro como β -lactoglobulina, dificultando a atividade enzimática (WALSTRA et al., 2002). Consequentemente, a proteólise é muito mais intensa em queijos fabricados com leite cru em comparação com queijos fabricados com leite pasteurizado.

Essa diferença na intensidade da proteólise influencia diretamente na disponibilidade de substrato para a síntese de AB, visto que são necessários aminoácidos precursores para atividade das enzimas descarboxilases, e a própria presença de estirpes capazes de sintetizar esse tipo de enzimas.

3.2 Perfil microbiológico do queijo Minas artesanal fabricados com leite cru e leite pasteurizado

Os resultados da avaliação do perfil microbiológico estão apresentados nas tabelas 3, 4, 5 e 6.

Tabela 3. Log da contagem (ufc) de *Lactobacillus* spp e *Lactococcus* spp em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8 dias		17 dias		30 dias		60 dias	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
NP ¹	7,54±0,24 ^a	8,04±0,04 ^a	7,39±0,78 ^a	7,26±0,39 ^a	6,67±0,16 ^a	7,03±0,27 ^a	5,58±0,21 ^a	5,54±0,29 ^a
P ¹	8,08±0,88 ^a	8,61±0,08 ^b	7,25±0,45 ^a	7,04±0,41 ^a	6,39±0,47 ^a	6,73±0,71 ^a	5,61±0,13 ^a	5,57±0,03 ^a
NP ₂	8,05±0,12 _a	8,01±0,18 _a	9,70±0,35 _a	8,14±0,57 _a	8,39±3,73 _a	10,07±1,70 _a	7,70±0,62 _a	6,73±0,05 _a
P ₂	8,21±0,49 _a	8,27±0,59 _a	9,53±0,51 _a	8,55±0,70 _a	9,99±0,77 _a	9,99±0,78 ^a	7,52±0,06 _a	6,49±0,09 _a

¹ Contagem de *Lactobacillus* spp. ² Contagem de *Lactococcus* spp. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05 em uma mesma coluna comparando-se os tratamentos pelo teste t.

Tabela 4. Log da contagem (ufc) de *Enterococcus* spp em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

	8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
NP	7,14±0,30 ^a	6,09±0,39 ^a	5,42±0,65 ^a	3,09±0,61 ^a
P	6,92±0,38 ^a	6,19±0,61 ^a	5,54±1,04 ^a	2,48±0,18 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

Tabela 5. Log da contagem (ufc) de mesófilos aeróbios e mofos e leveduras em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

		8 dias	17 dias	30 dias	60 dias
Mesófilos aeróbios	NP	7,82±0,32 ^a	7,46±0,78 ^a	6,86±0,21 ^a	5,35±0,44 ^a
	P	7,13±0,72 ^a	6,87±0,29 ^a	6,56±0,29 ^a	5,27±0,37 ^a
Mofos e leveduras	NP	6,70±0,40 ^a	6,36±0,24 ^a	5,54±0,84 ^a	5,01±0,36 ^a
	P	4,64±1,19 ^a	5,45±0,04 ^b	5,87±0,37 ^a	5,27±0,24 ^a

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância P<0,05, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

Tabela 6. Log da (ufc) contagem (ufc) de Enterobacteriaceae e *Staphylococcus aureus* em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

		8d	17d	30d	60d
Entero-bacteriaceae	NP	6,23±0,05 ^a	4,99±1,14 ^a	2,61±0,36 ^a	3,49±0,57 ^a
	P	6,87±0,77 ^a	4,86±0,59 ^a	2,81±0,64 ^a	2,71±0,10 ^a
<i>S. aureus</i>	NP	4,42±0,66 ^a	2,79±0,47 ^a	0,00 ^a	0,00
	P	4,64±1,19 ^a	3,14±0,12 ^a	2,48±0,85 ^b	0,00

Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância $P < 0,05$, na mesma coluna em um mesmo tempo pelo teste t.

Os resultados demonstram que os queijos NP e P não diferiram entre si ($P > 0,05$) na quantificação dos grupos microbianos do presente estudo ao longo da maturação, com exceção da contagem de *S. aureus* no queijo NP com 30 dias de maturação. Porém, ao avaliar os dados obtidos referentes ao pH e acidez dos queijos (tabela 1), infere-se que o metabolismo dessa microbiota seja diferente, visto que essas variáveis estão relacionadas com o tipo de espécie predominante na microbiota.

Possivelmente, a adição do fermento endógeno (FE) ao leite pasteurizado possibilitou a reposição parcial da microbiota endógena do leite cru, eliminada durante o processo de pasteurização. Contudo, as condições ambientais presentes no fermento (baixo pH, elevada acidez) atuam como agentes selecionadores dessa microbiota, que ao ser adicionada ao leite pasteurizado, possivelmente encontrou um ambiente favorável ao seu crescimento em função da eliminação de competidores, principalmente BAL.

As espécies dos grupos microbianos avaliados são reconhecidos pela literatura como potenciais produtores de AB (HALASZ et al., 1994). Gêneros de BAL como *Lactobacillus* e *Enterococcus* são associados a síntese de histamina e tiramina, respectivamente. Já espécies da família *Enterobacteriaceae* são notáveis produtores de putrescina e cadaverina (HOLT et al., 1994).

Características inerentes aos queijos como acidez e pH, podem propiciar ou inibir a formação de AB. Enquanto o baixo pH estimula a liberação de descarboxilases, a presença de elevadas concentrações de NaCl reduz a síntese de AB. Isso ocorre devido ao efeito inibidor do NaCl no crescimento de micro-organismos, dentre eles, os que apresentam atividade descarboxilase positiva (ROSEIRO et al., 2006).

