

DINÂMICA POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus* PRODUTOR DE ENTEROTOXINA A INOCULADO EM QUEIJO PRATO

GISELE INOCÊNCIO PEREIRA

2006

GISELE INOCÊNCIO PEREIRA

**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus* PRODUTOR
DE ENTEROTOXINA A INOCULADO EM QUEIJO PRATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Gisele Inocêncio

Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina A
inoculado em queijo prato / Gisele Inocêncio Pereira. -- Lavras : UFLA, 2006.
85 p. : il.

Orientador: Roberta Hilsdorf Piccoli
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Queijo prato. 2. *Staphylococcus aureus*. 3. Enterotoxina. I. Universidade
Federal de Lavras. II. Título.

CDD-576.163

GISELE INOCÊNCIO PEREIRA

**DINÂMICA POPULACIONAL DE *Staphylococcus aureus* PRODUTOR
DE ENTEROTOXINA A INOCULADO EM QUEIJO PRATO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação Stricto Sensu em Microbiologia
Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 24 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

UFLA

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

DEDICATÓRIA

A Deus, pelas oportunidades alcançadas e pelo dom da vida.

À minha mãe, por todo incentivo, apoio, carinho e amor sempre a mim dedicados.

Ao meu pai, *in memoriam*, pelo exemplo, lições e amor jamais esquecido.

Aos meus irmãos, Deise e Fábio, pela amizade, apoio, confiança e amor.

Ao Paulo, pelo companheirismo, confiança e amor.

O SUCESSO

" Nasce da autoconfiança e da força de vontade daqueles que prosperam por uma oportunidade.
Provém de várias tentativas, não acontece por acaso.
Conta com as habilidades de resistência e decisão.
Com as responsabilidades vindas da concentração.
É progresso do trabalho de metas realizadas.
É conquista e desempenho de vantagens encontradas.
Pode engrandecer se dos lucros desfrutar.
A felicidade crescer se dele compartilhar."

Ofereço aos meus amigos que
sempre me apoiaram

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realização do mestrado.

À Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli e ao Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu, pela orientação, atenção e incentivo na realização deste trabalho, e pelos quais tenho grande admiração.

À CAPES, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

À Fundação André Tosello, que forneceu a cepa utilizada neste experimento.

Ao Laticínio Verde Campo, que forneceu o fermento e as embalagens utilizadas nas fabricações dos queijos.

À Fundação Ezequiel Dias (FUNED), que permitiu e auxiliou a realização das análises de enterotoxina estafilocócica.

Ao prof. Geraldo do Departamento de Veterinária da UFLA, pelo fornecimento do plasma.

Aos professores Dra. Rosane, Dr. Henrique, Dr. Luiz Ronaldo, que aceitaram fazer parte desta banca, e cujas considerações foram de grande importância.

Também à profa. Dra. Patrícia, que aceitou estar como suplente nesta banca.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Camila, Simone, Cleube, Alessandra, Vitor, Danila, Carol, Bel, Aline, Milagros e Danilo. Meu agradecimento especial à Maíra, Marina, Vinícius e Tales, por todo apoio e amizade e ao também Prof. Luiz.

Aos colegas do Laboratório de Laticínios, Diego, Alisson e Leonardo. Meu agradecimento especial à Cleuza, pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos amigos do mestrado, Thais, Patrícia, Felix, Sandra, Débora, João, Nina e Rômulo.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Evania, Márcia, Val, Halan, Jonas e Geraldo.

Aos amigos que, mesmo longe, estão sempre presente em minha vida, Nélio, Juliana, Rosinha, Renata e Jerusa.

Às amigas de República, Carol, Tatiana, Érica e Rafaela.

À Tacina, que tanto ajudou com as análises estatísticas.

À Magda, Ivani e Eliane, que sempre ajudaram e atenderam com atenção e um sorriso no rosto.

A todos os outros amigos e colegas, funcionários e professores que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

Agradeço especialmente à minha família, ao Carlos, à minha irmã Deise e ao meu irmão Fábio, e também a minha querida mãe, pelo incentivo, confiança e amor incondicional.

Ao Paulo, pela atenção, incentivo e amor sempre dedicado.

O meu agradecimento especial a quem permitiu que tudo fosse possível, agradeço a Deus.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	01
2 REFERENCIAL TEÓRICO	04
2.1 Qualidade microbiológica do leite e derivados.....	04
2.2 Gênero <i>Staphylococcus</i>	07
2.2.1 Características gerais dos <i>Staphylococcus</i>	07
2.2.2 Toxínose alimentar provocada por <i>Staphylococcus</i>	10
2.2.3 Enterotoxinas estafilocócicas.....	12
2.2.3.1 Tipos de enterotoxinas estafilocócicas.....	12
2.2.3.2 Detecção das estafilotoxinas.....	15
2.3 Produção e consumo de queijo.....	18
2.3.1 Maturação do queijo.....	19
2.3.2 Fatores que afetam a maturação do queijo.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Microrganismo utilizado para inoculação em leite pasteurizado.....	24
3.1.2 Padronização do inóculo.....	24
3.2 Obtenção do leite utilizado na fabricação dos queijos prato.....	25
3.3 Reativação de <i>Staphylococcus aureus</i> e inoculação no leite.....	26
3.4 Condução do Experimento.....	26
3.5 Fabricação dos queijos prato.....	26
3.5.1 Inoculação de <i>Staphylococcus aureus</i> no leite utilizado para a fabricação dos queijos	26
3.5.2 Ingredientes utilizados na fabricação do queijo prato	27
3.5.2.1 Fermento lático.....	27
3.5.2.2 Cloreto de cálcio.....	27

3.5.2.3 Coalho.....	27
3.5.2.4 Corante.....	27
3.5.3 Técnica de fabricação do queijo prato.....	28
3.5.4 Salga dos queijos.....	30
3.5.5 Maturação dos queijos.....	30
3.6 Análises físico-químicas do leite e do soro.....	30
3.6.1 pH.....	30
3.6.2 Acidez titulável.....	30
3.6.3 Densidade.....	30
3.6.4 Teor de gordura.....	31
3.7 Análise microbiológica do leite e do soro.....	31
3.7.1 Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.7.2 Quantificação de coliformes totais e termotolerantes.....	31
3.8 Análise do queijo prato.....	32
3.8.1 Análises Físico-químicas dos queijos.....	32
3.8.1.1 Gordura	32
3.8.1.2 Sal.....	32
3.8.1.3 pH.....	32
3.8.1.4 Acidez titulável.....	32
3.8.1.5 Umidade.....	33
3.8.1.6 Nitrogênio total (NT).....	33
3.8.1.7 Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS).....	33
3.8.1.8 Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP).....	33
3.8.2 Análises microbiológicas do queijo prato.....	34
3.8.3 Análise das cepas isoladas das amostras de queijos.....	34
3.8.3.1 Coloração de Gram.....	34
3.8.3.2 Teste de catalase.....	35
3.8.3.3 Produção da enzima coagulase em tubo.....	35

3.8.3.4 Fermentação do manitol.....	35
3.9 Análise das enterotoxinas estafilocócicas.....	35
3.9.1 Extração das enterotoxinas estafilocócicas.....	35
3.9.2 Certificação da produção de enterotoxina estafilocócica pela técnica de sensibilidade ótima em placa (OSP).....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Composição físico-química do leite utilizado na fabricação dos queijos prato.....	38
4.1.2 Composição físico-química do soro dos queijos prato fabricados.....	38
4.2 Composição físico-química do queijo prato.....	39
4.3 Análises microbiológicas do leite e do soro.....	46
4.4 Análises microbiológicas dos queijos.....	49
4.4.1 Desenvolvimento de <i>Staphylococcus aureus</i> no queijo prato.....	50
4.4.2 Detecção de enterotoxina “A” no queijo prato.....	54
4.4.3 Análise de coliformes totais e termotolerantes.....	57
5 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
ANEXOS.....	78

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

TABELA 1 Composição físico-química do leite utilizado nas fabricações dos queijos.....	38
TABELA 2 Composição físico-química do soro, obtida durante as fabricações dos queijos.....	39
TABELA 3 Composição média dos parâmetros físico-químicos dos queijos tipo prato fabricados, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem a adição de <i>S. aureus</i> , I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL e II 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i>	40
TABELA 4 Valores médios de gordura, em porcentagem, nas partes do queijo, para cada tratamento utilizado, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem a adição de <i>S. aureus</i> , I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL e II 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i>	41
TABELA 5 Valores médios de cloretos, em porcentagem, nas partes do queijo, para cada tratamento utilizado, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem a adição de <i>S. aureus</i> , I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i> inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.....	42
TABELA 6 Médias de pH dos queijos com relação as partes e ao tempo de maturação, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem a adição de <i>S. aureus</i> , I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i> inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.....	43
TABELA 7 Populações <i>Staphylococcus</i> , presente no leite e soro para cada um dos tratamentos, queijo controle, queijo I fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i> e queijo II com inóculo de 10^5 UFC/mL.....	46
TABELA 8 Valores médios de coliformes totais, apresentados em \log_{10}	

presentes no leite e soro para cada um dos tratamentos: queijo controle, queijo I fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e queijo II inoculado com 10^5 UFC/mL.....48

TABELA 9 Valores médios de coliformes termotolerantes, apresentados em \log_{10} , presentes no leite e soro para cada um dos tratamentos: queijo controle, queijo I fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e queijo II inoculado com 10^5 UFC/mL.....48

TABELA 10 Valores médios (\log_{10}) de *Staphylococcus aureus* obtidos para as diferentes parte de cada queijo em função do tempo de maturação, em que, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de *S. aureus* inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.....52

TABELA 11 Valores médios de coliformes totais nas partes do queijo, para cada queijo.....60

TABELA 12 Valores médios de coliformes termotolerantes nas partes do queijo, para cada queijo.....60

FIGURA 1 Fluxograma da fabricação do queijo prato (Furtado & Lourenço Neto, 1994).....	29
FIGURA 2 Determinação da concentração de enterotoxina por meio do método de sensibilidade ótima em placa (OSP).....	37
FIGURA 3 Aumento do nitrogênio solúvel nos tratamentos controle, queijo I (fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i>) e queijo II (fabricado com leite inoculado com 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i>), durante o período de maturação.....	44
FIGURA 4 Aumento do nitrogênio não protéico nos tratamentos controle, queijo I (fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i>) e queijo II (fabricado com leite inoculado com 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i>), durante o período de maturação.....	45
FIGURA 5 Colônias típicas de <i>Staphylococcus</i> isoladas do queijo fabricado com inóculo de <i>S. aureus</i> , em meio Baird-Parker, evidenciando-se as características da cultura, como coloração negra e halo transparente.....	50
FIGURA 6 Variação dos valores médios em \log_{10} para <i>Staphylococcus</i> nas diferentes regiões de cada queijo, em que C representa o queijo controle, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de <i>S. aureus</i> inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.....	51
FIGURA 7 Declínio do número de coliformes totais em todos os tratamentos, queijo controle e naqueles elaborados com leite adicionado de 10^3 e 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i> , em função do período de maturação dos queijos.....	57
FIGURA 8 Declínio do número de coliformes termotolerantes em todos os tratamentos, queijo controle e naqueles elaborados com leite adicionado de 10^3 e 10^5 UFC/mL de <i>S. aureus</i> , em função do período de maturação dos queijos.....	58

RESUMO

PEREIRA, Gisele Inocência. **Dinâmica populacional de *Staphylococcus aureus* produtor de enterotoxina A inoculado em queijo prato**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O leite e seus derivados, constantemente, têm sido associados a surtos de toxinfecções alimentares em todo o mundo, sendo os *Staphylococcus aureus* um dos principais responsáveis por estas toxinfecções. A importância do *S. aureus* sob o ponto de vista de saúde pública tem sido evidenciada pela sua capacidade de produzir enterotoxinas, substâncias termoestáveis, capazes de persistir no produto final. Este trabalho buscou avaliar a produção da enterotoxina A (SEA) em queijos tipo prato, traçando o perfil da concentração de *S. aureus* e a consequente presença desta enterotoxina distribuída espacialmente no produto durante o período de maturação do queijo prato. Os queijos foram fabricados utilizando-se três tratamentos: controle, leite inoculado com 10^3 UFC/mL e leite inoculado com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*. A certificação da produção de enterotoxinas estafilocócicas foi realizada pela técnica de sensibilidade ótima em placa (OSP). Os resultados das contagens de *Staphylococcus aureus* nos queijos não apresentaram diferença significativa entre a amostragem espacial dos queijos. Também não ocorreu variação significativa na população de *S. aureus* presente nos queijos durante todo o período de maturação. A produção de SEA não foi detectada em nenhum dos tratamentos realizados neste trabalho, durante o período de maturação. De modo geral, a produção de enterotoxinas é detectada quando a população de *S. aureus* atinge concentrações de 10^5 UFC/g, entretanto, ocorreu perda do inóculo utilizado no leite para o soro durante a fabricação, diminuindo a população remanescente no queijo. Os valores de pH dos queijos e a temperatura utilizada durante a maturação possibilitaram a manutenção da

população de *S. aureus*, porém, não são considerados valores ótimos para o crescimento e a produção de toxinas requeridos por estes microrganismos. Provavelmente, as condições adversas, assim como o acúmulo de subprodutos, como ácido lático produzido pelas bactérias do fermento, poderiam estar atuando interferindo ou, mesmo, inibindo o crescimento destes microrganismos no queijo prato.

* Comitê Orientador: Prof^a. Dr^a. Roberta Hilsdorf Piccoli (Orientadora)
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

ABSTRACT

PEREIRA, Gisele Inocência. **Population Dynamics of enterotoxin A – producing *Staphylococcus aureus* inoculated in prato cheese**. 2006. 85 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Milk and dairies have constantly been associated with outbreaks of food toxoinfections all over the world, *Staphylococcus aureus* being one of the main responsible for these toxoinfections. The importance of *S. aureus* under the viewpoint of public health has been stood out by their capacity of producing enterotoxins, heat-stable substances, capable of persisting in the final product. This work sought to evaluate the production of enterotoxin A (SEA) in Prato-type cheeses, drawing the profile of the concentration *S. aureus* and the consequent presence of this enterotoxin distributed spatially in the product throughout the maturation period of the prato cheeses. The cheeses were manufactured by utilizing three treatments: Control, milk inoculated with 10^3 UFC/mL and milk inoculated with 10^5 UFC/mL of *S. aureus*. The certification of the production of staphylococcic enterotoxins was accomplished by the optimum sensitivity in plate (OSP) technique. The results of the counts of *Staphylococcus aureus* in the cheeses presented no significant difference among the spatial sampling of the cheeses. Also, no significant variation in the population of *S. aureus* present in the cheeses during all the maturation period occurred. The production of SEA was not detected in any of the treatments performed in this work during maturation period. In general, the production of enterotoxins is detected when the *S. aureus* population reaches concentrations of 10^5 UFC/g, nevertheless, loss of inoculum utilized occurred in the milk utilized for whey during manufacturing, decreasing the remaining population in the cheese. The pH values of the cheeses and the temperature utilized during

maturation enabled the maintenance of the *S. aureus* population, but they are not considered optimum values for growth and toxin production demanded by these microorganisms. Likely, the adverse conditions as well as the accumulation of by-products as lactic acid produced by yeast bacteria could be acting by interfering or even inhibiting the growth of these microorganisms in prato cheese.

* Guidance Committee: Prof Dr. Roberta Hilsdorf Piccoli (Adviser)
Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados são consumidos por praticamente todos os setores da população, especialmente por crianças, tornando a qualidade e inocuidade destes produtos imprescindíveis para a segurança alimentar.

Nos últimos anos, a indústria produtora de queijos obteve o maior crescimento, em kilogramas, de produtos fabricados e consumidos que qualquer outro segmento da indústria de alimentos (Mendonça, 2003). A produção de queijo prato vem crescendo no Brasil, ocupando o segundo lugar na produção de queijos (Costa, 2002). No entanto, o controle e a segurança da qualidade destes alimentos têm sido grandes desafios colocados à indústria queijeira.

Alguns microrganismos encontrados no leite e no queijo podem ser responsáveis por toxinfecções alimentares, destacando-se *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella sp.* As doenças provocadas por estes microrganismos, transmissíveis ao homem, podem ser de origem ambiental do próprio animal, da indústria, do manuseio inadequado do leite e de doenças que afetam o animal, como a mastite. A presença destes microrganismos indesejáveis no leite e seus derivados traz prejuízos à indústria e à saúde. Em queijos, diversos são os relatos de toxinfecções causadas por estafilococos, destacando-se os *S. aureus*. Portanto, a pesquisa deste microrganismo assim como a produção de enterotoxinas no alimento, tornou-se importante ferramenta para o controle da qualidade e segurança alimentar.

A importância do *S. aureus*, sob o ponto de vista de saúde pública, tem sido evidenciada por meio de levantamentos epidemiológicos, relacionando-o a toxinfecções alimentares relatadas em todo o mundo. *S. aureus* tem sido relatado como um dos principais microrganismos contaminantes do leite cru no Brasil e no mundo e várias pessoas têm sido vítimas de toxinfecções alimentares

causadas pela ingestão de alimentos contendo enterotoxina estafilocócica. Este microrganismo pode ser eliminado em processos de tratamentos térmicos como a pasteurização e a esterilização comercial. Entretanto, o que o torna problemático com relação à saúde pública é sua capacidade de produzir enterotoxinas, que são substâncias consideradas termoestáveis e se responsabilizam pela toxiose estafilocócica.

As enterotoxinas são proteínas de baixo peso molecular, produzidas por algumas espécies de estafilococos, particularmente de *Staphylococcus aureus*. Essas são classificadas, de acordo com suas propriedades antigênicas, em grupos: SEA, SEB, SEC (C1, C2, C3), SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL e SEM estando as enterotoxinas A e D frequentemente envolvidas em surtos de toxiose, podendo estar de forma isolada ou em combinação.

Sabe-se que *S. aureus* é microrganismo anaeróbio facultativo, imóvel e que tem a capacidade de se multiplicar em elevadas concentrações de cloreto de sódio e se desenvolver em ambientes com atividade de água de até 0,83, valor considerado inapropriado para o desenvolvimento de bactérias não halófitas, apresentando, portanto, maior crescimento em ambientes com alta atividade de água. Contudo, em queijo prato, nunca foi determinado seu perfil de crescimento e produção de toxina nas diferentes condições em que o alimento se apresenta, da região externa à interna, até seu centro, durante o período de maturação. Assim, a incógnita é se há ou não produção de toxina de forma homogênea no produto e se o crescimento de *S. aureus* é igual em todo o perfil da massa do queijo.

Objetivou-se, portanto, avaliar a produção de enterotoxinas presentes em queijos tipo prato, traçando o perfil da concentração de *S. aureus* e a conseqüente presença de enterotoxina A distribuída espacialmente no produto, durante o período de maturação do queijo prato. Não é conhecido o comportamento desta toxina na massa do queijo. As enterotoxinas são proteínas

de baixo peso molecular, portanto, é possível que ocorra migração na massa, podendo se estabelecer em determinadas regiões do mesmo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Qualidade microbiológica do leite e derivados

Freqüentemente, os alimentos de origem animal, especialmente leite e derivados, destacando-se os queijos, estão sendo associados a surtos de toxinfecção alimentar, representando grande problema para a saúde pública (Carmo et al., 2002).

O conceito de um alimento seguro é dado a partir da definição de risco significativo. A maior parte dos pesquisadores concorda que risco igual a zero é impraticável, devido à quantidade de produtos alimentícios disponíveis, à complexidade da cadeia de distribuição e à natureza humana. Os riscos de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos devem ser reduzidos ao máximo durante sua produção, para se obter um risco aceitável e de acordo com os padrões exigidos pela legislação (Richards, 2002).

A importância do *Staphylococcus aureus*, sob o ponto de vista da saúde pública, tem sido evidenciada por meio de levantamentos epidemiológicos, relacionando-o a toxinfecções alimentares relatadas em todo o mundo. *S. aureus* tem sido reportado como um dos principais microrganismos contaminantes do leite cru (Pereira, 1996) e também é considerado importante patógeno devido à combinação de virulência mediada por toxinas, poder de invasão e resistência antimicrobiana. A presença de *S. aureus* em alimentos processados representa risco potencial, uma vez que algumas cepas são produtoras de enterotoxina termoestável (Giannatale et al., 2005).

Segundo Veras et al. (2004), *S. aureus* e algumas espécies de estafilococos coagulase negativa foram os agentes mais freqüentes envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar estudados pela Fundação Ezequiel Dias, no período de

1997 a 2002, no estado de Minas Gerais. O queijo foi o alimento mais envolvido nestes surtos.

A íntima correlação existente entre a capacidade de *Staphylococcus* coagular o plasma sanguíneo e de provocar toxinose constitui um preceito normativo de análise, pelo fato desta enzima estar usualmente envolvida em surtos. A enzima coagulase tornou-se, assim, o metabólito de escolha e permanece, até hoje, sendo o preferencial indicador da capacidade enterotoxigênica para estafilococos (Tatine et al., 1976). Entretanto, dados da literatura têm mostrado, de certa forma, a existência de enterotoxinas produzidas por estafilococos coagulase negativos (Madani et al., 1998; Oliveira et al., 1995; Rozand et al., 1996; Veras et al., 2004). Crass & Bergdoll (1986) observaram a produção de enterotoxinas por estafilococos coagulase negativos, tendo algumas linhagens sido capazes de produzir SEA e SEC concomitantemente (Pereira, 1996).

A presença de *S. aureus* em produtos derivados do leite pode ser interpretada como indicativo de contaminação a partir da pele, boca e das fossas nasais dos manipuladores, bem como decorrente da limpeza e da sanificação inadequada dos materiais e dos equipamentos utilizados no processamento destes alimentos. Raddi et al. (1988) verificaram, em 48 manipuladores de alimentos, que 44,1% e 34,8% eram portadores de *S. aureus* em fossas nasais e mãos, respectivamente.

S. aureus também é um importante agente da mastite bovina, podendo ser facilmente encontrado em amostras de leite cru provenientes de rebanhos que apresentam mastite subclínica (Akineden et al., 2001). Estudos feitos por Freitas & Magalhães (1990) demonstraram que o *S. aureus* é um dos maiores causadores de mastite bovina, com índice elevado de infecção no rebanho leiteiro bovino.

A maioria dos surtos epidêmicos provocados por queijos contaminados com *S. aureus* apresenta população maior ou igual a 10^5 UFC/g, apesar de na literatura (Meyrand et al., 1999), serem encontrados dados sobre a presença de enterotoxina em alimentos contendo até 10^3 UFC/g de *S. aureus*. De acordo com a resolução RDC-nº12, do Ministério da Saúde (Brasil, 2001), o limite para estafilococos produtores de coagulase em queijos de médio teor de umidade é 10^3 UFC/g. Apesar da existência de padrões oficiais, a qualidade do queijo prato produzido em pequenos laticínios é, muitas vezes, incerta.

De modo geral, a qualidade microbiológica dos alimentos pode ser inferida por meio da contagem de bactérias do grupo coliformes. Este grupo é um grande indicador de higiene sanitária, principalmente em relação aos coliformes termotolerantes.

Os coliformes totais são bactérias em forma de bastonetes Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas, a 35°C. O grupo inclui tanto bactérias do trato gastrintestinal de humanos e outros animais de sangue quente, como também diversos gêneros e espécies de bactérias não entéricas, como *Serratia* e *Aeromonas* (Silva et al., 1997).

O grupo coliformes termotolerantes possui a mesma definição, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas, entre a 44,5°C a 45,5°C, selecionando apenas os coliformes de origem gastrointestinal, sendo a *Escherichia coli* a espécie mais representativa como indicação de contaminação fecal, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (Lázaro et al., 1999; Leclerc, 2002).

A presença destes microrganismos pode indicar má qualidade na pasteurização ou problemas de manuseio, uma vez que os materiais utilizados para a fabricação de queijos, tais como prensas, panos, tanques, bem como a

própria manipulação, podem funcionar como importantes meios de contaminação. As condições higiênico-sanitárias dos locais de fabricação de queijos devem seguir rigorosa fiscalização, para que tais problemas não interfiram na qualidade do produto final (Pinto, 1996).

Recomendações são dadas para a produção segura dos queijos, indicando a necessidade de se utilizar leite pasteurizado para minimizar riscos à saúde pública. Além desta, outras medidas são importantes para assegurar a produção de queijos livres de microrganismos, como coleta e manutenção do leite cru em boas condições de higiene. Caso o leite cru não seja utilizado imediatamente, deve ser refrigerado, para minimizar a multiplicação de microrganismos e boas condições de higiene devem ser mantidas desde a fabricação até a venda dos queijos aos consumidores, impedindo a contaminação (Adesiyun, 1994).

2.2 Gênero *Staphylococcus*

2.2.1 Características gerais dos *Staphylococcus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae e apresentam-se como cocos Gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 micrometro, imóveis, isoladas ou agrupadas em cachos. São anaeróbias facultativas (Chapaval, 2003; Kloss & Schleier, 1986).

Staphylococcus aureus é capaz de se desenvolver em uma ampla faixa de temperatura (7 °C a 48,5°C, com temperatura ótima de 30 °C a 37°C) (Schmitt et al., 1990), pH variando entre 4,2 e 9,3, com ótimo entre 7 a 7,5 (Bergdoll, 1989).

Considerando a atividade de água (*A_w*), os estafilococos são únicos, em sua capacidade, de crescer em valores inferiores aos normalmente considerados mínimos para as bactérias não-halófitas e são tolerantes a concentrações de 10%

a 20% de cloreto de sódio, em que o valor mínimo de Aw considerado atualmente é de 0,83 (Ferreira, 2003; Portocarrero, 2002; Tatine, 1973).

A capacidade de crescer em diferentes condições ambientais faz com que o *Staphylococcus aureus* se desenvolva com facilidade em vários alimentos e sua presença pode provir dos próprios manipuladores portadores de infecções piogênicas ou de portadores sãos que alojam estas bactérias no nariz, na garganta ou na superfície das mãos. Assim o portador de estafilococos enterotoxigênicos, como manipulador de alimentos representa elo indiscutível na cadeia epidemiológica da toxiose alimentar (Tranter, 1990). No que diz respeito aos animais, estes podem desenvolver infecções estafilocócicas e muitos carregam o microrganismo na narina e outros sítios anatômicos. Entretanto, a mais expressiva possibilidade de produção de enterotoxinas em alimentos por estafilococos transferidos da fonte animal está vinculada a animais com mastite (Akideden et al., 2001; Kloos, 1990;).

Os estafilococos apresentam algumas características bioquímicas importantes e que são utilizadas para a sua identificação em espécies. Produzem várias enzimas extracelulares, como a lipase, nuclease, catalase e coagulase, além das toxinas estafilocócicas (Madani, 1998).

O método clássico para contagem e diferenciação dos estafilococos é pelo uso de ágar de Baird-Parker. Seus agentes inibitórios, telurito, glicina e cloreto de lítio são eficientes para selecionar *S. aureus* e a gema de ovo adicionada ao meio permite a regeneração das células injuriadas, além de facilitar a diferenciação por meio da hidrólise da lipovitulina presente (Silva et al., 1997).

Uma das características relacionadas à enterotoxidade dos estafilococos é a presença de halo transparente (devido à ação da lecitinase e da lipase) quando inoculados em ágar Baird-Parker. A produção de outras enzimas como

coagulase e termonuclease, também constitui fator que permite classificar a linhagem como possível produtora de enterotoxina (Baird-Parker, 1990).

A ocorrência de linhagens não usuais, produtoras de enterotoxina, tem sido descrita na literatura, como o caso observado por Pereira, em 1996, envolvendo queijo minas frescal contaminado com *Staphylococcus aureus* em concentrações de $2,9 \times 10^8$ UFC/g, que apresentava, em ágar BP, colônias atípicas com ausência de lecitinase e lipase, produzindo 180ng de SEH/mL de fluido sobrenadante de cultura.

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas e divididas em duas categorias: coagulase positiva e coagulase negativa. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada importante como marcador de patogenicidade dos estafilococos (Behme et al, 1996).

Os estafilococos coagulase positiva têm sido utilizados como microrganismo indicador, apesar da produção de enterotoxinas por algumas espécies não produtoras de coagulase serem relatadas (Vernozy-Rosand et al, 1996). A coagulase livre é uma enzima produzida por algumas espécies de estafilococos, principalmente o *S. aureus*, que exerce um efeito clínico da coagulação do plasma humano e de outros animais, por ativação da protrombina, resultando na conversão do fibrinogênio em fibrina. Este teste tem sido largamente utilizado para identificação de *S. aureus* coagulase positiva e outras espécies produtoras ou não de coagulase (Chang & Huang, 1996; Madani et al., 1998).

Além da coagulase, outros fatores de virulência ou indicadores de patogenicidade são utilizados em microbiologia de alimentos, uma vez que, em se tratando de suspeitas de toxiose estafilocócica, a determinação da capacidade enterotoxigênica do agente etiológico constitui ponto crítico para o

fechamento de conclusões, no processo de investigação epidemiológica (Madani et al., 1998).

A enzima termonuclease (Tnase) é uma fosfodiesterase que se responsabiliza pela produção de 3' fosfo-mononucleotídeos, tanto pela clivagem de DNA como de RNA. Trata-se de uma proteína globular, que é constituída de uma cadeia polipeptídica simples e que não se associa a coagulase negativos, mas, à grande maioria de *S. aureus* coagulase positivos. A Tnase apresenta estabilidade térmica, sendo produzida por 99% dos estafilococos coagulase positivos, tornando-se outro importante critério para a identificação de *S. aureus* (Park et al., 1980).

Considerando que, mesmo em países desenvolvidos, poucos são os laboratórios que dispõem de condições técnicas para verificar a capacidade enterotoxigênica de estafilococos, bem como para efetuar a pesquisa de suas enterotoxinas no alimento, alguns critérios primários, como a produção de coagulase e termonuclease são os indicadores mais largamente aceitos para presuntiva evidência desta propriedade (Pereira, 1996).

2.2.2 Toxínose alimentar provocada por *Staphylococcus*

A toxínose alimentar é resultado da ingestão de enterotoxina estafilocócica pré-elaborada em substratos alimentícios, em decorrência de microrganismos presentes em densidade populacional situada entre 10^5 a 10^8 UFC/g ou mL. Entretanto, este dado tem variado conforme o autor. Alguns afirmam que é necessário uma população mínima de 10^5 UFC/g no alimento, necessária para produzir quantidade suficiente de enterotoxina a fim de causar toxínose (Aktar et al., 1996; Park et al., 1994).

Diversos surtos de toxínose estafilocócica foram descritos. Carmo e Bergodol, em 1990, relataram um surto em Belo Horizonte, MG, quando 60 pessoas que consumiram bolo recheado com creme e queijo apresentaram

sintomatologia característica. Os alimentos evidenciaram contagem bacteriana de 10^4 a 10^8 UFC/g, sendo que as toxinas encontradas foram SEA e SEB. Em queijo camembert produzido a partir de leite de cabra, Meyrand et al. (1999) observaram que a detecção da enterotoxina foi possível a partir de uma população inicial de 10^3 a 10^6 UFC/g, em níveis que variaram de 1 a 3,2 ng/g de queijo. Anunciação et al. (1994) inocularam cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxina A em níveis de 10^2 e 10^4 UFC/mL em leite pasteurizado para produção de queijo branco. A enterotoxina só foi detectada no queijo preparado com leite inoculado com 10^4 UFC/mL, após ter sido mantido por 5 horas a 27°C e esteve presente em todas as amostras de queijo.

Em Osaka, no Japão, ocorreu um surto provocado pela ingestão de produtos derivados do leite contaminados com *S. aureus*. Foi detectada a presença de enterotoxina A (SEA) previamente formada nos produtos. Supõe-se que a exposição do leite cru a um abuso de temperatura foi o fator determinante que permitiu o crescimento do *S. aureus* e a conseqüente formação da enterotoxina A (Asao et al., 2003).

Em sua forma biologicamente ativa, as enterotoxinas são termoestáveis. Esta característica das enterotoxinas torna a presença dos estafilococos nos alimentos ainda mais relevante, visto que a pasteurização, apesar de destruir células viáveis, é ineficiente para garantir a segurança alimentar, se houver enterotoxina previamente elaborada (Bergdoll, 1990).

Os sintomas clínicos causados pela ingestão do alimento contendo a toxina pré-formada aparecem rapidamente e são caracterizados por vômitos severos, diarréias, dores abdominais, sudorese e câibras. Podem ocorrer também dores de cabeça, calafrios, queda de pressão arterial e, ainda, febres, quando a quantidade de toxina ingerida for muito grande. O período de incubação pode variar, podendo ocorrer entre 30 minutos a 8 horas, sendo a média de 2 a 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (Bergdoll, 1990).

A resposta emética é devido a estímulo de receptores eméticos localizados no intestino e transmitido ao cérebro via vago e nervos simpáticos. Após a realização de ensaios em animais submetidos à vagotomia e simpatectomia, observou-se não haver resposta à ação das enterotoxinas (Tranter, 1990).

A dose tóxica mínima, em experimentos conduzidos com voluntários humanos, utilizando-se isoladamente enterotoxina purificada do tipo A, B e C, foi relatada como sendo de 0,05µg/homem de 70kg), dose esta suficiente para provocar vômito e diarreia (Bergdoll, 1989). Por sua vez, resultados de avaliação de alimentos implicados em surtos revelaram que quantidades de 0,125 a 0,250µg de “SE” por 100g de alimento poderiam provocar sintomas (Reiser et al., 1974). Entretanto foi em 1985, que, pela detalhada descrição de surto ocorrido em uma escola, nos Estados Unidos, Evenson et al (1988) propiciaram melhor estimativa sobre a real quantidade de “SE” necessária para ocasionar a doença em indivíduos sensíveis. Neste relato, 31,5% das crianças apresentaram sintomas de intoxicação estafilocócica, após a ingestão de leite achocolatado que continha 0,4 a 0,7 ng/mL, o que permitiu o estabelecimento de 100 a 200ng de “SEA” como sendo a dose tóxica (Pereira, 1996). Entretanto, não existe concordância entre os vários autores sobre a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar sintomatologia em seres humanos. De maneira geral, estima-se entre 0,015 e 0,375 µg de enterotoxina por quilo de massa corpórea. Características como idade e estado de saúde das pessoas também devem ser levadas em consideração (Franco & Franco, 1996).