3.3 Perfil de aminas bioativas

Os resultados do perfil de aminas bioativas estão apresentados na tabela 7. Não foram detectadas (<0,04 mg/100 g) as aminas serotonina, agmatina e espermidina em nenhuma amostra avaliada. Também foi observado que em várias amostras, a mesma amina não foi quantificada em todas as repetições em um mesmo período de maturação. Essa variação na concentração e distribuição de AB em queijos semelhantes é relatada pela literatura (PACHLOVÁ et al., 2012). Do ponto de vista quantitativo e qualitativo, a concentração de micro-organismos pode variar dentro da matriz do queijo, o que pode resultar em uma maior concentração de AB em diferentes partes do queijo (NOVELA-RODRIGUEZ et al., 2003).

Tabela 7. Perfil de aminas bioativas (mg/100g) em queijos fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação (60 dias).

Maturação (dias)		NP			P		
		1	2	3	1	2	3
PUT	8	<0,04	0,97	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
	17	0,11	0,68	0,7	<0,04	0,17	<0,04
	30	1,97	1,62	1,7	0,38	0,12	<0,04
	60	1,67	1,47	1,37	1,81	<0,04	0,36
CAD	8	0,45	0,88	0,1	<0,04	0,18	0,13
	17	0,22	0,85	0,59	0,11	0,42	0,11
	30	0,2	0,87	1,33	0,1	0,31	<0,04
	60	0,15	0,7	0,14	0,17	0,12	0,11
HIM	8	1,88	2,02	1,87	1,55	1,3	1,84
	17	8,65	8,92	9,29	3,53	2,59	3,06
	30	29,24	36,68	34,27	6,69	6,07	1,13
	60	46,71	34,91	45,22	15,56	4,0	10,11
TIM	8	0,54	0,23	0,31	0,09	0,17	0,35
	17	5,49	0,61	1,19	0,08	<0,04	0,18
	30	7,05	2,7	2,6	0,56	0,81	<0,04
	60	16,32	2,69	1,55	0,71	<0,04	0,48
FEM	8	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
	17	0,64	<0,04	0,16	<0,04	<0,04	<0,04
	30	1,44	0,34	0,4	<0,04	<0,04	<0,04
	60	4,45	0,38	0,15	<0,04	<0,04	<0,04
EPM	8	0,37	<0,04	<0,04	2,04	<0,04	<0,04
	17	<0,04	<0,04	<0,04	2,48	<0,04	<0,04
	30	<0,04	<0,04	<0,04	2,54	<0,04	<0,04
	60	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04	<0,04
TRM	8	1,61	2,47	2,47	4,85	3,34	3,71
	17	0,53	0,82	1,94	4,81	6,14	5,0
	30	0,12	<0,04	<0,04	3,47	5,27	0,29
	60	<0,04	1,54	0,13	1,67	0,77	0,63

^{1,2,3} repetições. <0,04: concentração mínima de detecção (mg/100g). PUT: putrescina CAD: cadaverina HIM: histamina TIM: tiramina FEM: fenilalanina EPM: espermina TRM: triptamina.

Observa-se um perfil diferente das aminas quantificadas entre os queijos NP e P (tabela 7). A PUT foi detectada em um número de amostras maior do que no queijo P ao longo da maturação. Já a TIM foi detectada em todas as amostras do queijo NP, estando em concentração variável no queijo P ao longo da maturação. A FEM foi quantificada somente em amostras de queijo NP, principalmente a partir de 30 dias de maturação. A EPM foi quantificada basicamente no queijo P (repetição 1) por 30 dias. A TRM foi quantificada em todas as amostras do queijo P ao longo da maturação, em valores numericamente superiores aos encontrados no queijo NP. A histamina foi a amina que apresentou maior regularidade em sua síntese durante a maturação em ambos os queijos, sendo quantificadas em todas as amostras.

Diferentes grupos microbianos tem sido associados a síntese de AB em queijos. Espécies da família *Enterobacteriaceae* tem sido associadas a presença de PUT e CAD (VALSAMAKI et al., 2000). *Enterococcus* é fortemente associado ao acúmulo de TIM em queijos (BURDYCHOVÁ e KOMPRDA, 2007; BUNKOVA et al., 2010). Estirpes de *Lactobacillus* tendem a acumular histamina (SCHIRONE et al., 2012). Pintado et al. (2008) observaram correlações significativas entre a presença de enterococos e concentrações de FEM, entre lactococos com CAD e TIM e estirpes de enterobactérias com o acúmulo de TRM em queijos Terrincho.

Essa diferença no perfil de AB entre os queijos NP e P era esperada, considerando-se que a proteólise tende a ser mais intensa no queijo NP em comparação com o queijo P em função da disponibilidade das caseínas para atuação de proteases e peptidases, liberando uma maior quantidade de aminoácidos (profundidade da proteólise) que serão utilizados como substrato para a síntese de AB. Além disso, a pasteurização, ao eliminar a microbiota endógena do leite cru, possivelmente reduziu o número de estirpes com capacidade de produzir descarboxilases, e assim, sintetizar AB no queijo P. Os dados obtidos na concentração total de AB ao longo da maturação nos queijos NP e P confirmam essa afirmativa. A evolução da concentração total de AB em ambos os queijos ao longo da maturação está apresentada na figura 3.