2.2.3 Enterotoxinas estafilocócicas

2.2.3.1 Tipos de enterotoxinas estafilocócicas

Staphylococcus aureus produz numerosos fatores de virulência, incluindo toxinas citolíticas ou produtoras de lesão da membrana (alfa, beta, delta, gama e

leucocidina), bem como uma toxina esfoliativa, a toxina-1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e enterotoxinas (Dinges et al., 2000).

As enterotoxinas são proteínas simples de baixo peso molecular, 22 a 30KDa (Poli et al., 2002), produzidas por algumas espécies de estafilococos, particularmente de *S. aureus*. São caracterizadas como sendo proteínas simples, ricas em lisina, tirosina, ácido aspártico e glutâmico, constituídas por duas moléculas de cisteína formando uma ponte dissulfeto (Su & Wong, 1995). Apresentam uma alça de cistina que, aparentemente, é uma estrutura comum às enterotoxinas, pois todas elas possuem apenas dois resíduos de meia cistina. A seqüência de aminoácidos observada na alça de cistina pode ser diferente entre as enterotoxinas. Segundo Bergdoll & Robbins (1973), o sítio de toxicidade da molécula de enterotoxina parece estar relacionado com a seqüência de aminoácidos que envolvem os dois resíduos de cisteína, que formam a alça de cisteína por meio das pontes dissulfeto.

A abundância de literatura sobre enterotoxinas estafilocócicas (SEs) varia consideravelmente entre os tipos de enterotoxina. Até o presente, 14 diferentes tipos de SEs têm sido identificados, os quais compartilham similaridade na estrutura e na seqüência (Lê Loir, 2003).

As enterotoxinas estafilocócicas são classificadas, de acordo com suas propriedades antigênicas, em doze grupos: SEA, SEB, SEC (dividido em três subclasses SEC1, SEC2, SEC3, baseadas em seus pontos isoelétricos), SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ (Carmo, 2002; Gilligan, 2000). Lamaita et al. (2005) citaram três novos tipos de enterotoxinas descobertos recentemente, SEK (Orwin et al., 2000), SEL e SEM (Jarraud et al., 2001).

Os genes que codificam as SEs têm diferentes bases genéticas, sendo a maioria deles elementos genéticos móveis. Assim: Sea é carregado por meio de uma família de fagos temperados, Seb é localizado no cromossoma em alguns isolados clínicos, enquanto que, em outras cepas de *S. aureus*, ele é encontrado

na região de 750Kb de um plasmídeo; já a SEC é codificada por um gene localizado em uma ilha de patogenicidade (Fitzgerald et al., 2001). Os genes que codificam as enterotoxinas SEB, SEC, SEG, SEH E SEI são localizados nos cromossomos e os genes que codificam SEA e SED são associados com bacteriófagos e plasmídeos, respectivamente (Balaban, 2000; Gilligan, 2000).

De acordo com Bayles e Iandoo (1989), algumas enterotoxinas apresentam semelhança em sua seqüência de aminoácidos, tais como SEA e SEE, SEB e SEC. A SED é um pouco diferente das demais, apresentando maior similaridade com o grupo SEA e SEE.

A enterotoxina H (SEH) foi identificada por Su e Wong (1995). Ela é antigenicamente diferente de todas as enterotoxinas identificadas e não mostra reação cruzada com anticorpos preparados até então.

As enterotoxinas A e D são as que mais aparecem envolvidas em surtos de toxinfecção, podendo estar isoladas ou em combinação (Tranter, 1990).

Para a produção de enterotoxina em determinado meio, algumas condições devem ser adequadas, como atividade de água, pH, ausência de substâncias inibidoras e temperatura (Lindqvist, 2002). Fujikawa & Morozumi (2006) constataram que a taxa de produção de enterotoxina em leite aumentou linearmente com o aumento da temperatura entre 14 °C e 32°C.

A atividade de água ótima para que *Staphylococcus aureus* cresça é maior que 0,99, variando de 0,83 a acima de 0,99. O requerimento para a produção de enterotoxinas é similar, com uma variação de 0,86 a >0,99 e um ótimo acima de 0,99 (Scott, 1953 citado por Normanno, 2005). Portanto, altas concentrações de cloreto de sódio aumentam o efeito inibitório, com nenhuma produção de SE em concentrações de sal acima de 12%, independente do pH (Betley et al., 1992).

No estado ativo, as enterotoxinas resistem à ação de enzimas proteolíticas como pepsina, tripsina, quimi tripsina, papaína e renina (Bergdoll,

1983). Sua produção ótima ocorre em pH entre 6,14 e 7,95, sendo muito influenciada pelo meio, geralmente, a produção de SE é inibida em pH abaixo de 5,00 (Normanno, 2005).

As enterotoxinas estafilocócicas são altamente resistentes ao calor; entretanto, elas são mais resistentes no alimento do que em meio de cultura ou em condições de laboratório, mas podem ser inativadas por tratamentos térmicos usados na esterilização de alimentos. O tratamento sob temperatura elevada e em meio ácido leva, quase sempre, à perda da atividade imunológica e concomitante perda da atividade biológica. Entretanto, SEA e SED foram dadas como não detectáveis (perda da atividade sorológica), porém, ainda ativas (em ensaio vivo com filhotes de gatos) após tratamento em temperatura elevada (Bennet, 1992). A inativação de SEA, SEB e SEC pelo calor tem mostrado variar de acordo com a origem da matriz do alimento e como pH (Carmo et al., 2002). Dessa forma, existe certa dificuldade em estabelecer o impacto do tratamento, pela alta temperatura, na atividade das SE, uma vez que isto depende do tipo e da concentração das SEs e da matriz do alimento analisado

Segundo Baird-Parker (1990), as enterotoxinas estafilocócicas resistem a temperaturas de 121°C, por 3 a 8 minutos, não sendo inativadas pela temperatura utilizada no processamento dos alimentos, embora o microrganismo seja destruído.

2.2.3.2 Detecção das estafilotoxinas

Existem vários métodos para a detecção das enterotoxinas estafilocócicas, os quais são classificados em biológicos e imunológicos. Os métodos biológicos constituem na administração intraperitoneal ou intravenosa da enterotoxina em gatos jovens, e via oral em macacos do gênero *Rhesus*, os quais são tidos como modelos animais confiáveis, apesar de ocorrerem algumas reações não específicas (Robern & Gleeson, 1978). Devido à necessidade de

altas doses de enterotoxinas e às dificuldades de manutenção dos animais destinados para os testes, este método tornou-se praticamente inviável, passando a ser utilizados os métodos imunológicos (Leite, 2000).

Os métodos imunológicos baseiam-se no princípio de precipitação da reação antígeno-anticorpo. Estes testes fundamentam-se na capacidade do antígeno (enterotoxina) interagir com anticorpos policlonais específicos e de título próprio, permitindo a formação de um precipitado que se denomina precipitina. A união do antígeno- anticorpo, incorporados em uma placa de ágar ou agarose, determinará o aparecimento do precipitado, que se mostra como uma linha branca, de fácil leitura e observação. A distância percorrida por esta união é diretamente proporcional à quantidade de antígeno presente na amostra teste. Quando os dois componentes são dispostos, separadamente, no suporte de ágar ou agarose e se ambos se difundem um em direção ao outro, a técnica é denominada imunodifusão dupla. Por outro lado, quando só o antígeno se movimenta em direção ao anticorpo fixo, o método é denominado de imunodifusão simples (Bergdoll, 1990).

O limite de detecção para o método de dupla difusão em gel situa-se ao redor de 500 ng/mL, quando se utiliza o método modificado de Ouchterlony para placas de sensibilidade ótima (OSP) (Bergdoll, 1990). Por sua vez, esta metodologia foi considerada adequadamente sensível para a avaliação de linhagens enterotoxigênicas.

Atualmente, outros procedimentos que possam ser diretamente aplicados aos extratos de alimentos, tais como os ensaios RPLA e ELISA, os quais se baseiam no uso de anticorpos específicos, têm permitido níveis de detecção abaixo de 1µg/mL (próximo de 0,1 a 1,5ng/mL) (Rasooly & Rasooly, 1998).

O método aglutinação reversa passiva em látex ou RPLA, é o ensaio de aglutinação que utiliza anticorpos, purificados por cromatografia de afinidade e

recobertos por partículas de látex. De acordo com Adesiun et al (1994), sua sensibilidade é de 0,25ng/mL. Esse ensaio é bastante utilizado, por ser de fácil manuseio, o Kit é encontrado comercialmente, é semiquantitativo, as partículas de látex são dotadas de alta densidade, o que permite sua realização em até 12 horas, não necessitando de equipamentos sofisticados. Sua limitação reside na ocorrência de reações inespecíficas, as quais se apresentam como uma nuvem branca, interferindo na sensibilidade das partículas de látex sensibilizadas e partículas de látex controle. Pereira et al., em 1997, propuseram a forma que consiste na utilização de 5% de IgG normal e purificada de coelho para eliminação ou controle das reações inespecíficas. Para prevenção de tais reações, envolvendo cepas coagulase positivas ou negativas e produtoras usuais ou de diminutas quantidades de enterotoxinas, recomenda-se a adição, ao sobrenadante, de cultura 5% de IgG normal de coelho, IgG normal de novilha, carneiro e cavalo e, ainda, tratamento térmico do sobrenadante de cultura por 30 minutos a 70°C (Brabes, 1999).

O Elisa (Ridascreen) é um método imunoenzimático baseado na utilização de anticorpos de captura monovalentes que conferem a esse método grandes vantagens, destacando-se seu elevado grau de especificidade e sensibilidade (Park et al. 1994). A sensibilidade deste método está em torno de 0,1ng de toxina/mL, permitindo completá-lo em 8 horas, incluindo o tempo de extração. A vantagem deste método também é a detecção da toxina SEE (Enterotoxina Estafilocócica E), não identificada por outros métodos (Rasooly, 1998).

Oliveira e Hirooka (1996) indicaram o uso do RPLA, em se tratando de exame que envolva grande quantidade de amostras, devido à sua praticidade e o Elisa (Ridascreen) naqueles casos em que vieram a ocorrer reações inespecíficas que não puderam ser eliminadas, inviabilizando a obtenção de resultados utilizando-se RPLA .

A detecção direta de microrganismos em amostras de alimentos é a maior meta, segundo Olsen (2000), da tecnologia do PCR, mas isto é realmente difícil de se obter. Segundo este autor, o método de PCR pode produzir uma reação positiva para ácidos nucleicos de um organismo, mas, um pequeno volume de 5 a 10µl de cultura ou amostra que pode ser usada em uma reação, determina um limite de detecção tão alto quanto aproximadamente 10.000 células por mililitro. A direta detecção por meio do PCR foi, entretanto, bem sucedida em pouquíssimos casos.

2.3 Produção e consumo de queijo

O queijo é o derivado do leite que mais se difundiu pelo mundo e o que recebeu maiores modificações nas técnicas de elaboração. Em consequência disso, têm-se, hoje, centenas de tipos desse produto. É considerado excelente fonte de cálcio, fósforo e proteínas. Possui período de conservação muito superior ao do leite e, por ser um produto que possui ampla variedade, oferece ao consumidor possibilidade de escolher, dentre muitos, aquele que melhor lhe convier (Abreu, 1986).

A fabricação de queijos no Brasil é relativamente recente, tendo se firmado, do ponto de vista industrial, no início do século XX e, sobretudo, a partir da década de 1920, com a chegada de imigrantes dinamarqueses e holandeses que se estabeleceram, principalmente, na região Sul do estado de Minas Gerais (Abreu, 1986).

O queijo prato foi introduzido no Brasil por imigrantes dinamarqueses e originou-se dos queijos tybo e danbo, dinamarqueses e do gouda, holandês. Possui grande importância no meio comercial, sendo um dos mais populares, apreciados e consumidos no Brasil (Nabuco et al., 2004; Oliveira, 2001).

O queijo prato é tipicamente brasileiro e corresponde a, aproximadamente, 24% da produção total de queijos no país (ABIQ, 2002). É

fabricado, sobretudo, na região sudeste do país, onde possui diversas variedades e formatos. É conhecido também por prato cilíndrico, lanche, cobocó ou esférico. Seu formato varia do cilíndrico ao retangular, com peso variando entre 0,5 e 5,0kg. Ao corte, a massa apresenta-se amarelada, fina, macia e sem trincas. Pode ou não apresentar algumas olhaduras lisas, pequenas e arredondadas. Seu sabor é suave, apresentando alguma semelhança com o queijo gouda holandês. É consumido, sobretudo, em lanches e muito utilizado na preparação de sanduíches (Augusto et al., 1998; Furtado, 1992).

2.3.1 Maturação do queijo

A maturação envolve uma série de processos bioquímicos complexos, que podem ser agrupados em proteólise, lipólise e metabolismo da lactose/lactato. A extensão e o tipo de maturação dependem do tempo e da temperatura de estocagem, composição do queijo (teor de sal e umidade) e o tipo e atividade de enzimas e microrganismos presentes.

A maturação de queijos pode ser considerada como uma combinação de alterações na composição química e física da coalhada, dando origem a um produto com características próprias, quanto ao sabor, odor e consistência. A maturação pode ser influenciada pelo leite usado, pelo tipo de cultura, por modificações no processo de fabricação e por mudanças nas condições de estocagem do queijo (Kosikowsky, 1977).

Segundo Lawrence et al. (1987), a textura é considerada um dos fenômenos mais característicos da maturação e é dependente da proporção de caseína e umidade do queijo. As transformações no leite começam a ocorrer muito antes da fabricação do produto e são o resultado da ação e atividade de microrganismos e enzimas presentes naturalmente (ou não) no leite cru ou pasteurizado.

Na fabricação de queijos, a proteólise é a degradação necessária e desejada, sem a qual seria impossível a produção dos mesmos (Wolfschoon-Pombo, 1983). A taxa, a extensão e a natureza da proteólise, durante a maturação do queijo, tanto quanto a quantidade e a natureza dos produtos de degradação, variam de acordo com a enzima envolvida, o tipo e a composição do queijo e as condições ambientais de estocagem (Minussi, 1994).

A degradação das proteínas pode ocorrer pela atividade enzimática dos microrganismos, das enzimas do leite (plasmina) e por enzimas adicionais utilizadas para coagular o leite (coalho). Segundo Minussi (1994), a proteólise do queijo, inicialmente da caseína, é considerada como o fenômeno mais importante na maturação, pois afeta, de uma só vez, a textura, a consistência e o sabor.

O coalho envolvido no mecanismo de transformação da caseína em queijo pode ser considerado o primeiro agente proteolítico. Apenas 6% das enzimas do coalho são retidos na massa e elas continuam a atuar durante a maturação do queijo (Steele & Unlii, 1992).

A quimosina tem pequena contribuição nos estágios iniciais da degradação da caseína, particularmente hidrolisando a α s1-caseína, ao passo que a degradação da β -caseína pela quimosina é lenta e ocorre mais tarde no processo de maturação (Steele & Unlii, 1992).

A atividade proteolítica sobre a caseína durante a maturação do queijo advém de uma ação sinérgica em que os produtos de degradação liberados por certos agentes são usados por outros e o processo pode ser considerado uma cadeia de degradação.

As bactérias do fermento láctico promovem a liberação de peptídeos da caseína por meio de proteases que elas produzem (Costa, 2002). Para se obter o efeito desejado no queijo, microrganismos diferentes são usados conjuntamente; dependendo da mistura, o fermento pode ser exclusivamente acidificante ou

então acidificante e aromatizante. O queijo prato tradicional, se elaborado com técnica similar à dos queijos que lhe deram origem, como o gouda holandês ou o dambo dinamarquês, deve apresentar algumas olhaduras pequenas e regulares. Para conseguir essas características, a cultura lática, além da microbiota acidificante homofermentadora tipo “O”, largamente empregada no mundo todo, composta de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, contém ainda duas bactérias, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*, conhecidas como cultura tipo “LD”, que fermentam o citrato e a lactose do leite, gerando uma série de compostos, tais como diacetil, acetoina, dióxido de carbono, de importância relevante no sabor, aroma e textura do queijo prato (Furtado, 1991).

As bactérias do ácido láctico promovem liberação de peptídeos da caseína por meio de proteases que elas produzem, podendo, alguns desses peptídeos (hidrofóbicos) conferir gosto amargo aos queijos. Segundo Wolfschoon-Pombo (1983), algumas bactérias lácticas produzem grande variedade de peptídeos responsáveis pela liberação dos aminoácidos dos peptídeos produzidos pela ação de quimosina ou das peptidases do fermento (Fox et al, 1997).

A importância das peptidases do fermento está mais estritamente relacionada à fase secundária da proteólise, liberando pequenos peptídeos e aminoácidos livres.

Walstra et al. (1987) citam que as proteases do leite atuam sozinhas no queijo, podendo decompor a α 1 e β -caseína em alguma extensão durante a maturação prolongada, com o aparecimento de pequenas quantidades de peptídeos de baixo peso molecular e liberação de aminoácidos.

2.3.2 Fatores que afetam a maturação do queijo

Dentre os principais fatores que influenciam a atividade proteica em queijos, destacam-se os níveis de coalho residual e proteases nativas do leite,

relação sal/umidade, temperatura de maturação, tipo de coagulante usado e variações no pH durante a maturação (Costa & Pinheiro, 1998; Lawrence et al., 1987).

A temperatura de maturação é outro ponto importante, pois tem influência preponderante na atividade da cultura lática e na expansão dos gases durante a formação de olhaduras. A solubilidade do CO₂ na fase líquida do queijo aumenta à medida que se abaixa a temperatura de maturação e vice versa (Furtado, 2002).