O queijo NP apresentou uma concentração total de AB quatro vezes superior à concentração no queijo P. De fato, a concentração de AB em queijo fabricados com

leite cru é maior do que em queijos fabricados com leite pasteurizado (NOVELLA-RODRÍGUEZ et al., 2002; FERNÁNDEZ et al., 2007a).

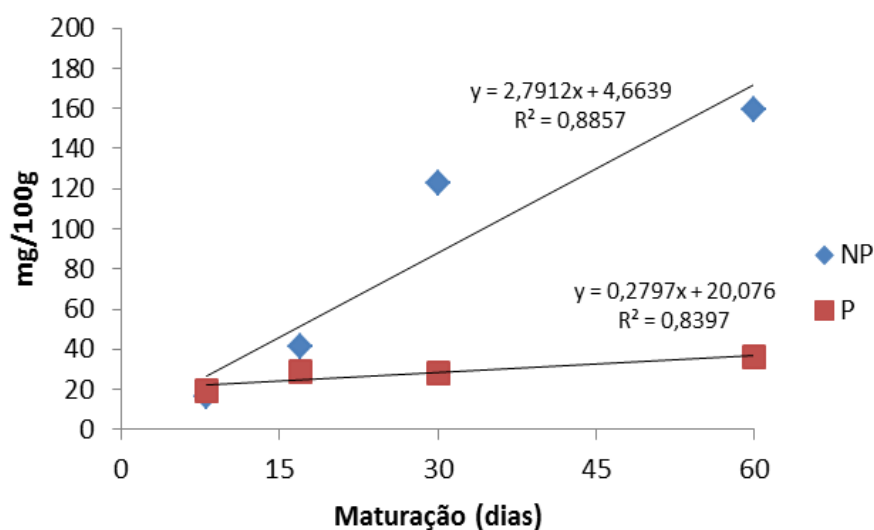


Figura 3. Evolução na concentração total de amina bioativa em queijos Minas artesanais fabricados com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação.

Embora a principal explicação do baixo conteúdo de AB em queijos fabricados com leite pasteurizado esteja relacionada com a redução do número de micro-organismos descarboxilase positivo, outros fatores devem ser considerados tais como proteólise mais lenta em queijos fabricados com leite pasteurizado e inativação pelo calor do fosfato piridoxal, cofator para atividade das descarboxilases (LADERO et al., 2008).

Ladero et al. (2010) ao determinar a concentração de tiramina observou teores de 16,85 mg/100 g de tiramina em queijos fabricados com leite cru e 2,91 mg/100g em queijos fabricados com leite pasteurizado, ou seja uma concentração cinco vezes menor. Desta forma, as bactérias endógenas do leite cru podem contribuir na formação de amina.

As BAL têm sido relatadas como principais micro-organismos responsáveis pela presença de AB em alimentos fermentados, incluindo os queijos, sendo que várias espécies tem sido descritas como produtores de AB (MARTÍN et al., 2005; BONETTA et al., 2008; LADERO et al., 2012). Contudo, é difícil estabelecer uma correlação direta entre a o aumento da concentração de AB em queijo com o aumento de um grupo ou população específica de BAL em razão da capacidade de

produção de AB está relacionada com a estirpe produtora e não somente com a espécie (NOVELA-RODRIGUEZ et al., 2002) e o uso de métodos não específicos para a identificação destas estirpes (LINARES et al., 2012).

Como já citado, a histamina foi quantificada ao longo da maturação em todos os tempos avaliados em ambos os queijos. Sua cinética ao longo da maturação está apresentada na figura 4.

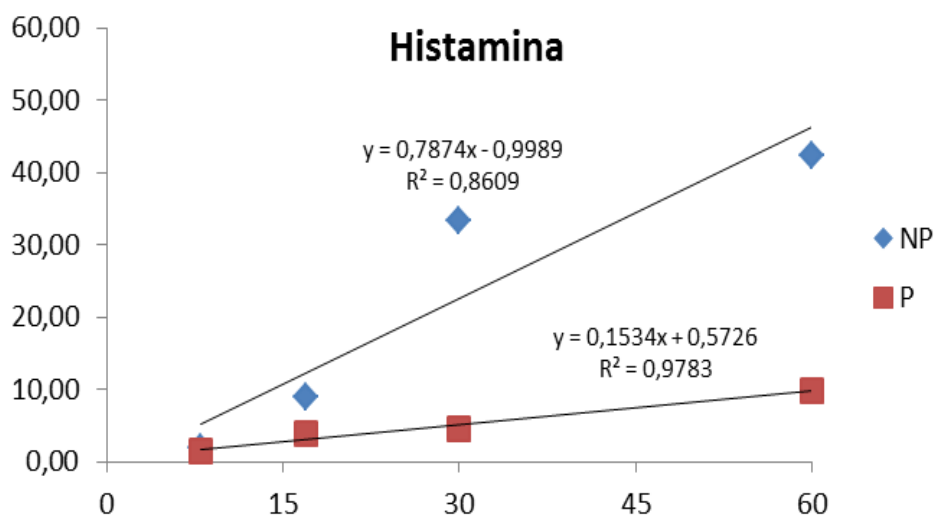


Figura 4. Evolução na concentração de histamina em queijos Minas artesanal fabricado com leite cru (NP) e leite pasteurizado (P) ao longo da maturação

O comportamento da concentração de histamina foi ajustado em um modelo linear simples em ambos os queijos. Obteve-se uma correlação positiva entre a concentração de histamina com o tempo de maturação no queijo NP ($\rho=0,93$) e P ($\rho=0,759$). Esse resultado indica que quanto maior o tempo de maturação, maior a concentração de histamina no queijo. A diferença na concentração de histamina entre os queijos possivelmente está relacionada com a menor atividade proteolítica no queijo P, no que resultou em uma menor disponibilidade de substrato, assim como uma menor população com capacidade de síntese de histamina.

É comum a alta concentração de histamina em queijos maturados por longos períodos em função da proteólise que ocorre durante a maturação que aumenta a concentração e acúmulo de histamina no queijo (FERNÁNDEZ et al., 2006b; LADERO et al., 2008).

Espécies pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são considerados os principais produtores de histamina em queijos (SCHIRONE et al., 2012). Esse gênero

microbiano, classificado como bactérias NSLAB mantém sua população estável ao longo de todo o processo de maturação, contribuindo na definição das propriedades sensoriais em queijos.

No presente estudo, a população de *Lactobacillus* não diferiu estatisticamente ($P < 0,05$) entre os queijos NP e P. Visto que a população é quantitativamente similar, a possível explicação para a diferença na concentração de histamina entre os queijos está relacionada com a disponibilidade de substrato, sendo esta menor no queijo P em decorrência da menor intensidade da proteólise nesse queijo. Baixas concentrações de histidina estão presentes no leite cru. Entretanto, a proteólise durante a maturação pode liberar uma elevada concentração desse aminoácido (HINZ et al., 1956).

A partir dos resultados, foi possível observar o acúmulo de histamina ao longo da maturação, e sua relação com o período de maturação. Dessa forma, obtêm-se uma faixa entre 8,65-9,29 mg/100 g de histamina para o queijo NP e 2,59-3,53 mg/100 g para o queijo P com 17 dias de maturação, período mínimo preconizado para garantir a segurança dos queijos minas artesanais fabricados com leite cru produzidos na região do Serro. Além disso, esses valores poderiam atuar como variáveis descritivas quanto ao tipo de queijo produzido (com leite cru ou leite pasteurizado).

4. Conclusão

As condições físico-químicas do queijo, associadas à composição e metabolismo da microbiota influenciam diretamente no perfil de aminas bioativas. Diante dos resultados, a proteólise é determinante na concentração das aminas nos queijos, visto que a partir do conjunto de reações que envolvem a hidrólise das proteínas em peptídeos e aminoácidos, disponibilizam substratos a serem descarboxilados pelas enzimas descarboxilase, originando as AB. O período de maturação propicia um acúmulo dessas aminas nos queijos, em razão da proteólise ser intensificada ao longo da maturação. O queijo NP pode ser caracterizado pela maior concentração das aminas putrescina, cadaverina, histamina, tiramina e fenilalanina e o queijo P pela concentração de triptamina, essa quantificada somente no queijo P. A histamina apresentou potencial como parâmetro na determinação do período de maturação para o queijo Minas artesanal, em função de seu acúmulo ao

longo da maturação, demonstrando ser uma variável complementar viável na garantia de um produto seguro para o consumidor.

5. Referências bibliográficas

BORGES, M.F.; ARCURI, E.F.; PEREIRA, J.L.; FEITOSA, T.; KUAYE, A.Y. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **BOLETIM CEPPA**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BUNKOVA, L.; BUNKA, F.; MANTLOVA, G.; CABOLVA, I.; SEDLACEK, P. SVEC, P.; PACHLOVÁ, V.; KRÁČMAR, S. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and cadaverine in Edam-cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 880-888, 2010.

BURDYCHOVÁ, R.; KOMPRDA, T. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. **FEMS Microbiological Letters**, v. 276, p. 149-155, 2007.

BONNETTA, S.; BONETTA, S.; CARRARO, E.; COÏSSON, J. D.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M. Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 205-209, 2008.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G.; RANSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.25, p.392-399, 2008

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

FERNÁNDEZ, M.; LINARES, D.M.; DEL RIO, B.; LADERO, V.; ÁLVAREZ, M.A. HPLC quantification of biogenic amines in cheeses: correlation with PCR-detection of tyramine-producing microorganisms. **Journal Dairy Research**, v.74, p.276–282, 2007a.

FERNÁNDEZ, M.; LINARES, D.M.; RODRÍGUEZ, A.; ÁLVAREZ, M.A. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA655. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 73, p. 1400-1406, 2007b.

FERNÁNDEZ, M.; DEL RÍO, B.; LINARES, D.M.; MARTÍN, M.C.; ÁLVAREZ, M. A. Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 3763-3769, 2006.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; TOMILLO, E.J.; NUÑEZ, M. Formation of biogenic amines in raw milk Hispanico cheese manufactured with proteinases and different levels of starter culture. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1551-1555, 2000.

FLICK, G.J.; GRANATA, L.A. Biogenic Amines in Foods. In: Dabrowski W. M., Sikorski Z. E. (Eds.). **Toxins in Food. Chemical and Functional Properties of Food Components Series**. CRC Press. p.121-154, 2005.

GLÓRIA, M.B.A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. **Handbook of Food Science Technology and Engineering**. New York, Marcel Dekker, Cap.13. p.38, 2005.

GLORIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v.1, p. 258-270, 2007.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends Food Science Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HINZ, P.C.; SLATTER, W.L.; HARPER, W.J. A survey of various free amino and fatty acids in domestic Swiss cheese. **Journal Dairy Science**, v. 39, p. 235-244, 1956.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H. A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS. **BERGEY'S manual of determinative bacteriology**. S.T. 3^a ed., Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. International Edition, 1994.