A relação sal/umidade atua sobre o índice de proteólise no queijo. Concentrações altas de sal no queijo podem diminuir a intensidade de degradação protéica que, por sua vez, é induzida por alto teor de umidade. O paracaseinato de cálcio, principal constituinte da massa do queijo fresco, degrada-se melhor a, aproximadamente, 2% de sal no queijo prato. Portanto, um queijo com excesso de sal requer muito mais tempo para maturar (Furtado, 1992).

Como consequência do aumento na concentração de sal, ocorre abaixamento de atividade de água (Aw) e diminuição da disponibilidade de água para o crescimento bacteriano e para a degradação protéica na reação enzimática, caracterizadas, principalmente, pela hidrólise das ligações peptídicas (Surazinski & Peterson, 1973).

Segundo Furtado (2002), a umidade de queijo semiduro varia de 42% a 45%. Quanto maior o teor de umidade do queijo, maior será a dificuldade de formar olhos de tamanho médio, com tendência de formação de olhaduras menores e mais numerosas. Portanto, para se ter textura regular, o controle da umidade do queijo é fundamental.

O pH sofre redução durante a fase inicial da maturação, devido à produção do ácido láctico e de outros compostos, a partir da lactose, provenientes da ação dos microrganismos responsáveis pelas alterações de textura e sabor do

queijo. Após a fase inicial, observa-se aumento gradual do pH durante a maturação do queijo, resultante da destruição do ácido láctico, formação de subprodutos não dissociados ou de fraca dissociação e liberação de produtos alcalinos resultantes da proteólise (Nabuco et al., 2004; Oliveira, 2002).

A proteólise torna-se mais lenta em meio ácido, abaixo de pH 5,5. O papel regulador do pH é muito importante. Inúmeras enzimas microbianas, como endopeptidases, peptidases e descarboxilases, são mais ativas em torno de pH 5 a 6. O aumento do pH pode provocar aumento na degradação protéica. O fenômeno tem relação com o pH ideal de proteases bacterianas e também com aquelas enzimas do coalho, quimiosinas e pepsina. As variações de pH na maturação dependem muito do tipo de queijo e da microbiota utilizada. (Oliveira, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Laboratório de Laticínios do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e na Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

3.1 Microrganismo utilizado para inoculação em leite pasteurizado

A cepa bacteriana usada neste estudo foi *Staphylococcus aureus* (FRI 100 A) CCT 0676, produtora de enterotoxina A (SEA), gentilmente cedida pela Fundação André Tosello.

A verificação da produção de enterotoxina A, pela cepa *S. aureus* FRI 100 A, foi realizada por meio do teste Elisa (Ridascreen). A extração da toxina estafilocócica da cepa utilizada foi realizada da seguinte forma: a cepa foi repicada em caldo BHI (infusão cérebro coração) e incubada, por 24 horas, a 37°C para posterior inoculação de 0,5mL em ágar BHI 2x (concentração dupla), acrescido de 0,5% de extrato de levedura recoberto com membrana de diálise (Spectra/por *membrane dialysis tubing* – 6000- 8000) e incubado a 37°C, por 24 horas, de acordo com Davis & Lawrence, 1970.

Os crescimentos obtidos foram lavados com 2,5ml de solução tampão NaH₂PO₄ 0,01M pH 7,4 em três etapas, usando-se 1mL, 1mL e 0,5mL do tampão. O líquido obtido nesta lavagem foi centrifugado, durante 15 minutos, a 12.000 rpm, a 4°C, em centrífuga refrigerada. Após centrifugar, retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 100µL de Tiomesal-Lilly para conservação (Pereira et al, 1994).

Os extratos foram utilizados para a confirmação de produção da enterotoxina A por meio do Kit Elisa (Ridascreen), no qual 100µL da amostra

foram adicionados ao “pocinho” correspondente à identificação da enterotoxina A, incubando-se, durante uma hora, à temperatura ambiente. Fez-se a retirada da amostra com papel absorvente e a lavagem com 250µL de tampão de lavagem em três etapas. Posteriormente, adicionaram-se 100µL de enzima-conjugado no pocinho, seguido de outro período de incubação de uma hora. Realizou-se novamente a lavagem em três etapas com o tampão de lavagem e secagem com papel toalha. Adicionaram-se 50µL de substrato e 50µL de chromogênio, com incubação por 30 minutos, em ambiente escuro. Para finalizar a reação, foram adicionados 100µL de reagente de parada no pocinho e fez-se a leitura.

3.1.2 Padronização do inóculo

Para a obtenção de 10^3 e 10^5 UFC/mL de *S. aureus* em leite, foi realizada a padronização do inóculo, por meio da elaboração da sua curva de crescimento, medindo-se, de hora em hora, a densidade ótica, a 620nm, do caldo infusão cérebro coração (BHI), inoculado com o isolado de *S. aureus*. Foi também determinada a quantidade de células viáveis pela técnica de plaqueamento em microgota em ágar Baird Parker (BP). A incubação em meio BHI (infusão cérebro coração) da cepa de *S. aureus* por, aproximadamente, 8 horas a 37°C, apresentou absorbância em torno de 1,02 a 620nm. De acordo com a curva de crescimento, sabe-se que, nesta absorbância, têm-se cerca de $7,9 \times 10^8$ UFC/mL.

Os resultados da contagem e da absorbância permitiram a determinação da quantidade de inóculo utilizada para a obtenção de 10^3 e 10^5 UFC/mL de *S. aureus* em leite para posterior fabricação dos queijos prato

3.2 Obtenção do leite utilizado na fabricação dos queijos prato

O leite utilizado no experimento foi fornecido pela Cooperativa Agrícola Alto Rio Grande (CAARG), situada na cidade de Lavras, MG, a qual realizou o

controle de qualidade rotineiro, a padronização para 3,5% de gordura e a pasteurização do mesmo, pelo sistema HTST.

As fabricações dos queijos foram conduzidas utilizando-se 19 litros de leite em cada tratamento. Esta quantidade foi adequada para a obtenção de três queijos tipo lanche.

3.3 Reativação de *Staphylococcus aureus* e inoculação no leite

A cultura de *Staphylococcus aureus* foi reativada em caldo infusão cérebro-coração (BHI), incubada a 37°C, por 24 horas. Ao fim desta incubação, o inóculo foi submetido a análises de densidade ótica (absorbância), sendo os resultados da leitura utilizados para determinar as alíquotas deste caldo, de modo a obterem-se 10^3 e 10^5 UFC/mL de *S. aureus* no leite utilizado para a produção do queijo Prato.

3.4 Condução do experimento

O experimento foi realizado em três repetições. Para cada repetição, foram fabricados queijos utilizando três tratamentos: leite pasteurizado sem adição de *S. aureus*, leite pasteurizado com inoculação de 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e leite pasteurizado e inoculado com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*.

Para se avaliar os parâmetros microbiológicos e físico-químicos do queijo, foram coletadas amostras com a seguinte periodicidade D+1, D+15 e D+30, considerando-se D o dia em que os queijos foram retirados da salmoura.

3.5 Fabricação dos queijos prato

3.5.1 Inoculação de *Staphylococcus aureus* no leite utilizado para a fabricação dos queijos

Foram utilizados três tanques para a produção dos queijos. O controle foi fabricado com leite pasteurizado sem adição de *S. aureus*; queijo I, fabricado

com leite pasteurizado com inoculação de 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e queijo II, fabricado com leite pasteurizado e inoculado com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*. O leite foi aquecido a 32°C e adicionado de *S. aureus*. Amostras do leite foram retiradas para análises e, em seguida, foram adicionados os ingredientes utilizados para a fabricação dos queijos.

3.5.2 Ingredientes utilizados na fabricação do queijo prato

3.5.2.1 Fermento láctico

O fermento láctico utilizado no processo de fabricação do queijo foi o tipo “O” mesofílico composto de *Lactococcus lactis ssp. lactis* (5%) e *Lactococcus lactis ssp. cremoris* (95%). A quantidade utilizada foi de 1,5%, conforme recomendações do fabricante.

3.5.2.2 Cloreto de cálcio

Utilizou-se cloreto de cálcio em solução aquosa a 40% (p/v), Chr. Hansen Indústria e Comércio, na quantidade de 40 mL para cada 100 litros de leite.

3.5.2.3 Coalho

Utilizou-se coalho líquido comercial (Chr. Hansen) na quantidade de 40mL para 100 litros de leite, para a coagulação do leite em, aproximadamente, 40 minutos.

3.5.2.4 Corante

Foi utilizado corante natural de urucum (Chr. Hansen) diluído em água. Empregaram-se 8 mL de corante para 100 litros de leite.

3.5.3 Técnica de fabricação do queijo prato

Os processos de fabricação dos queijos prato seguiram a técnica de fabricação utilizada por Furtado & Lourenço Neto (1994), conforme fluxograma apresentado na Figura 1.

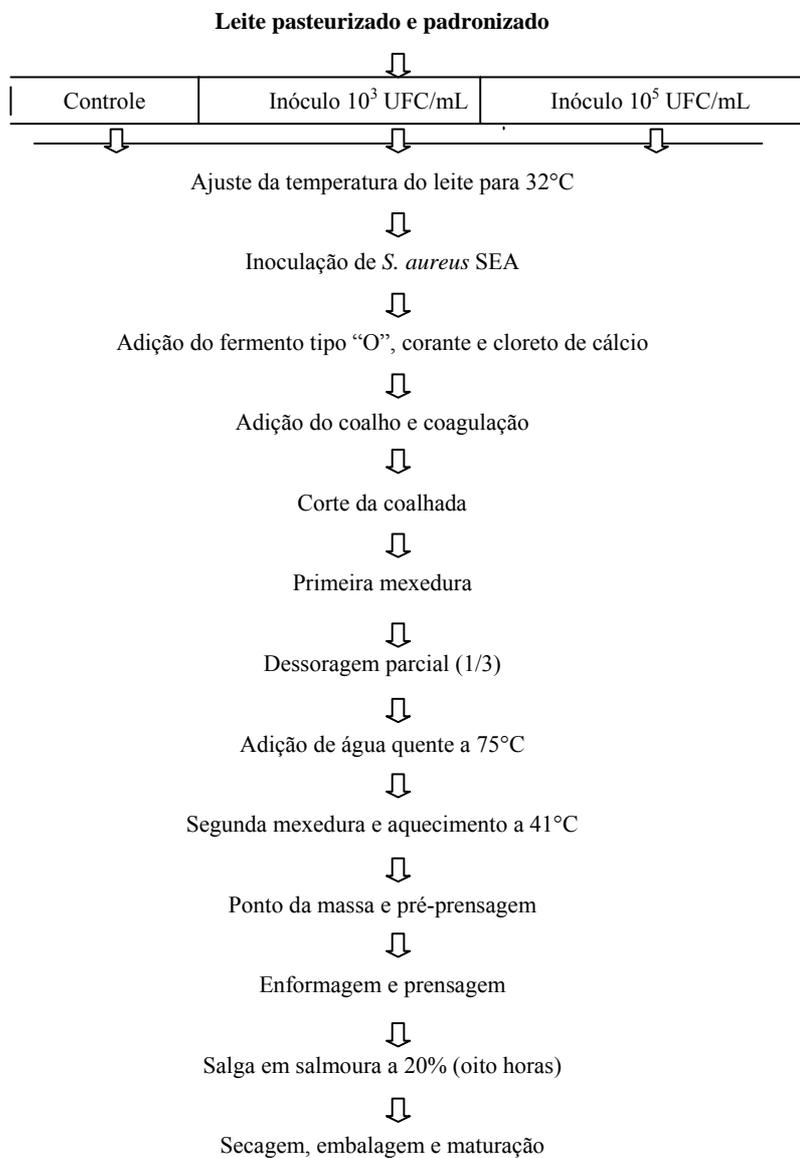


FIGURA 1 Fluxograma da fabricação do queijo prato acrescido de inóculos de *S. aureus*, amostra FRI 100 A (Furtado & Lourenço Neto, 1994).

3.5.4 Salga dos queijos

A salmoura foi preparada na concentração de 20% (p/v) de NaCl e seu pH final modificado para 5,0, com HCl para cada um dos tratamentos.

3.5.5 Maturação dos queijos

Após a salga, os queijos foram embalados a vácuo, no segundo dia de maturação (D+2) e levados, novamente, para a câmara de maturação, onde permaneceram durante o período de trinta dias. A temperatura da câmara foi mantida entre 13°C e 15°C e umidade a 80%.

3.6 Análises físico-químicas do leite e do soro

Foram realizadas coletas de amostras do leite e do soro para a realização análises descritas a seguir.

3.6.1 pH

Utilizou-se medidor de pH HANNA 8314 para a análise do pH.

3.6.2 Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada em 10mL de leite, utilizando-se o método de titulação com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de solução indicadora (fenolftaleína), até atingir o ponto de viragem (róseo claro), como descrito por Brasil (2003).

3.6.3 Densidade

A densidade foi determinada por meio de leitura direta, utilizando-se um termolactodensímetro de Quevenne, devidamente aferido Brasil (2003).

3.6.4 Teor de gordura

Os teores de gordura das amostras do leite foram determinados pelo método do butirômetro de Gerber, descrito por Brasil (2003).

3.7 Análise microbiológica do leite e do soro

3.7.1 Quantificação de *Staphylococcus aureus*

Amostras de leite e do soro foram diluídas seriadamente em água peptonada estéril 0,1% (p/v) para quantificação de *Staphylococcus aureus* pelo plaqueamento de alíquotas das diluições adequadas em ágar Baird-Parker. Após 48 horas de incubação, colônias típicas e atípicas foram retiradas aleatoriamente em um total da raiz quadrada do número de UFC encontrado na placa (entre 25 a 250 UFC). Essas cepas foram transferidas para tubos contendo TSA, para posterior realização de provas confirmativas de coagulase, catalase, coloração de Gram e manitol (ICMSF, 2000).

3.7.2 Quantificação de coliformes totais e termotolerantes

A determinação de coliformes foi realizada utilizando-se o método de fermentação de lactose, pela inoculação de 1mL das alíquotas das diluições adequadas em caldo lauril sulfato triptose (LST), utilizando-se a técnica do número mais provável (NMP), em três séries de três tubos. Após a incubação a 37°C, durante 48 horas, os tubos presuntivamente positivos, que evidenciarem turvação e produção de gases nos tubos de Duhram, foram repicados para caldo bile verde brilhante (BVB) para confirmação do teste presuntivo. Os tubos com turvação e formação de gás foram analisados na tabela de NMP, para determinação do NMP de coliformes totais/g de amostra analisada. As amostras positivas para o teste confirmativo, foram repicadas para tubos contendo caldo *Escherichia coli* (EC). Estes tubos foram incubados em banho-maria a 45°C, por

48 horas e usados para determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes (ICMSF, 2000).

3.8 Análise do queijo prato

Os parâmetros referentes às análises espacial dos queijos foram obtidos por meio da utilização de uma sonda que permitiu ampla amostragem das regiões (superior, intermediária e inferior) dos queijos fabricados.

3.8.1 Análises físico-químicas dos queijos

3.8.1.1 Gordura

Para a determinação de gordura, foi utilizado o método ácido butirométrico Van-Gulik, descrito por Brasil (2003).

3.8.1.2 Sal

Os teores de sal foram determinados segundo o método descrito por KosiKowski (1977).

3.8.1.3 pH

As medidas de pH foram obtidas utilizando-se um medidor de pH HANNA (modelo HI 8314), previamente calibrado, provido de detector de inserção.

3.8.1.4 Acidez titulável

A acidez titulável foi medida utilizando-se NaOH (0,1Normal), na presença do indicador fenoltaleína.

3.8.1.5 Umidade

O teor de umidade do queijo foi determinado segundo método da AOAC (1995), baseado na técnica de secagem em estufa a 105°C por 3 horas e pesagem até o peso constante. O conteúdo de umidade foi expresso em porcentagem (g/100g de amostra).

3.8.1.6 Nitrogênio total (NT)

O teor de nitrogênio total (NT) do queijo foi determinado pelo método Kjeldahl proposto por Gripon et al. (1987), diretamente sobre uma alíquota de 5mL, extraído em citrato de sódio 0,5mol/L. As amostras foram digeridas em blocos digestores modelo TE 008/50 e destiladas em destilador modelo TE-036.

3.8.1.7 Nitrogênio solúvel em pH 4,6 (NS)

O teor de nitrogênio solúvel (NS) do queijo foi determinado após precipitação isoelétrica das caseínas com solução de ácido clorídrico 1,41 mol/L até pH 4,6, em amostras de queijos previamente solubilizadas em citrato de sódio 0,5mol/l. Esta mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman número 42, coletando-se uma solução límpida, contendo a fração hidrolisada da proteína do queijo, solúvel a pH 4,6. A quantificação destas substâncias solúveis foram realizadas pelo método de Kjeldahl proposto por Gripon et al. (1987), partindo-se de 5mL do filtrado.

3.8.1.8 Nitrogênio solúvel em TCA 12% (NNP)

As amostras de queijo previamente solubilizadas em citrato de sódio (0,5mol/L) foram precipitadas em solução a 24% com ácido tricloroacético (TCA) e filtradas em papel de filtro Whatman número 42, coletando-se a solução límpida, que contém peptídeos de baixa massa molecular e aminoácidos.

O nitrogênio contido nesta solução foi quantificado pelo método Kjeldahl proposto por Gripon et al. (1987), partindo-se de 5ml do filtrado.