INNOCENTE, N.; D'AGOSTIN, P. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1498-1501, 2002.

LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; SÁNCHEZ-LLANA, E.; CAÑEDO, E.; MARTÍN, M.C.; ÁLVAREZ, M. A. Is biogenic amines production a strain-dependent trait in enterococci? **Food Microbiology**, v.30, p. 132-138, 2012.

LADERO, V.; FERNÁNDEZ, M.; CUESTA, I.; ÁLVAREZ, M.A. Quantitative detection and identification of tyramine-producing enterococci and lactobacilli in cheese by multiplex qPCR. **Food Microbiology**, v. 27, p. 933-939, 2010.

LADERO, V.; LINARES, D. M.; FERNÁNDEZ, M.; ÁLVAREZ, M.A. Real time quantitative PCR detection of histamine-producing lactic acid bacteria in cheese: relation with histamine content. **Food Research International**, v. 41, p. 1015-1019, 2008.

LINARES, D. M.; MARTÍN, M. C.; LADERO, V.; ÁLVAREZ, M.A.; FERNÁNDEZ M. Biogenic amines in dairy products. **Critical Review Food Science Nutrition**, v. 51, p. 691-703, 2011.

MACHADO, E.C.; FERREIRA, C.L.L.F.; FONSECA, L.M.; SOARES, F. M.; JUNIOR, F.N.P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24(4), p. 516-521, 2004.

MARTÍN, M.C.; FERNÁNDEZ, M.; LINARES, D.M.; ÁLVAREZ, M.A. Sequencing, characterization and transcriptional analysis of the histidine decarboxylase operon of *Lactobacillus buchneri*. **Microbiology**, v. 151, p. 1219-1228, 2005.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro**. Viçosa: UFV. 2006. 158p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; TORRIANI, S.; MASTROCOLA, D.; SERIO, A.; CHAVES-LÓPEZ, C.; SCHIRONE, M.; SUZZI G. Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 571-578, 2005.

NOVELLA-RODRÌGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; IZQUIERDO-PULIDO, M.; VIDAL-CAROU, M.C. Distribution of biogenic amines and polyamines in cheese. **Journal of Food Science**, v.68, p. 750–755, 2003.

NOVELLA-RODRÌGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; ROIG-SAGUÉS, A.X.; TRUJILLO-MESA, A.J.; VIDAL-CAROU, M. C. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2471-2478, 2002.

NOVELLA-RODRÌGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5117-5123, 2000.

PACHLOVÁ, V.; BUNKA, F.; FLASAROVÁ, R.; VÁLKOVÁ, P.; BUNKOVÁ, L. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. **Food Chemistry**, v.132, p. 1846-1854, 2012.

PAPAVERGOU, E.L. Biogenic amine levels in dry fermented sausages produced and sold in Greece. **Food Science**, v. 1, p. 1126-1131, 2011.

PERRY, K.S.P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PINTADO, A.I.E.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; PINTADO, M.M.E.; GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 631-640, 2008.

ROSEIRO, C.; SANTOS, C.; SOL, M.; SILVA, L.; FERNANDES, I. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 557-563, 2006.

SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 213-231, 1996.

SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; VISCIANO, P.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biogenic amines in Italian Pecorino cheese. **Front Microbiology**, v. 3, p.171, 2012.

SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; MAZZONE, G.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. **Food Microbiology**, v. 28, p. 128–136, 2011.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.

SILVA, P.H.F.; PINHEIRO, A.J.R.; GOMES, J.C.; PARREIRAS, J.F.M.; MOSQUIM, M.C.A.V.; FURTADO, M.M. Desenvolvimento de metodologia analítica para avaliação de proteólise em queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 295, v. 50. p. 15-29, 1995.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International of Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 41-54, 2003.

VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. **Food Chemistry**, v. 71, p. 259-266, 2000.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M.A. J.S. **Dairy technology. Principles of milk properties and processes**. Marcel Dekker, p. 37, 2002.

WOLFSHOON-POMBO, A.F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do Leite**. Rio de Janeiro, v. 51, nº 661, p. 1-8, 1983.

WOLKEN, W.A.; LUCAS, P.M.; LONVAUD-FUNEL, A.; LOLKEMA, J.S. The mechanism of the tyrosine transporter TyrP supports a proton motive tyrosine decarboxylation pathway in *Lactobacillus brevis*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, p. 2198-2206, 2006.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados do presente estudo, foi possível observar o fenômeno do antagonismo das bactérias presentes no leite cru sobre o crescimento de patógenos, com destaque a população de *S. aureus*. O tratamento térmico no qual o leite foi submetido (63°C/30 min) afetou a dinâmica da microbiota presente no leite cru, o que resultou em alterações nas propriedades físico-químicas, reológicas e no perfil de ácidos orgânicos e de aminas bioativas no queijo.

Essa alteração influenciou a inocuidade dos QMA, visto que o queijo tradicionalmente feito com leite cru estaria próprio para consumo com 20 dias de maturação enquanto o queijo feito com leite pasteurizado necessitaria de 35 dias para atender a legislação referente a contagem de *S. aureus* (10^2 ufc g⁻¹), micro-organismo utilizado como parâmetro no estabelecimento do período mínimo de maturação para os queijos Minas artesanais. Entretanto, seria interessante verificar esse mesmo fenômeno em um número maior de amostras, visto que o presente estudo não foi delineado com para essa finalidade, mas para avaliar o papel da microbiota endógena no antagonismo de possíveis contaminantes e patógenos comuns em queijos fabricados com leite cru.

Além disso, foi possível estabelecer uma relação da concentração da histamina com o período de maturação dos QMA. Assim, um queijo maturado pelo período mínimo de 17 dias, apresentaria concentração entre 8,65-9,29 mg/100g de histamina. Esse resultado sugere a possibilidade da utilização da determinação de aminas bioativas como uma variável complementar na garantia que o QMA esteja sendo comercializado com o período mínimo previamente estabelecido pela legislação, o que garantiria um produto mais inócuo para o consumo.

De forma geral, ao pasteurizar o leite, obtêm-se um novo produto, um tipo de queijo artesanal com propriedades diferente do tradicional queijo Minas artesanal em função da alteração na composição dos micro-organismos presentes na microbiota do leite cru pós pasteurização.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBENZIO, M.; CORBO, M.R.; REHMAN, S.U.; FOX, P.F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 35-48, 2001.

ARAÚJO, R.A.B.M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. Viçosa: UFV, 2004. 148p. Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, 2004.

AWAD, S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. **Food Chemistry**, v.97, p. 394-400, 2006.

AYAD, E.H.E.; VERHEUL, A.; WOUTERS, J.T.M.; SMIT, G. Antimicrobial producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. **International Dairy Journal**, v.12, n. 2-3, p. 145-150, 2002.

BARDÓCZ, S. Polyamines in foods and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BEVILACQUA, A.E.; CALIFANO, A.N. Changes in organic acids during ripening of Port Salut Argentino cheese. **Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 345-349, 1992.

BONNETTA, S.; BONETTA, S.; CARRARO, E.; COÏSSON, J.D.; TRAVAGLIA, F.; ARLORIO, M. Detection of biogenic amine producer bacteria in a typical Italian goat cheese. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 205–209, 2008.

BORELLI, B. M. **Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus enterotoxigênicos* durante a fabricação do queijo Minas curado produzido na Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 2006. 119p. Tese de doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Instrução Normativa N° 57, de 15 de dezembro de 2011. **Estabelece critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais**. Brasília, p. 23, 16 de dezembro de 2011. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa N° 68**, de 12 de dezembro de 2006.

BUFFA, M.; BUENAVENTURA, G.; SALDO, J.; TRUJILLO, A.J. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. **Lebensmittel-Wissenschaft-und-Technologie**, v. 37, p. 247-253, 2004.

BUŇKA, F.; ZÁLEŠÁKOVÁ, L.; FLASAROVÁ, R.; PACHLOVÁ, V.; BUDINSKÝ, P.; BUŇKOVÁ, L. Biogenic amines content in selected commercial fermented products of animal origin. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science**, v.2, n. 1, p. 209-218, 2012.

CABEZAS, L.; POVEDA, J.M.; SÁNCHEZ, M.I.; PALOP, M.LL. Physico-chemical and sensory characteristics of Spanish goat cheeses. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 48–55, 2005.

CALIFANO, A.N.; BEVILACQUA, A.E. Multivariate analysis of the organic acids content of gouda type cheese during ripening. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 949-960, 2000.

CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R.; DE SENA, M.J.; DOS SANTOS, D. A.; DE FARIA, M.E.; PENA, C.; JETT, M.; HENEINE, G. Food poisoning due to enterotoxigenic *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, J. D. G.; BRUNO, L. M.; NASSU, R. T.; LIMA, C. P.; VASCONCELOS, N. M.; KUAYE, A. Y. Bactérias ácido lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 60, n. 345, p. 221-224, 2005.

CIE. **Commission Internationale de l'Éclairage. Colorimetry**. Vienna: CIE publication, 2 ed., 1996.

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. 01-20, 2001.

COPPOLA, S.; BLAIOTTA, G.; ERCOLINI, D. Dairy products In: L. Coccolin, D. Ercolini (Eds.), **Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods**, Springer, New York (2008), pp. 31–90

CURTIN, A.C.; GOBBETTI, M.; MCSWEENEY, P.L.H. Peptidolytic, esterolytic and amino acid catabolic activities of selected bacterial strains from the surface of smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 76, p. 231–240, 2002.

DALIÉ, D.K.D.; DESCHAMPS, A.M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria – Potencial for control of mould growth and mycotoxins: A review. **Food Control**, v. 21, p. 370-380, 2010.

DELBES-PAUS, C.; DORCHIES, G.; CHAABNA, Z.; CALLON, C.; MONTEL, M.C. Contribution of hydrogen peroxide to the inhibition of *Staphylococcus aureus* by *Lactococcus garvieae* in interaction with raw milk microbial community. **Food Microbiology**, v. 27, p. 924-932, 2010.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEIREN, L.; DEBEVERE, J. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 273-285, 2004.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E.J. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst, L.; Vandamme, E. J. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications**, p. 91–142, 1994.

DOLCI, P.; ALESSANDRIA, V.; ZEPPA, G. RANSIOU, K.; COCOLIN, L. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **Food Microbiology**, v.25, p.392-399, 2008.

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

FERNÁNDEZ, M.; LINARES, D.M.; RODRÍGUEZ, A.; ÁLVAREZ, M.A. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA655. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1400-1406, 2007.

FLICK, G. J.; GRANATA, L. A. Biogenic Amines in Foods. In: Dabrowski W. M., Sikorski Z. E. (Eds.). **Toxins in Food. Chemical and Functional Properties of Food**

Components Series. CRC Press. p.121-154, 2005.