3.8.2 Análises microbiológicas do queijo prato

Amostras dos queijos foram coletadas com a utilização de uma sonda que permitiu ampla amostragem espacial; foram coletadas faixas do interior para o exterior do queijo, em diferentes alturas do mesmo, sendo analisadas as partes superior, intermediária ou central e inferior do queijo.

Foram utilizadas amostras de 25g dos queijos homogeneizados em 225mL de citrato de sódio 2%. Após homogeneização, as amostras foram diluídas em água peptonada estéril a 0,1% (p/v).

A enumeração de *Staphylococcus* das amostras de queijos foi realizada por meio do plaqueamento de alíquotas das diluições adequadas em ágar Baird-Parker, tal como descrito anteriormente, no item 3.6.1.

A determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, foi realizada utilizando-se a técnica do número mais provável em três séries de três tubos, tal como descrito anteriormente, no item 3.6.2.

3.8.3 Análise das cepas isoladas das amostras de queijos

As colônias típicas e atípicas foram submetidas à coloração de Gram, teste de catalase, coagulase e manitol.

3.8.3.1 Coloração de Gram

A coloração pelo método de Gram foi realizada de acordo com Pelczar et al. (1981).

3.8.3.2 Teste de catalase

O teste de catalase foi realizado utilizando-se peróxido de hidrogênio 3% (Silva et al., 2001).

3.8.3.3 Produção da enzima coagulase em tubo

O teste de coagulase dos isolados foi realizado após cultivo das cepas em tubos contendo caldo BHI, incubados a 37°C, por 24 horas. Foram utilizados 0,4mL de plasma de coelho para a realização deste teste. (Silva et al., 2001).

3.8.3.4 Fermentação do manitol

Foi utilizado caldo vermelho de fenol adicionado de 1% de manitol. A leitura da fermentação em manitol apresentando mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo foi realizada até 7 dias de incubação (Silva et al., 2001).

3.9. Análise das enterotoxinas estafilocócicas

3.9.1 Extração das enterotoxinas estafilocócicas

A extração e a detecção das enterotoxinas dos queijos foram realizadas na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), em Belo Horizonte, MG.

A extração das toxinas estafilocócicas nas amostras de queijos foi realizada utilizando 50 gramas da amostra, que foi homogeneizada em 50mL de tampão fosfato (Na_2HPO_4) 0,02 mol/L. O homogeneizado foi centrifugado a 4°C, por 10 minutos, a 10.000 rpm. Após este processo, retirou-se o sobrenadante, do qual o pH foi ajustado para 4,5, com HCl 5 Molar e centrifugado por 20 minutos a 10.000 rpm, em centrífuga refrigerada a 4°C. Novamente, retirou-se o sobrenadante ajustando-se o pH para 7,5 com NaOH 5 molar que foi mais uma vez centrifugado a 10.000 rpm por 20 minutos. Ao sobrenadante obtido adicionou-se três gotas de conservante Timerosol 1:1000.

As amostras foram mantidas sob refrigeração para posterior identificação das possíveis enterotoxinas, pelo método de imunodifusão em gel (OSP).

3.9.2 Certificação da produção de enterotoxinas estafilocócicas pela técnica de sensibilidade ótima em placa (OSP)

Diluições seriadas foram preparadas para a quantificação e a certificação da produção de enterotoxina, pela técnica de OSP descrita por Robbins et al. (1974), recomendada para determinar a produção ou não de enterotoxinas.

Neste método, 3mL de ágar preparado com 1,2% de ágar nobre em tampão PBS 0,02M, pH 7,4 e adicionado de 1,0mL de timerosol como conservante, foram colocados em placas de Petri 50x12mm. Após a solidificação foram feitos 7 orifícios no ágar, conforme molde do *Food Research Institute* (FRI), sendo cinco furos de 8,3 mm e dois de 6,7mm. Nos dois orifícios menores, foram colocados 4µg/mL de toxina padrão de *S. aureus* SEA e, no orifício central, colocado um anti-soro específico para enterotoxina A e de título conhecido, de forma que as linhas de precipitina formadas pela reação antígeno/anticorpo se situassem na metade da distância entre este e cada um dos orifícios menores (Figura 2). A inoculação direta das amostras obtidas na extração, assim como as diluições seriadas, foi colocada nos quatro orifícios restantes. Posteriormente, as placas foram transferidas para câmara úmida e incubadas a 37°C, por 24 horas. As reações positivas foram determinadas pela formação de linhas de precipitina do sobrenadante da amostra com o anti-soro controle.



FIGURA 2 Determinação da concentração de enterotoxina pelo método de sensibilidade ótima em placa (OSP). Orifícios 1 e 4 toxina padrão, 7 anti-toxina, 2, 3, 5 e 6 contêm enterotoxina de *Staphylococcus aureus*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Composição físico-química do leite utilizado na fabricação dos queijos prato

Os resultados referentes à composição média do leite utilizado nas fabricações dos queijos encontram-se na Tabela 1. Os valores obtidos para densidade, gordura, acidez e nitrogênio total estão de acordo com os padrões sugeridos pela legislação (Brasil, 2002). A observação destes parâmetros é de grande importância para a obtenção de queijos de boa qualidade.

TABELA 1 Composição físico-química do leite utilizado na fabricação dos queijos.

Parâmetros	Resultados (Média)
Densidade	1,032
Gordura	3,35%
Acidez	16° D
Nitrogênio total	0,53%

4.1.2 Composição físico-química do soro

A composição do soro, apresentada na Tabela 2, fornece indicações de perdas dos sólidos do leite para o soro, ocorridas durante a fabricação. Parte destes sólidos fica retida nos grãos da coalhada, que irão formar o queijo e o restante permanece no soro. Dessa forma, quanto mais pobre é o soro, maior é o rendimento do leite em queijo, o que é exatamente desejável.

TABELA 2 Composição físico-química do soro, obtida durante as fabricações dos queijos. Os resultados constituem a média das três repetições.

Parâmetros	Resultados (Média)
Densidade	1,027
Gordura	0,70%
Acidez	13° D
Nitrogênio total	0,16%

A perda de componentes do leite, principalmente gordura e proteínas é comum no soro, durante o processo de fabricação dos queijos. Considera-se normal que de 10% a 15% da gordura do leite se percam no soro no momento do corte. Esta porcentagem poderá variar em função do teor de caseína do leite (Furtado, 1998). Os dados da Tabela 2 mostram que o soro apresentou parâmetros normais de composição, com exceção dos valores de gordura. As perdas de gordura foram mais altas do que o recomendado. Este aumento da perda de gordura pode ter sido causado pela maneira de cortar a massa.

4.2 Composição físico-química do queijo prato

Os resultados referentes à composição média dos queijos encontram-se na Tabela 3. Segundo Furtado e Neto (1994), o queijo prato apresenta a seguinte composição: umidade 42% a 45%, gordura 26% a 29%, proteína 27% a 29%, teor de sal 1,6% a 1,9% e pH 5,2-5,4. Este último pode aumentar com o decorrer da maturação.

TABELA 3 Composição média dos parâmetros dos queijos tipo prato fabricados, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem adição de *S. aureus*, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL e II 10^5 UFC/mL de *S. aureus*.

Parâmetros analisados	Resultados (Média)		
	Queijo controle	Queijo I	Queijo II
Gordura	28,13%A	28,05%A	26,50%B
Acidez	0,65%A	0,54%A	0,61%A
pH	5,68 A	5,78 A	5,72 A
Cloretos	1,21%A	1,51%A	1,48%A
Umidade	42,63%A	44,17%A	42,98%A
Nitrogênio total	4,21%A	4,10%A	4,01%A
Nitrogênio solúvel	0,49%A	0,50%A	0,51%A
Nitrogênio não protéico	0,32%A	0,33%A	0,35%A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha são estatisticamente iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A composição média de grande parte dos parâmetros físicos e químicos do queijo prato, elaborado nas três repetições do experimento, estão dentro dos padrões tecnicamente aceitáveis, segundo Furtado & Lourenço Neto (1994). Os valores diferentes daqueles recomendados foram referentes a concentração de cloreto que estavam abaixo do esperado e aos valores de pH, que foram maiores quando comparados aos padrões tecnicamente aceitáveis para queijo prato.

A composição dos parâmetros físico-químicos do queijo prato foi analisada nas diferentes regiões dos queijos controle, queijo com inóculo de 10^3 UFC/mL e com 10^5 UFC/mL. Os resultados indicaram que não houve diferença significativa com relação à quantidade de nitrogênio solúvel, nitrogênio não protéico, umidade, gordura, acidez e pH, nas diferentes regiões dos queijos,

indicando que, de forma geral, os queijos apresentam-se homogêneos em todo seu o seu perfil.

O fato de estes queijos serem relativamente pequenos com aproximadamente 0,5kg contribuiu para a homogeneidade do produto em todo seu perfil. Os queijos também permaneceram embalados durante o período de maturação, contribuindo para a manutenção da umidade observada durante todo o período de maturação.

A quantidade de gordura no queijo com inóculo de 10^5 UFC/mL no leite foi relativamente menor, como pode ser observado por meio dos dados da Tabela 4. Segundo Furtado & Wolfschoon-Pombo (1979), na fabricação de queijos não se obtêm rendimentos iguais de todos os componentes do leite. O aproveitamento da gordura depende também do tamanho dos grãos resultantes da divisão da coalhada. Como a coalhada é dividida, durante a fabricação, em grãos e soro, os componentes encontrados em maior quantidade nos grãos terão valores reduzidos no soro. Logo, este queijo apresentou menor índice de gordura, pois parte desta gordura ficou retida no soro (Mendonça, 2003).

TABELA 4 Valores médios de gordura, em porcentagem, nas partes do queijo, para cada tratamento utilizado, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem adição de *S. aureus*, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL e II, 10^5 UFC/mL de *S. aureus*.

Perfil da massa do queijo	Queijo			Médias
	Controle	Queijo I	Queijo II	
Inferior	28,13 aA	28,07 aA	26,47 bB	27,55 ab
Intermediária	28,12 aA	28,03 aA	26,33 bB	27,50 b
Superior	28,13 aA	28,05 aA	26,69 aB	27,62 a
Médias	28,13 A	28,05 A	26,50 B	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si, pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

TABELA 5 Valores médios de cloretos, em porcentagem, nas partes do queijo, para cada tratamento utilizado, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem adição de *S. aureus*, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de *S. aureus* inoculado e II, representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.

Perfil da massa do queijo	Queijo			Médias
	Queijo controle	Queijo I	Queijo II	
Inferior	1,182	1,520	1,497	1,400 ab
Intermediária	1,322	1,521	1,554	1,465 a
Superior	1,154	1,507	1,407	1,356 b
Médias	1,219 A	1,516 A	1,486 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com 5% de significância.

Os resultados obtidos com relação à quantidade de cloretos, nos três tratamentos, apresentaram maiores teores de sal na parte intermediária dos queijos, como pode ser observado nos dados da Tabela 5. Provavelmente, após a fabricação, a parte intermediária do queijo apresenta maior umidade, promovendo a migração do sal para o interior, até que o equilíbrio hidrostático seja atingido.

As características físico-químicas dos queijos controle, queijo fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL e com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*, analisadas durante o período de maturação, com 15 dias (T15) e 30 dias (T30) após a salga, apresentaram alterações apenas nos valores de pH, nitrogênio solúvel (NS) e nitrogênio não protéico (NNP).

O queijo prato com 24 horas de fabricação deve possuir pH de 5,2 a 5,4, segundo Furtado e Neto (1994). Entretanto, neste trabalho, apresentaram pH pouco acima do recomendado (Tabela 6). Também foi observada elevação do pH estatisticamente significativa, durante o período de maturação, nos queijos fabricados com leite inoculado com 10^3 UFC/mL.

Geralmente, o valor do pH diminui nas primeiras horas após a fabricação e tende a aumentar durante a maturação, devido à destruição do ácido láctico, à formação de subprodutos não dissociados ou da fraca dissociação e liberação de compostos de caráter alcalino resultantes da decomposição protéica (Awad, 2006; Oliveira, 2002). O catabolismo de aminoácidos livres, liberados durante a maturação, leva à formação de amônia (NH₃) (Costa Jr & Pinheiro, 2004).

A evolução do pH durante o período de maturação do queijo também pode ocorrer devido à inibição dos microrganismos do fermento, resultando em pouca acidificação. Essa inibição pode ser causada por inibidores naturais do leite ou, mesmo, pela competição com outros microrganismos (Moreno, 2002).

TABELA 6 Médias de pH dos queijos com relação às partes e ao tempo de maturação, em que queijo controle representa os queijos elaborados sem adição de *S. aureus*, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10³UFC/mL de *S. aureus* inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10⁵UFC/mL

Queijos	Tempo de maturação (dias)		
	0	15	30
Controle	5,54A	5,79A	5,72A
I	5,61 A	5,84 AB	5,91B
II	5,59A	5,79A	5,78A

Médias seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com de 5% de significância.

Os índices de nitrogênio solúvel (NS) em todos os tratamentos, evoluíram durante o período de maturação (Figura 3), indicando a ocorrência de proteólise nos queijos. Essa é considerada resultante de várias atividades enzimáticas. Os principais contribuintes são o coalho e as enzimas do fermento láctico (Fox et al., 1997).

A primeira degradação protéica é feita pelas enzimas do coalho que sofrem influência do pH. Após essa primeira proteólise, as peptidases do fermento elevam os índices de degradação protéica (Isepon & Oliveira, 1993).

A observação e a quantificação dos produtos de degradação das proteínas dos queijos expressam o índice de maturação. Esta degradação implica em parâmetros como textura, sabor e aroma de grande parte dos queijos maturados (Fox et al., 2000; Law, 1987).

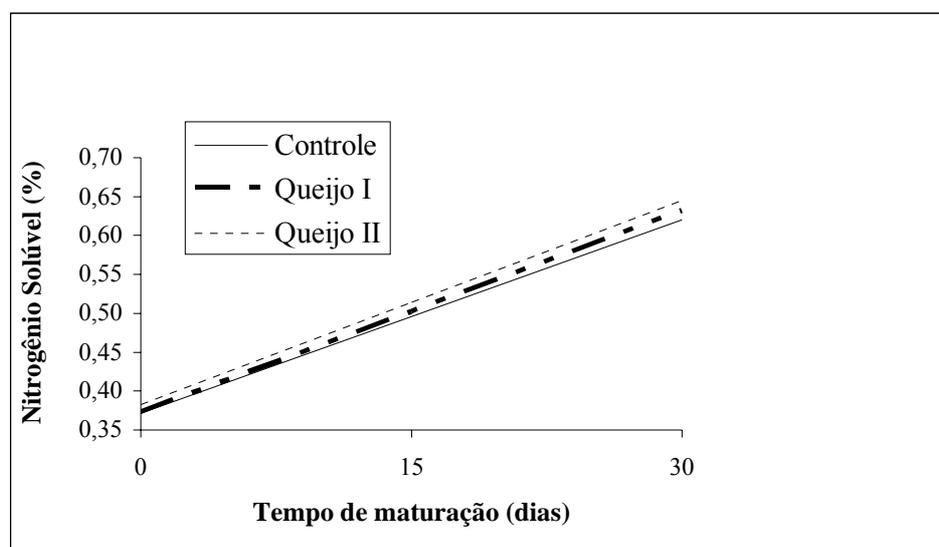


FIGURA 3 Aumento do nitrogênio solúvel nos tratamentos controle, queijo I (fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus*) e queijo II (fabricado com leite inoculado com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*), durante o período de maturação.

Os índices de nitrogênio não protéico (NNP), em todos os queijos, também evoluíram durante o período de maturação (Figura 4), indicando a ocorrência de proteólise nos queijos.

Após a atuação do coalho sobre as proteínas com geração de peptídeos de menor peso molecular, as peptidases do fermento láctico atuam sobre esses gerando peptídeos de peso molecular ainda menor, originando nitrogênio não protéico. Portanto, o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas é de grande importância na maturação, pois, a presença de aminoácidos livres e o seu respectivo catabolismo contribuem diretamente para o sabor do queijo (Ardö, 2006; Cagno et al., 2005; Fox et al., 2000).

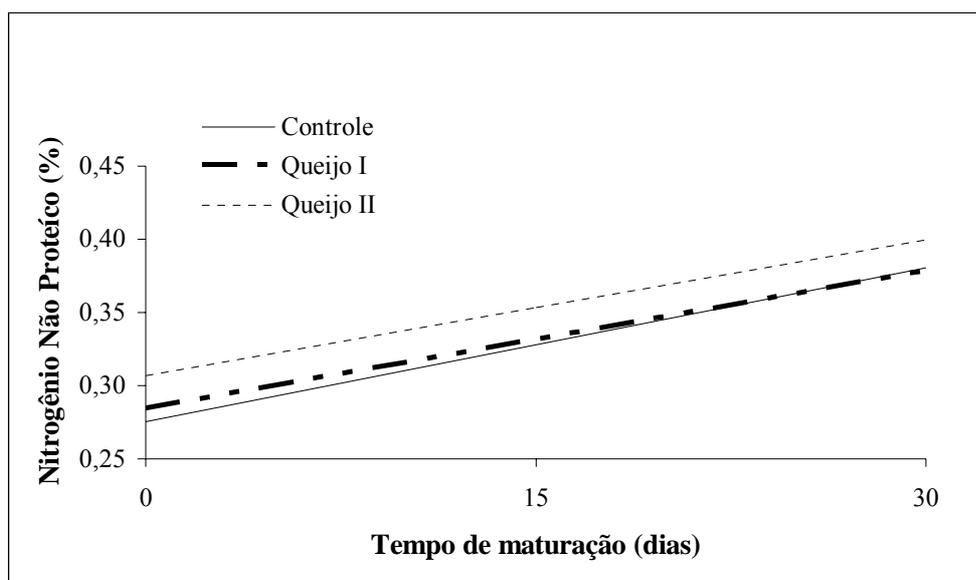


FIGURA 4 Aumento do nitrogênio não protéico nos tratamentos controle, queijo I (fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus*) e queijo II (fabricado com leite inoculado com 10^5 UFC/mL de *S. aureus*), durante o período de maturação.

O catabolismo dos aminoácidos livres envolve descarboxilação, desaminação, desulfuração e hidrólise da cadeia principal dos aminoácidos, originando grande variedade de compostos, incluindo ácidos carboxílicos, aminas, NH₃, CO₂, aldeídos, tióis e outros sulfonados, fenóis e hidrocarbonetos (Fox et al., 2000).

Os resultados referentes aos níveis de nitrogênio solúvel e nitrogênio não protéico, entre os tratamentos utilizados não apresentaram diferença significativa. O número de *S. aureus* inoculado ao leite para produção dos queijos I (10³UFC/mL) e II (10⁵UFC/mL) não foi capaz de promover aumento significativo da proteólise nestes queijos, incando que os principais responsáveis pela proteólise foram as enzimas do coalho que ficaram retidas na massa e as peptidases do fermento.

4.3 Análises microbiológicas do leite e do soro

Os resultados das análises de estafilococos, coliformes totais e termotolerantes do leite utilizado para a fabricação dos queijos e do soro produzido encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

TABELA 7 Populações de *Staphylococcus* sp. presente no leite e soro para cada um dos tratamentos, queijo controle, queijo I fabricado com leite inoculado com 10³UFC/mL de *S. aureus* e queijo II com inóculo de 10⁵UFC/mL.

Tratamentos	Valores médios das três repetições de <i>Staphylococcus</i> apresentados em log ₁₀ da quantidade de UFC/mL		
	Controle	Queijo I	Queijo II
Leite	2,90	3,27	5,00
Soro	2,63	2,98	4,69

O número de *Staphylococcus* presentes nas amostras de leite e soro, referente à produção dos queijos controle é exclusivamente constituído por cepas atípicas em ágar Baird-Parker e também coagulase negativa. Estes microrganismos estavam presentes no leite pasteurizado obtido para a fabricação dos queijos prato.

As amostras de leite retiradas para as análises microbiológicas foram coletadas imediatamente após a inoculação de *S. aureus*, nas concentrações de 10^3 e 10^5 UFC/mL no leite utilizado para as fabricações dos queijos I e II, respectivamente.

Os *Staphylococcus* coagulase positivos são, em sua grande maioria, produtores de enterotoxinas e, se estiverem presentes nos alimentos, podem sintetizar toxinas. Quando presentes em elevadas concentrações, acima de 10^5 UFC/g no alimento, a quantidade de toxinas produzidas pelos estafilococos já é suficiente para provocar toxinose (ICMSF, 2000). *S. aureus* e outras espécies de estafilococos coagulase negativos foram os agentes mais freqüentemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar estudados pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), no período de 1997 a 2002, no estado de Minas Gerais, sendo o queijo o alimento mais envolvidos (Veras et al., 2004).

TABELA 8 Valores médios de coliformes totais, apresentados em \log_{10} , presentes no leite e soro, para cada um dos tratamentos: queijo controle, queijo I, fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e queijo II, inoculado com 10^5 UFC/mL.

Amostras	Estimativas dos parâmetros apresentados, em \log_{10} do NMP/mL		
	Controle	Queijo I	Queijo II
Leite	2,77	3,29	3,98
Soro	1,64	2,74	2,96

TABELA 9 Valores médios de coliformes termotolerantes, apresentados em \log_{10} , presentes no leite e soro, para cada um dos tratamentos: queijo controle, queijo I, fabricado com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus* e queijo II, inoculado com 10^5 UFC/mL

Amostras	Estimativas dos parâmetros em \log_{10} do (NMP/mL)		
	Controle	Queijo I	Queijo II
Leite	0,67	1,98	2,88
Soro	0,55	0,63	1,09

As amostras de leite foram coletadas nos tanques de fabricação antes da produção dos queijos e mantidas sob refrigeração durante 24 horas para posterior realização das análises microbiológicas.

De acordo com os padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o limite microbiológico para coliformes totais em leite pasteurizado é de 5NMP/mL. Quanto à presença de coliformes termotolerantes, o número máximo permitido em leite é de 2NMP/mL. Logo, o leite utilizado neste trabalho, apesar de ser previamente pasteurizado, apresentou contagens mais elevadas que aquelas recomendadas pela legislação. Portanto, não estava adequado para a fabricação dos queijos.

A presença de coliformes totais e termotolerantes nos alimentos indicam ausência de controle dos parâmetros envolvidos no processamento do leite, como, desconhecimento da sanidade do rebanho, precariedade das instalações e falta de higiene dos equipamentos (Marek, 2004). Além destes microrganismos serem considerados indicadores da qualidade microbiológica, a sua presença em queijos pode resultar em estufamento, devido à produção de CO₂ pela fermentação e prejuízos para a indústria (Leite, 2000).

4.4 Análise microbiológica dos queijos

As análises foram realizadas considerando apenas as cepas típicas de *S. aureus*, ou seja, apenas aquelas que apresentaram coloração negra e presença de halo em ágar Baird-Parker. Os queijos controle apresentaram somente cepas atípicas. Verificou-se que, em todos os tratamentos, 100% das cepas atípicas em ágar Baird-Parker também eram coagulase negativas, fato que facilitou ainda mais a contagem e identificação de *S. aureus* inoculado no leite para a fabricação dos queijos.

4.4.1 Desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* no queijo prato

No presente trabalho, foi observado que 99,3% das colônias típicas em meio Baird-Parker eram *S. aureus* (Figura 5). Além de possuírem morfologia microscópica característica (cocos em cachos Gram-positivos), fermentavam o manitol e também eram coagulase e catalase positivas, sendo, portanto, facilmente identificadas.



FIGURA 5 Colônias típicas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de queijo fabricado com inóculo de *S. aureus*, em meio Baird-Parker, evidenciando-se as características da cultura, como coloração negra e halo transparente.

Os resultados das contagens de *Staphylococcus aureus* nos queijos elaborados com leite adicionado de 10^3 e 10^5 UFC/mL de *S. aureus* não apresentaram diferença significativa entre a amostragem espacial do queijo (Figura 6).

Também não ocorreu variação significativa no número de *S. aureus* presente nos queijos, durante todo o período de maturação (Tabela 10).

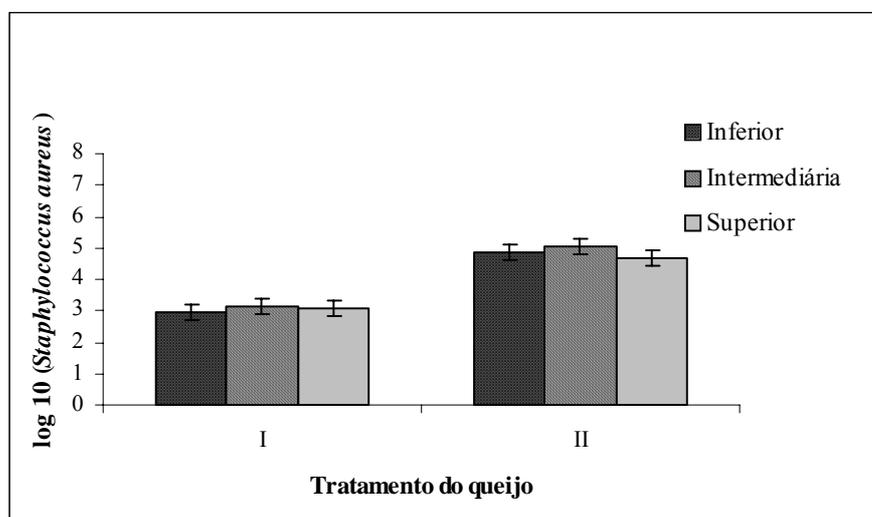


FIGURA 6 Variação dos valores médios em \log_{10} , para *S. aureus*, nas diferentes regiões de cada queijo, em que I representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^3 UFC/mL de *S. aureus* adicionados e II representa os queijos elaborados com leite adicionado com 10^5 UFC/mL.

TABELA 10 Valores médios (\log_{10}) de *Staphylococcus aureus* obtidos para as diferentes regiões de cada queijo, em função do tempo de maturação, em que, I representa os queijos elaborados com leite contendo 10^3 UFC/mL de *S. aureus* inoculado e II representa os queijos elaborados com leite inoculado com 10^5 UFC/mL.

Tratamento	Regiões	Tempo de maturação (dias)			Médias
		0	15	30	
Queijo I 10^3	Inferior	3,55	2,94	2,71	3,22b
	Intermediária	3,58	3,06	3,10	3,32b
	Superior	3,57	2,86	3,04	3,27b
	Médias	3,57 b	2,96 b	2,98 b	3,27 b
Queijo II 10^5	Inferior	4,89	4,78	5,07	4,93 a
	Intermediária	4,97	5,10	5,10	5,06 a
	Superior	4,68	4,69	4,81	4,73 a
	Médias	4,86 a	4,89 a	5,01 a	4,93 a

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, para cada queijo, são estatisticamente iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

A contagem média total para cada tratamento permaneceu, durante o período de maturação, em torno de 3,27 ciclos Log_{10} no queijo com inóculo inicial de 10^3 UFC/mL e 4,93 ciclos Log_{10} no queijo com inóculo inicial de 10^5 UFC/mL de leite.

Os valores de pH dos queijos e a temperatura utilizada durante o período de maturação possibilitam a manutenção da população de *S. aureus*, porém, não são considerados valores ótimos de crescimento requeridos por este microrganismo.

O pH ótimo para a produção de enterotoxina não é necessariamente, o mesmo para o crescimento de *S. aureus* segundo Tatine (1973). Este mesmo autor relatou que o pH ótimo de crescimento para *Staphylococcus aureus* está no intervalo entre 6,0 a 7,0, podendo crescer numa faixa entre 4,0 a 9,8.

Vários autores observaram que o pH abaixo da neutralidade tem apresentado efeito inibitório no desenvolvimento dos estafilococos, pois valores baixos do pH podem afetar a taxa de crescimento e, até mesmo, levar a uma

queda do número inicial de *S. aureus*, sugerindo que este microrganismo apresenta-se mais suscetível a variações do pH (Fujikawa & Morozumi, 2006; Lanciotti et al., 2001; Lindqvist et al., 2002).

O aumento linear da temperatura determina também o aumento linear do número de *S. aureus* (Fujikawa & Morozumi, 2006). Martin & Iandolo (2000) afirmam que os *S. aureus* apresentam crescimento mínimo em condições tais como temperaturas em torno de 8 °C a 9 °C e pH em torno de 4,8.

O crescimento, assim como a produção de enterotoxina em queijo maturado, pode ser limitado por vários fatores, que incluem a produção de ácido láctico, a variação do pH, a produção de H₂O₂ e a competição por nutrientes entre os microrganismos presentes no alimento (Carmo et al., 2002 ;Tatine et al. 1984).

Embora não tenha aumentado significativamente com o tempo, o teor de ácido láctico manteve-se constante, durante todo o período de maturação. Este fato pode estar relacionado com o controle da população dos estafilococos que, por sua vez, também apresentou-se constante durante o período de maturação analisado.

A capacidade das bactérias lácticas de produzir grande quantidade de ácidos orgânicos (especialmente ácido láctico), peróxido de hidrogênio e diacetil, constitui fatores importantes na atividade antimicrobiana (Magro et al., 2000). A atividade antimicrobiana das bactérias do ácido láctico também pode resultar da produção de substâncias protéicas conhecidas como bacteriocinas (Hamama et al., 2002).

As bacteriocinas representam outro parâmetro importante, destacado por alguns pesquisadores. Hamama et al. (2002) verificaram um decréscimo de *S. aureus* devido ao efeito inibitório da nisina produzida por *Lactococcus lactis* susp. *lactis* .

Outro estudo, realizado por Rodriguez et al. (2005), apresentou resultados semelhantes relacionado à atividade antimicrobiana de bactericinas produzidas por *Lactococcus lactis*. A pediocina, produzida por estes microrganismos, foi capaz de diminuir o número de *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*, durante o período de maturação do queijo.

4.4.2 Detecção de enterotoxina “A” no queijo prato

A produção de enterotoxina (SEA) não foi detectada em nenhum dos tratamentos realizados neste trabalho, durante todo o período de maturação dos queijos.

Barber & Deibel (1972) demonstraram que valores baixos de pH (em torno de 5,0) favoreceram a síntese de enterotoxina A, quando as culturas eram incubadas em aerobiose no meio BHI. Estes mesmos autores observaram também que, em anaerobiose, o pH mínimo para a produção das enterotoxinas A, B e C foi de 5,7.

Entretanto, outros autores (Novick et al., 2000) afirmam que valores baixos de pH têm, de fato, efeito inibitório na produção de enterotoxinas, sendo usualmente inibida em pH abaixo de 5,0.

Dinges et al. (2000) concluíram que a enterotoxina A (SEA) pode ser produzida entre pH 4,6 a 6,5, em leite esterilizado. Logo, o pH do leite utilizado para a fabricação dos queijos neste trabalho, assim como o pH dos próprios queijos, apresentaram-se ideais para a produção desta toxina. Entretanto, isso não ocorreu, porque, provavelmente, outros fatores influenciaram o desenvolvimento do *S. aureus* e a conseqüente produção da enterotoxina “A” nos queijos investigados.

Além do pH, outros fatores podem prevenir ou limitar o crescimento e a conseqüente produção de toxinas pelos microrganismos em alimentos. O alimento é uma matriz quimicamente complexa e, por isso, prever como e qual a

rapidez do desenvolvimento dos microrganismos é bastante difícil (Forsythe, 2002).

A temperatura ótima de crescimento para *S. aureus* é de 37°C e a temperatura mínima em que foi verificado o crescimento, por Pereira & Salzberg, (1982) foi de 10°C. Sabe-se que a produção de enterotoxinas é afetada por fatores, como temperatura e pH. Em 1973, Tatine demonstrou que a produção de enterotoxinas ocorreu entre 10 °C a 46°C, com ponto ótimo de 40°C a 45°C.

O leite inoculado com *S. aureus*, utilizado no presente trabalho, foi usado imediatamente para fabricação dos queijos, portanto, não permaneceu sob condições favoráveis para que houvesse multiplicação ou, mesmo, produção da enterotoxina A. Após a salga, os queijos permaneceram, durante o período de maturação, em câmara fria, cuja temperatura foi mantida em torno de 15°C, o que pode ter afetado a produção da enterotoxina A pelos *S. aureus*.

A conservação de alimentos em temperaturas impróprias é responsável por 95,6% do total de surtos de toxinfecção alimentar nos EUA, seguida da higiene pessoal imprópria (46,6%). O nível de contaminação da amostra, ou seja, com um inóculo inicial aumentado, também é fator crucial para o desenvolvimento de microrganismos e provável produção de toxina sob condições adversas (Genigeorgis,1989).

Os resultados obtidos por Lindqvist et al. (2002) indicaram que as condições para o crescimento de *S. aureus* diferem das condições para produção de enterotoxina, sendo as últimas mais restritas que aquelas requeridas para o crescimento. Fujikawa & Morozumi (2006) concluíram que a produção da enterotoxina A (SEA) foi linear com o passar do tempo, em temperatura constante de 32°C, entretanto, o crescimento bacteriano foi maior com o aumento da temperatura.

Yang et al. (2001) observaram que o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxina SEA e SEB, em ovos mexidos, foram influenciados pelo inóculo inicial e pela temperatura de cozimento, a 37°C; com 12 e 36 horas, a população de *S. aureus* aumentou substancialmente e a produção de enterotoxina foi detectada a 37°C.

A ausência da produção da enterotoxina também pode estar relacionada com o número de *S. aureus* remanescentes nos queijos, pois ocorreu grande perda do número de células inoculadas no leite para o soro no momento da fabricação.

De modo geral, a produção de enterotoxinas é detectada quando a população de *S. aureus* atinge concentrações de 10⁵UFC/g (Aktar et al., 1996; ParK et al., 1994). No entanto, a produção de enterotoxinas por *S. aureus* já foi verificada em populações iniciais com 10³-10⁶UFC/g, em níveis que variaram de 1 a 3,2ng/g de queijo camembert durante a fabricação e maturação por 41 dias (Meyrand et al., 1999).

Ao inocularem 10⁴, 10⁵ e 10⁶ UFC/ml de *S. aureus* em leite de cabra para a fabricação de queijo lático, Rozand et al. (1996) obtiveram produção de enterotoxina a partir do 5º e 12º dias, apenas nos tratamentos com 10⁵ e 10⁶UFC/mL.

Anunciação et al (1994) inocularam cepas de *S. aureus* produtoras de enterotoxina “A” em níveis de 10² e 10⁴ UFC/mL, em leite pasteurizado para produção de queijo branco. A enterotoxina só foi detectada no queijo preparado com leite inoculado com 10⁴UFC/mL, após ele ter sido mantido por 5 horas a 27°C e estava presente em todas as amostras de queijo.