FOX, P.F.; GUINEE, T.P.; COGAN, T.M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000

GALGANO, F.; SUZZI, G.; FAVATI, F.; CARUSO, M.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F., SALZANO, G., Biogenic amines during ripening in “Semicotto Caprino” cheese: role of enterococci. **International Journal of Food Science and Technology** , v. 36, p. 153-160, 2001.

GEORGE, S.M.; RICHARDSON, L.C.C.; PECK, M. W. Predictive models of the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 32, p. 73-90, 1996.

GHRAIRI, T.; FRERE, J.; BERJAUD, J.M.; MANAI, M. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. **Food Control**, v. 19, p. 162-169, 2008.

GIROTO, J.M.; MASSON, M.L.; HARACEMIV, S.M.C. Aminas biogênicas em embutidos cárneos e outros alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2010.

GLORIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v.1, p. 258-270, 2007.

GLÓRIA, M.B.A. Amines. In: HUI, H.; NOLLET, L.L. **Handbook of Food Science Technology and Engineering**. New York, Marcel Dekker, Cap.13. p.38, 2005.

GONZÁLEZ de LLANO, D.; RODRIGUEZ, A.; CUESTA, P. Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening—analysis by HPLC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 570-276, 1996.

GONZÁLEZ, L.; SACRISTÁN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J.M.; TORNADIJO, M. E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 592-597, 2010.

GONZÁLEZ, L.; SANDOVAL, H.; SACRISTÁN, N.; CASTRO, J.M.; FRESNO, J.

M.; TORNADIJO, M. E. Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. **Food Control**, v.18, p. 716-722, 2006.

GRAPPIN, R.; BEUVIER, E. Possible Implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 12, p.751-871, 1997.

GURIRA, O.Z.; BUYS, E.M. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. **Food Microbiology**, v. 22, p. 159-168, 2005.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HERNÁNDEZ, I.; BARRÓN, L.J.R.; VIRTO, M.; PÉREZ-ELORTONDO, F.; FLANAGAN, C.; ROZAS, U.; NÁJERA, A.I.; ALBISU, M.; VICENTE, M.S.; RENOBLES, M. Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 158-166, 2009.

HOLLAND, R.; LIU, S-Q.; CROW, V.L.; DELABRE, M.L.; LUBBERS, M.; BENNETT, M.; NORRIS, G. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavour: Milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6–9, p. 711-718, 2005.

HOLZAPFEL, W.H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International of Food Microbiology**, v.24, p.343-362, 1995.

HOLT, J.G; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H. A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS. **BERGEY'S manual of determinative bacteriology**. S.T. 3^a ed., Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. International Edition, 1994.

HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 165-178, 1993.

INNOCENTE, N.; D'AGOSTIN, P. Formation of biogenic amines in a typical semihard Italian cheese. **Journal Food Protection**, v. 65, p. 1498-1501, 2002.

IRLINGER, F.; MOUNIER, J. Microbial interactions in cheese: implications for

cheese quality and safety. **Current Opinion Biotechnology**, v. 20, p. 142-148, 2009.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artmedia. 2005. 711p.

KALAČ, P. Biologically active polyamines in beef, pork and meat products: a review. **Meat Science**, v. 73, n. 1, p. 1-11, 2006.

LADERO, V.; MARTÍNEZ, N.; MARTÍN, M. C.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. qPCR for quantitative detection tyramine-producing bacteria in dairy products. **Food Research International**, v.43, p. 289-295, 2010.

LAPA-GUIMARÃES, J.; PICKOVA, J. New solvent system for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. **Journal of Chromatography, A**, v. 1045, p. 223-232, 2004.

LUES, J.F.R. Organic acid and residual sugar variation in South African cheddar cheese and possible relationships with uniformity. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 819-825, 2000.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria, **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, p. 133–140, 2003.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro**. Viçosa: UFV. 2006. 158p. Tese de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal e dá outras providências**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002b. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 10 de junho de 2012.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. Decreto nº 44.864 de 01 de agosto de 2008. **Altera o regulamento da lei nº 14.185 de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Assembléia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2008. Disponível em: <<http://www.almg.gov.br/>>. Acessado em 10 de junho de 2012.

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J.P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184-197, 2005.

MORENO, I.; LERAYER, A. L.S.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F.
Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains.
Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, n. 3, p. 183-191, 2000.

MULLIN, W.J.; EMMONS, D.B. Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 30, n. 2, p. 147 – 151, 1997.

NOBREGA, J.E. **Biodiversidade microbiana, descritores Físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da serra da Canastra e do Serro, minas gerais**. Viçosa: UFV. 2012. 98p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2012.

NOBREGA, J.E. **Caracterização do fermento endógeno utilizado na fabricação do queijo Canastra no município de Medeiros, Minas Gerais, com ênfase em leveduras**. Viçosa: UFV. 2007. 82 p. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa, 2007.

NOVELLA-RODRIGUEZ, S.; VECIANA-NOGUES, M.T.; ROIG-SAQUES, A.X.; TRUJILLO-MESA, A.J; VIDAL-CAROU. M.C. Evaluation of biogenic amines and microbial counts throughout the ripening of goat cheeses from pasteurized and raw milk. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p. 245-252, 2004.