Outro fator importante que deve ser lembrado é o limite de detecção para o método de dupla difusão em gel (OSP), que situa-se ao redor de 0,5µg/mL (Bergdoll, 1990). Por sua vez, esta metodologia foi considerada adequadamente sensível para a avaliação de linhagens enterotoxigênicas, por detectar

enterotoxina em quantidade suficiente para causar toxínose e surtos. Há, portanto, técnicas mais sensíveis que permitem a detecção de enterotoxina produzida em baixas quantidades.

4.4.3 Análise de coliformes totais e termotolerantes

Os resultados das contagens de coliformes totais e termotolerantes no queijo controle e naqueles elaborados com leite adicionado de 10^3 e 10^5 UFC/mL de *S. aureus*, apresentaram queda na concentração de coliformes totais e termotolerantes no decorrer da maturação (Figuras 7 e 8, respectivamente).

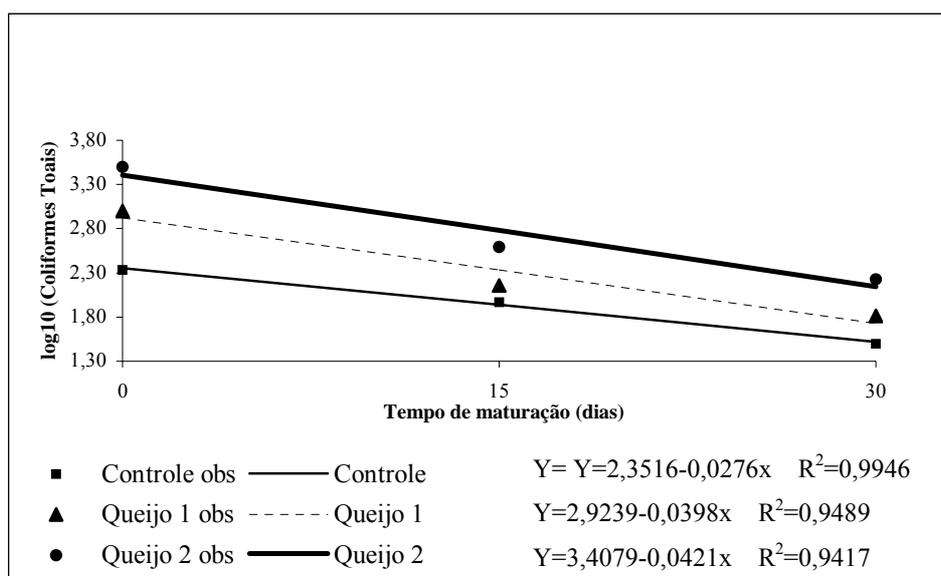


FIGURA 7 Declínio do número de coliformes totais em todos os tratamentos, queijo controle e naqueles elaborados com leite adicionado de 10^3 (representado por 1) e 10^5 UFC/mL (representado por 2) de *S. aureus*, em função do período de maturação dos queijos.

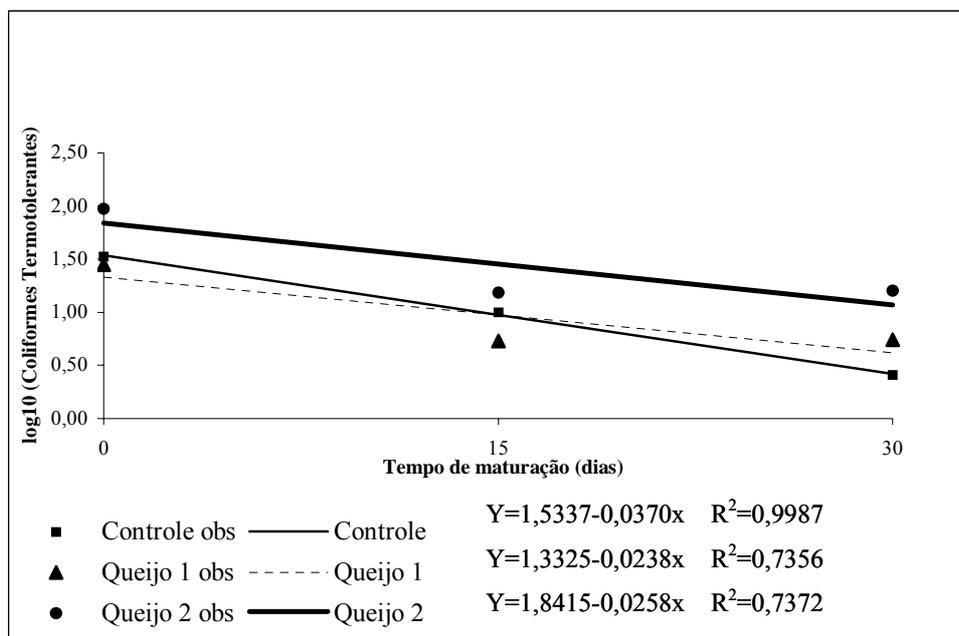


FIGURA 8 Declínio do número de coliformes termotolerantes em todos os tratamentos, queijo controle e naqueles elaborados com leite adicionado de 10^3 (representado por 1) e 10^5 UFC/mL (representado por 2) de *S. aureus*, em função do período de maturação dos queijos.

O decréscimo na concentração destas bactérias no decorrer da maturação pode estar relacionado com a produção de ácido lático pelas bactérias ácido lácticas do fermento. As bactérias presentes no fermento podem produzir compostos inibidores, como ácidos, dentre eles o lático ou, ainda, a inibição pode ocorrer devido ao sistema lactoperoxidase (junção do tiocianato + peróxido de hidrogênio) (Wolfson & Sumner, 1993; Furtado, 1994; Seifu et al., 2003).

A ação do ácido pode ser maior em valores baixos de pH. Em torno de 5,2 a 5,4, este pH auxilia na ação do ácido lático sobre o microrganismo, causando inibição do metabolismo normal da célula (Seifu et al., 2003; Sutherland et al., 1995; Wolfson & Sumner, 1993).

Manolopoulou et al. (2003) investigaram a evolução da população microbiana durante o processo de maturação de queijo e obtiveram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho. De modo geral, as bactérias do gênero *Micrococcus* mantiveram-se em número constante durante o período de maturação em câmara fria, sendo sua sobrevivência atribuída à sua resistência ao sal e à desidratação. No entanto, os coliformes e *E. coli* diminuíram significativamente com o tempo, não sendo nem mesmo detectado ao final de 120 dias.

O declínio dos coliformes durante o período de maturação em queijos é atribuído ao baixo pH e ao sistema lactoperoxidase formado no leite pela ação das bactérias lácticas, que produzem pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio, capazes de ativar o sistema. A depleção de açúcares pelas bactérias lácticas também é citada como possível inibidor dos coliformes (Manolopoulou et al., 2003; Rozand et al., 2005; Tornadijo et al., 2001; Wolfson & Sumner, 1993).

O crescimento da *Escherichia coli* foi observado por Kasrazadeh & Genigeorgis, em 1995, em temperatura mínima de 10°C, mantendo-se o pH em torno de 6,6. No entanto, quando o pH foi modificado para 5,9, com uso de ácido propiônico, ocorreu grande impacto no crescimento deste microrganismo.

Tornadijo et al. (2001) sugeriram também que, além do baixo pH (5,0 a 5,2), a produção de bacteriocinas e ácidos, pelas bactérias lácticas, constituem fatores importantes que, juntos, atuam na redução das enterobacteriaceas.

Analisando-se as Tabelas 10 e 11, observa-se que o número de coliformes totais e termotolerantes aumentou ligeiramente quando o inóculo inicial de *S. aureus* foi maior, sugerindo uma interação positiva entre estes microrganismos.

TABELA 11 Valores médios de coliformes totais nas partes do queijo, para cada queijo.

Região	Queijos (NMP/g)			Médias
	Controle (UFC/mL)	I (10 ³ UFC/mL)	II (10 ⁵ UFC/mL)	
Inferior	369 ab	575 b	2383 b	1109 b
Intermediária	770 a	3219 a	18719 a	7569 a
Superior	108 b	814 ab	643 b	522 b
Médias	416 A	1536 A	7248 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

TABELA 12 Valores médios de coliformes termotolerantes nas partes do queijo, para cada queijo.

Região	Queijos (NMP/g)			Médias
	Controle (UFC/mL)	I (10 ³ UFC/mL)	II (10 ⁵ UFC/mL)	
Inferior	7,77 b	18,77 a	76,88 ab	34,48 b
Intermediária	57,22 ab	49,11 a	104,00 a	70,11 a
Superior	22,44 b	24,44 a	63,11 b	36,66 b
Médias	29,14 A	30,77 A	81,33 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

O *S. aureus* revelou-se mais resistente, mantendo sua população inicial constante, aos efeitos adversos provocados pelas bactérias lácticas, durante o período de maturação. A possível interação positiva entre *S. aureus* e os coliformes favoreceu o desenvolvimento dos próprios coliformes. Este fato pode ser resultado da competição entre *S. aureus* e bactérias lácticas. Esta competição poderia estar resultando em menores quantidades de metabólitos produzidos pelas bactérias lácticas, e conseqüentemente, favorecendo o desenvolvimento dos coliformes. Entretanto, a população de coliformes caiu durante o período de maturação do queijo. Provavelmente, as condições adversas, assim como o acúmulo de subprodutos, influenciaram negativamente o seu desenvolvimento.

Brito et al. (2004) observaram que, em 59 amostras de *S. aureus* avaliadas, 48 (81%) inibiram pelo menos uma das linhagens de *Lactococcus* testadas, sugerindo que as bacteriocinas produzidas por *S. aureus* podem controlar, ou mesmo influenciar, o desenvolvimento das bactérias lácticas, além de possuírem ação inibitória distinta.

5 CONCLUSÕES

* Os *Staphylococcus* distribuíram-se aleatoriamente na massa do queijo prato e não demonstraram preferência espacial no produto, nem mesmo quando a concentração de sal foi ligeiramente maior em determinadas regiões.

* O número de *Staphylococcus* presentes no queijo prato não apresentou variação no decorrer da maturação. A contagem inicial deste microrganismo permaneceu praticamente a mesma durante o tempo de 30 dias, destinado à maturação dos queijos.

* A produção de enterotoxina também não foi observada em queijo prato produzido com leite inoculado com *S. aureus*, em concentrações de 10^3 e 10^5 UFC/mL.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L. R. **Efeitos dos diferentes níveis de nitrato de sódio adicionado ao leite, nos teores de nitrato e nitrato do soro e do queijo Prato ao longo da maturação**. 1986. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG.

ADESIYUN, A. A. Bacteriology quality and associated public health risk of pre-processed bovine milk in Trinidad. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 253-261, Mar. 1994.

AKHTAR, M.; PARK, C. E.; RAYMAN, K. Effect of urea treatment on recovery of Staphylococcal enterotoxin A from heat—processed foods. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 9, p. 3274-3276, Sept. 1996.

AKINEDEN, Ö.; ANNEMÜLLER, C.; HASSAN, A. A.; LÄMMLER, C.; WOLTER, W.; ZSCHÖCK, M. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from milk of cows with mastitis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Washington, v. 8, n. 5, p. 959-964, Sept. 2001.

ANUNCIAÇÃO, L. L. C.; LINARD, W. R.; CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Production O Staphylococcal Enterotoxin “A” In White Cheese. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 68-71, Jan./Mar. 1994.

AOAC- ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. 12. ed. Wahington, 1094. p. 1995.

ARDÖ, Y. Flavour formation by amino acid catabolism. **Biotechnology Advances**, Frederiksberg, v. 24, n. 2, p. 238-242, Mar./Apr. 2006.

ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, T.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKAZAWA, H.; KOZAKI, S. An extensive outbreak of Staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiology Infection**, New York, v. 130, n. 1, p. 33-40, Feb. 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO (ABIQ).
Produção brasileira de produtos lácteos e estabelecimentos sob inspeção federal. São Paulo, 2002. Não paginado.

AUGUSTO, M. M.; SILVA, A. T.; VIOTTO, W. H.; VAN DENDER, A. G. F.
Avaliação de métodos para quantificação da proteólise em queijo tipo Prato.
Indústria de Laticínios, São Paulo, v. 3, n. 15, p. 65-69, 1998.

AWAD, S. Texture and flavour development in Ras cheese made from raw and pasteurised milk. **Food Chemistry**, Oxford, v. 97, p. 394-400, May 2005.

BAIRD-PARKER, A. C. The staphylococci: introduction. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, p. 15-85, 1990. Simposium supplement.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. **International Journal of Food Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 1-10, Oct. 2000.

BARBER, L. E.; DEIBEL, R. H. Effect of pH and oxygen tension on staphylococcal growth and enterotoxin formation in fermented sausage. **Applied Microbiology**, Washington, v. 24, n. 6, p. 891-898, 1972.

BAYLES, K. W.; IANDOO, J. J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, Sept. 1989.

BEHME, R. J.; SHUTTLEWORTH, R.; McNABB, A.; COLBY, W. D.
Identification of staphylococci with a self-educating system using fatty acid analysis and biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 12, p. 3075-3084, Dec. 1996.

BENNET, R. W. The biomolecular temperaments of staphylococcal enterotoxin in thermally processed foods. **Journal of the Association Official Analytical Chemistry International**, Washington, v. 75, n. 1, p. 6-12, Jan. 1992.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 100, n. 2, p. 91-100, Mar. 1990.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: DOYLE, M. P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: INC, 1989. p. 463-523.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcal intoxications. In: RIEMANN, H.; BRYAN, F. L. (Ed.) **Food borne infections and intoxications**. 2. ed. London: Academic Press, 1983. p. 443-494.

BERGDOLL, M. S.; ROBBINS, R. N. Characterization of types of staphylococcal enterotoxins. **Journal Milk Food Technology**, Des moines, v. 36, n. 12, p. 610-612, 1973.

BETLEY, M. J.; BORST, D. W.; REGASSA, L. B. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxic and streptococcal pyrogenic exotoxins: a comparative study of their molecular biology. **Chemical Immunology**, Madison, v. 55, p. 1-35, 1992.

BRABES, K. C. S. **Detecção de *Staphylococcus* sp e suas toxinas em leite proveniente de gado mastístico**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG.

BRASIL. Leis , decretos, etc. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. RISPOA. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa, n 51 de 19 de setembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Instrução Normativa nº 22, de 14/04/2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, seção I, p. 3, 2 maio 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Resolução n 12, de 2 de janeiro de 2001**. Brasília, 2001.

BRITO, M. A. V. P.; ÂNGELO, F. F.; FONSECA, L. M.; BRITO, J. R.; FERREIRA, C. L. L. F. Atividade inibitória de bacteriocinas e *Staphylococcus aureus* para amostras de *Lactococcus ssp* isoladas de queijo. **Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 33-36, ago. 2004.

CAGNO, R.; QUINTO, M.; CORSETTI, A.; MINERVINI, F.; GOBBETTI, M. Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. **International Dairy Journal**, Perugia, v. 16, n. 1, p. 119-130, Jan. 2005.

CARMO, L. S.; BERGDOLL, M. S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 320-323, out./dez. 1990.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARD, V. R.; SENA, M. J.; SANTOS, D. A.; FARIA, M. E.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 9-14, Feb. 2002.

CHANG, T. C.; HUANG, S. H. Evaluation o Coagulase Activity and Protein A Production for the Identification of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v. 58, n. 8, p. 858-862, Aug. 1996.

CHAPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotigênicos via PCR**. 2003. 139 p. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

CHEN, T. R.; HSIAO, M. H.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. Development and use of primers for the investigation of C1, C2 and C3 enterotoxin types of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-borne outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, n. 1, p. 63-70, Dec. 2001.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; PINHEIRO, A. J. R. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 53, n.305, p. 29-49, set./dez. 2004.

COSTA, E. O.; RIBEIRO, A. R.; WATANABE, E. T. GARINO JR, F.; SILVA, J. A. B.; THIERS, F. O. Avaliação *in vitro* dos desinfetantes utilizados na pós-ordenha (*Teat Dipping*) para controle da mastite bovina. **Revista Nappama**, v. 1, n. 1, p. 18-20, 1998.

COSTA, L. C. G. **Influência da pasteurização do leite pelos sistemas de placas e de ejetor de vapor, nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, do queijo Prato**. 2002. 112 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

CRASS, B. A.; BERGDOLL, M. S. Involvement of coagulase –negative staphylococci in toxic shock syndrome. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 23, p. 43-45, 1986.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

EVENSON, M. L.; HINDS, M. W.; BERNSTEIN, R. S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 141-153, Dec. 1988.

FAGUNDES, C. M.; MOLIN, L. Interferência de resíduos de antibióticos no controle de qualidade do leite e derivados. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 24-30, jun.1988.

FERREIRA, A. C. **Uso Do Açafão (*Curcuma Longa L.*) Na Redução De *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 Em Ricota**. 2003. 76 p. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S. R.; FOSTER, T. J.; BOHACH, G. A. HARTIGAN, P. J. MEANEY, W. J.; SMITH, C. J. Characterization of pulative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan. 2001.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto: Artmed, 2002. 424 p.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; SWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese Science**. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 548 p.

FOX, P. F.; LAW, J.; MC SWEENEY, P. L. H.; WALLACE, J. Biochemistry of cheese ripening. In: FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. London: Chapman & Hall, 1997. v. 1, p. 389-438.