NOVELLA-RODRIGUEZ, S.; VECIANA-NOGUES, M.T.; ROIG-SAQUES, A.X.; TRUJILLO-MESA, A.J; VIDAL-CAROU. M.C. Influence of starter and nonstarter on the formation of biogenic amine in goat cheese during ripening. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2471-2478, 2002.

NOVELLA-RODRÍGUEZ, S.; VECIANA-NOGUÉS, M.T.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines and polyamines in milks and cheeses by ion-pair high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 5117-5123, 2000.

NOVICK, R.P.; GEISINGER, E. Quorum sensing in Staphylococci. **Annual Review Genetic**, v. 42, p. 541-564, 2008.

NOUT, M.J.R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, v. 27, n. 7, p. 291-298, 1994.

ORNELAS, E.A. **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. Belo Horizonte: UFMG. 2005. 65p. Dissertação de mestrado e Medicina Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais.

PAPAVERGOU, E.L. Biogenic amine levels in dry fermented sausages produced and sold in Greece. **Food Science**, v 1, p.1126-1131, 2011.

PARENTE, E.; MARTUSCELLI, M.; GARDINI, F.; GRIECO, S.; CRUDELE, M.A.; SUZZI, G. Evolution of microbial populations and biogenic amine production in dry sausages produced in Southern Italy. **Journal Applied Microbiology**, v. 90, p. 882-891, 2001.

PERRY, K.S.P. Cheese: chemical, biochemical and microbiological aspects. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p.293-300, 2004.

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

QUINTANS, N.G.; BLANCATO, V.; REPIZO, G.; MAGNI, C.; LÓPEZ, P. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. **Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications**, p, 65-88, 2008.

REGOSA, D.; GOVONI, L. **Repensar a tradição alimentar: comunidades, instituições e antropologia. O caso do Queijo artesanal Minas**. 2005. Disponível em:<[http://www.ram2009.unsam.edu.ar/GT/GT%201%20%E2%80%93Praticas%20Alimentarias%20e%20Intervenciones%20Antropol%C3%B3gicas.%20La%20Antropolog%C3%ADa%20de%20la%20Alimentaci%C3%B3n%20en/GT1%20-%20Ponencia\(Regosa\).pdf](http://www.ram2009.unsam.edu.ar/GT/GT%201%20%E2%80%93Praticas%20Alimentarias%20e%20Intervenciones%20Antropol%C3%B3gicas.%20La%20Antropolog%C3%ADa%20de%20la%20Alimentaci%C3%B3n%20en/GT1%20-%20Ponencia(Regosa).pdf)>.> Acesso em: 10 de outubro, 2012.

ROBINSON, R.K. **Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products**, 3. ed., 2002.

RODRIGUEZ, E.; ARQUES, J.L.; GAYA, P.; TOMILLO, J.; NUNEZ, M.; MEDINA, M. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 633-635, 2000.

ROSEIRO, C.; SANTOS, C.; SOL, M.; SILVA, L.; FERNANDES, I. Prevalence of biogenic amines during ripening of a traditional dry fermented pork sausage and its relation to the amount of sodium chloride added. **Meat Science**, v. 74, n. 3, p. 557–563, 2006.

SAAID, M.; SAAD, B.; HASHIM, N.H.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1356–1362, 2009.

SANTOS, M.H.S. Biogenic amines: their importance in foods. **Food Microbiology**, v. 29, p. 213–231, 1996.

SARANTINOPOULOUS, P.; ANDRIGHETTO, C.; GEORGALAK, M.D.; REA, M.C; LOMBARDI, A.; COGAN, T. M.; KALANTZOPOULOS, G.; TSAKALIDOU, E. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. **International of Dairy Journal**, v. 11, p. 621–647, 2001.

SBAMPATO, C.G.; ABREU, L.R.; FURTADO, M.M. Queijo gorgonzola fabricado com leite pasteurizado por ejetor de vapor e HTST: Parâmetros físico-químicos e sensoriais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n 1, p. 191–200, 2000.

SCHIRONE, M.; TOFALO, R.; MAZZONE, G.; CORSETTI, A.; SUZZI, G. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. **Food Microbiology**, v. 28, p. 128–136, 2011.

SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. **Food Microbiology**, v. 27, p. 691–697, 2010.

SHAKEEL-UR, R.; BANKS, J.M.; MCSWEENEY, P.L.H.; FOX, P.F. Effect of ripening temperature on the growth and significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese made from raw or pasteurized milk, **International Dairy Journal**, v. 10, p. 5–53, 2000.

SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675–690, 1996.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 591–610, 2005.

SUZZI, G.; GARDINI, F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. **International of Journal Food Microbiology**, v. 88, p. 41-54, 2003.

SMIT, G.; SMIT, B.A.; ENGELS, W.J.M. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 591–610, 2005.

TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M.; FIRA, D.; GOLIC, N.; STRAHINIC, I.; LOZO, J. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. **International Journal Food Microbiology**, v. 112, p. 230-235, 2006.

VALE, S.; GLORIA, M.B.A. Biogenicamines in Braziliancheeses. **FoodChemical**, v. 63,p. 343-348, 1998.

VALSAMAKI, K.; MICHAELIDOU, A.; POLYCHRONIADOU, A. Biogenic amine production in Feta cheese. **Food Chemical**, v. 71, p. 259-266, 2000.

WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A.J.S. **Dairy technology. Principles of milk properties and processes**. Marcel Dekker, p. 37, 2002.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F. Índice de proteólise em alguns queijos brasileiros. **Revista Boletim do leite**. Rio de Janeiro, v. 51, n. 661, p. 1-8, 1983.