FRANCO, B. D. G. M.; FRANCO, M. L. **Microbiologia de los alimentos**. Porto: Artmed, 1996. 424 p.

FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**. São Paulo, v. 21, n. 4, p. 315-119, out./dez. 1990.

FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in milk. **Food Microbiology**, London, v. 23, n. 3, p. 260-267, Apr. 2006.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**: 2. ed. São Paulo: Globo. 1992. 297 p.

FURTADO, M. M. A formação de olhaduras em queijos semi-duros através da fermentação de citratos. **Revista Indústria de Laticínios**, São Paulo, v. 7 n.40 p. 32-40, 2002.

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

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. de M. **Tecnologia de queijos**: manual técnico para a produção industrial de queijos. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO-NETO, J. P. M. Estudo rápido sobre a composição média dos queijos prato e minas no mercado. **Revista Boletim do Leite e seus Derivados**, Rio de Janeiro, v. 1, n. 605, p. 4-38, mar. 1979.

GENIGEORGIS, C. A. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 9, n. 4, p. 327-360, Dec. 1989.

GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; SALANDRA, G. L.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARISI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 73-79, May 2005.

GILLIGAN, K.; SHIPLEY, M.; STILES, B.; HADFIELD, T. L., IBRAHIM, S. Identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A and B genes by PCR-

ELISA. **Molecular and Celular Probes**, Washington, v. 14, n. 2, p. 71-78, Apr. 2000.

GRIPON, J. C. Mould-ripened cheeses. In: FOX, P. F. **Cheese chemistry, physics and microbiology**. London: AVI Publishing, 1987. v. 2, Cap. 4, p. 121-149.

HAJMEER, M. N.; MARSDEN, J. L.; FUNG, D. Y. C.; KEMP, G. K. Water, sodium chloride and acidified sodium chlorite effects on *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* on beef briskets. **Meat Science**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 277-283, Oct. 2004.

HAMAMA, A.; EL HANKOURI, N.; EL AYADI, M. Fate of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in the presence of nisin-producing *Lactococcus lactis* strain during manufacture of Jben, a Moroccan traditional fresh cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 12, p. 933-938, 2002.

ICMSF. **Microrganismos de los Alimentos 1**: Su significado y métodos de enumeración. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, p. 439.

ISEPON, J. S.; OLIVEIRA, A. J. Influência das culturas lácticas no índice de proteólise do queijo Minas frescal. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 50, n. 3, p. 451-454, Sept./Dec. 1993.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LIMA, G. Egc, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nersey of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, p. 669-677, 2001.

KASRAZADEH, M.; GENIGEORGIS, C. Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, Davis, v. 25, p. 289-300, May 1995.

KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. Genus IV. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, 18 AL, (Nom. Cons. Opin. 17 Jud. Comm.. 1958, 153). In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; HOLT, J. G. (Ed.). **Berguey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Williams, 1986. v. 2.

KLOSS, W. E.; Systematics and natural history of Staphylococci. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 69, p. 25-37, 1990. Supplement.

KOHLER, C.; WOLFF, S.; ALBRECHT, D.; FUCHS, S.; BECHER, D.; BUTTNER, K.; ENGELMANN, S.; HECKER, M. Proteome analyses of *Staphylococcus aureus* in growing and non-growing cells: A physiological approach. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 295, n. 8, p. 547-565, Dec. 2005.

KOSIKOWSKI, F. **Cheese and fermented milk foods**. 2. ed. Edwards: Ann Arbor, 1977. 711 p.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S.; SANTOS, D. A.; PENNA, C. F. A. M.; SOUZA, M. R. Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n.5, p. 702-709, out. 2005.

LANCIOTTI, R.; SINIGAGLIA, M.; GARDINI, F.; VANNINI, L.; GUERZONI, M. E. Growth/ no growth interfaces of *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteridis* in model systems base don water activity, pH, temperature and ethanol concentration. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 8, p. 659-668, Dec. 2001.

LAW, B. A. Proteolysis in relation to normal and accelerated cheese ripening. In: FOX, P. F. (Ed.) **Cheese: chemistry, physics and microbiology general aspects**. London: Elsevier Applied Science, 1987. v. 1, p. 365-400

LAWRENCE, R. C.; CREAMER, L. K.; GILLES, J. Symposium: Cheese Ripening Technology. Texture Development during Cheese Ripening. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 8, p. 1750-1760, Aug. 1987.

LÁZARO, N. S.; FARIAS, R. S.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. *Enterobacteraceae* oriundas de fontes humanas e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.61, p. 49-53, abr./maio 1999.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Celular and Molecular Biology Research**, New York, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LECLERC, V.; DUFOUR, B.; LOMBARD, B.; GAUCHARD, F.; GARIN-BASTUJI, B.; SALVANT, G.; BRISABOIS, A.; POUMEYROL, M.; BUYSER, M-L., GNANOU-BESSE, N.; LAHELLEC, C. Pathogens in meat and milk

products; surveillance and impact on human health in France. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 195-202, Aug. 2002.

LEITE, R. L. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijos “Minas Frescal” e “Minas Padrão” elaborados com leite proveniente de vacas com mastite subclínica.** 2000. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

LINDQVIST, R.; SYLVÉN S.; VAGSHOLM, I. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 78, n. 1/2, p. 155-170, Sept. 2002.

MADANI, N. B.; GREENLAND, T.; RICHARD, Y. Exoprotein and slime production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam v. 59, n. 2/3, p. 139-145, Jan. 1998.

MAGRO, M. L. M.; CORBACHO, J. M. M.; SORIBES, C. H. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, Madrid, v. 37, p. 59-66, 2000.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, J. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p.153-161, Apr. 2003.

MAREK, P.; NAIR, M. K. M.; HOAGLAND, T.; VENKITANARAYANAN, K. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O 157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 1, p. 1-7, July 2004.

MARTIN, S. E.; IANDOLO, J. J. *Staphylococcus*. In: ROBINSON, R. K., BATT, C. A.; PATEL, P. D. **Encyclopedia of Food Microbiology**. New York: Academic Press, 2000. p. 2062-2065.

MASON, W. J.; BLEVINS, J. S.; BEENKEN, K.; WIBOWO, N.; OJHA, N. SMELTZER, M. Multiplex PCR protocol for the diagnostics of *Staphylococcal* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n 9, p. 3332-3338, Sept. 2001.

MENDONÇA, C. G. S.; **Influência da presença de resíduos de antibióticos nos aspectos tecnológicos e nas características físico-químicas e**

microbiológicas do queijo Prato. 2003. 87 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

MEYRAND, A.; ATRACHE, V.; BAVAI, C.; MONLET, M. P.; VERNOZZ-ROZAND, C. Evaluation of an alternative extraction procedure for enterotoxin determination in dairy products. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 411-415, June 1999.

MINUSSI, R. C. **Avaliação de métodos para aceleração da maturação do queijo Prato.** 1994. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

MORENO, I.; VAN DENER, A. G. F.; COSTA, G. A. N.; VIALTA, A.; LERAYER, A. L. S.; SILVA, A. T.; DESTRO, M. T. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo Prato de diferentes origens. **Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p. 136-139, 2002.

MORETTI, B. R.; NABUCO, A. C.; PENNA, A. L. B. Avaliação do perfil de tirosina durante a maturação do queijo tipo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 59, n. 339, p. 360-363, ago. 2004.

NABUCO, A. C.; MORETTI, B. R.; PENNA, A. L. B. Evolução dos índices de maturação do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios “Candido Tostes”**, Juiz de Fora, v. 59, n.339, p. 363-366, ago. 2004.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DABROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; DI GIANNATALE, E.; SALINETTI, A. P.; LA SALANDRA, G.; BARTOLI, M.; ZUCCON, F.; PIRINO, T.; SIAS, S.; PARASI, A.; QUAGLIA, N. C.; CELANO, G. V. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 98, p. 73-79, 2005.

NORMANNO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S.; MULA, G.; DABROSIO, A.; POGGIU, A.; DECASTELLI, L.; MIONI, R.; SCUOTA, S.; BOLZONI, G.; PARK, C. E.; AKHATAR, M.; RAYMAN, M. K. Evaluation of a commercial enzyme immunoassay kit (RIDASCREEN) for detection of Staphylococcal enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 677-681, Feb. 1994.

NOVICK, R. P. Pathogenicity factors and their regulation. In: FISCHETTI, V. A.; NOVICK, R. P.; FERETTI, J. J.; PORTNOY, D. A.; ROOD, J. I. **Gram positive pathogens**. Washington, D. C.: ASM Press, 2000. p. 392-407.

OLIVEIRA, A. M. **Estafilococos enterotoxigênicos: pesquisa de cepas produtoras e baixo produtoras de enterotoxinas isoladas de leite cru de bovino**. 1995. 90 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

OLIVEIRA, L. L.; BRANDÃO, S. C. C. Aspectos importantes para o controle do rendimento na fabricação de queijos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, n. 327, p.27-39, 2002.

OLIVEIRA, P. R. S. **Rendimento e proteólise do queijo Prato elaborado com leite pasteurizado pelo sistema de placas e injeção direta de vapor**. 2001. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Atualidades sobre a Detecção de Enterotoxinas Estafilocócicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.2, p. 121-131, jul./dez. 1996.

OLSEN, J. E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. **Food Research International**, Oxford, v. 33, n. 3/4, p. 257-266, 2000.

PARK, C. E.; AKHTAR, M.; RAYMAN, M. K. Evolution of Comercial Enzyme Imunoassay Kit (RIDASCREEN) for Detection of Staphylococcal Enterotoxins A, B, C, D and E in foods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 2, p. 677-681, Feb. 1994.

PARK, C. E.; SERRANO, A. M. et al., A survey of microorganisms for the thermonuclease production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 26, n. 4, p. 532-535, Apr. 1980.

PELCZAR, JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia- conceitos e aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Brooks do Brasil, 1997. v. 1, 524 p.

PEREIRA, M. L.; HENEINE, L. G. D.; PEREIRA, J. L.; BERGDOLL, M. S. Controlo f nonspecofic reaction on reversed passive látex aggutination assay (RPLA) for detecting nanogram quantities of staphylococcal enterotoxins.

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, v. 49, n. 4, p. 493-497, jul. 1997.

PEREIRA, J. L.; SALZBERG, S. P.; BERGDOLL, M. S. Effect of temperature, pH and sodium chloride concentrations on production and staphylococcal enterotoxins A and B. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 45, n. 12, p. 1306-1309, Dec. 1982.

PEREIRA, M. L. **Estafilococos coagulase negativos produtores de enterotoxinas estafilocócicas e relato de um surto por espécie coagulase positiva**, 1996. 143 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

PEREIRA, M. L.; CARMO, L. S.; SANTOS, E. J. et al. Staphylococcal food poisoning from cream-filled cake in a metropolitan area of Sout-Easter in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 406-409, 1994.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: Problema emergente da Vigilância Sanitária. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n.44, p. 22-27, jul./ago. 1996.

POLI, M.; RIVERA, V.; NEAL, D. Sensitive and specific colorimetric ELISAs for *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and B in urine and buffer. **Toxicon**, Fort Detrick, v. 40, p. 1723-1726, June 2002.

PORTOCARRERO, S. M.; NEWMAN, M.; MIKEL, B. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. **Meat Science**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 267-273, Oct. 2002.

RADDI, M. S. G.; LEITE, C. Q. F.; MENDONÇA, C. P. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 36-40, jan./mar. 1988.

RASOOLY, A.; RASOOLY, R. S. Detection and analysis of Staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 41, n. 3 p. 205-212, June 1998.

REISER, R. F.; ROBBINS, R. N.; NOLETO, A. L.; KHOE, G. P.; BERGDOLL, M. S. Identification, purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin. **Infection Immunology**, Washington, v. 45, n. 3, p. 625-630, 1984.

RICHARDS, N. S. P. S. Segurança alimentar: como prevenir contaminações na indústria. **Food Ingredients**, São Paulo, v. 18, p. 16-30, maio/jun. 2002.

ROBBINS, R.; GOULD, S.; BERGDOLL, M. S. Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 28, p. 946-950, 1974.

ROBERN, H. P.; GLEESON, T. M. The use of polyethylene glycol in radioimmunoassay staphylococcal enterotoxin. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 24, n. 4, p. 765-766, 1978.

RODRÍGUEZ, E.; CALZADA, J.; ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, J. M.; NUÑEZ, M.; MEDINA, M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O 157:H7 in cheese. **International Dairy Journal**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 51-57, Jan 2005.

ROSEC, J. P.; GUIRAUD, J. P., DALET, C.; RICHARD, N. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 213-221, Apr. 1997.

ROZAND, C. V.; MAZUY, C.; BAVAI, C.; MONTET, M. P., BONIN, V.; DERNBURG, A.; RICHARD, Y. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 105, n. 1, p. 83-88, Nov. 2005.

ROZAND, C. V.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, p. 271-280, Sept. 1996.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, Tnases and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains isolated from foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, p. 1-20, 1990.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCHMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of grow, Tnase and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Protection**, Dês Moines, v. 63, n. 9, p. 1277-1281, Sept. 2000.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E. F.; Effect of lactoperoxidase system on the activity of mesophilic cheese starter cultures in goat milk. **International Dairy of Journal**, Oxford, n. 12, p. 953-959, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2001. p. 317

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. Contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, aeróbios psicrotróficos e bolores e leveduras em placas. In: **Manual de Métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997. Cap. 3, p. 21-29.

STEELE, J. L.; UNLII, G. Impacto f lactic acid bactéria on cheese flavor development. **Food Technology**, Chicago, v. 46, n. 10, p. 128-136, Oct. 1992.

SU, Y. C.; WONG, A. C. L. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin h. **Applied and Enviromental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1438-1443, Apr. 1995.

SURANZINSKI, A.; PETERSON, E. **Fenómenos fundamentales durante la maduración de los quesos**. Belo Horizonte, 1973. 38 p. Resumos do curso nacional de leite e derivados.

SUTHERLAND, J. P.; BAYLISS, A. J.; BRAXTON, D. S. Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 29-49, May 1995.

TATINE, S. R. Influence of food enviroments on growth of *Staphylococcus aureus* and production o various enterotoxins. **Journal of Milk food Technology**, Ames, v. 36, n. 11, p. 559-563, Nov. 1973.

TATINE, S. R.; CORDS, B. R.; GRAMOLL, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. **Food Technology**, Chicago, v. 30, p. 64-74, 1976.

TATINE, S. R.; HOOVER, G. D.; LACHICA, . Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M. L. **Compedium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. New York: Academic Press, 1984. p. 411-429.

TORNADIJO, M. E.; GARCÍA, M. C.; FRESNO, J. M.; CARBALLO, J. Study o *Enterobacteriaceae* during the manufacture and ripening of San Simon cheese. **Food Microbiology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 499-509, Oct. 2001.

TRANter, H. S. Foodborne staphylococcal illness: **food borne illness**. **Lancet**, London, v. 27, n. 8722, p. 1044-1046, Oct. 1990.

VERAS, J. F.; SANTOS, D. A.; CARMO, L. S.; FERNANDES, T. M. G.; AZALIM, C. C.; SILVA, M. C. C.; MARTINS, R. T.; CERQUEIRA, M. O. P. Levantamento de surtos de toxinfecção alimentar envolvendo leite e produtos derivados no estado de Minas Gerais, Brasil. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 1.; CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 7., 2004. **Anais**. 2004.

VERNOZY-ROSAND, J.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C. BES, M.; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 271-280, July 1996.

WALSTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T. J. Dutch-type varieties. In: FOX, P.F. **Cheese: chemistry, physique and microbiology**. New York: Elsevier, 1987. 320 p.

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

WOLFSON, L. M.; SUMNER, S. S. Antimicrobial Activity of the Lactoperoxidase system: A Review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 10, p. 887-892, Oct. 1993.

YANG, S. E.; CHUI, R. C.; CHOU, C. C. Influence of holding temperature on the growth and survival of *Salmonella* spp. and *Staphylococcus aureus* and the production of staphylococcal enterotoxin in egg products. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 99-107, Jan. 1999.

ANEXOS

ANEXO A	Pág.
TABELA 1 A Análise de variância para gordura, pH e acidez.	79
TABELA 2 A Valores médios de pH nas partes do queijo, para cada queijo.	79
TABELA 3 A Tabela de desdobramento estudando o efeito dos tempos de maturação em cada um dos queijos estudados, para variável pH.	79
TABELA 4 A Análise de variância para cloreto, acidez e umidade.	80
TABELA 5 A Tabela de análise de variância para nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) e nitrogênio não protéico (NNP).	80
TABELA 6A Valores médios de NT para cada parte de cada queijo em função do tempo de maturação.	81
TABELA 7 A Valores médios de NS nas partes do queijo, para cada queijo.	81
TABELA 8 A Valores médios de NNP nas partes do queijo, para cada queijo.	82
TABELA 9 A Tabela de análise de variância para <i>Staphylococcus</i> , coliformes totais e termotolerantes.	82
TABELA 10 A Valores médios de coliformes totais nas partes do queijo, para cada queijo.	83
TABELA 11 A Valores médios de coliformes termotolerantes nas partes do queijo, para cada queijo.	83

TABELA 1 A Análise de variância para gordura, pH e acidez.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio	
		Gordura	pH
Queijo (Q)	2	22,9211 **	0,0642 ns
Tempo (T)	2	0,0844 ns	0,4481 **
Q x T	4	0,7361 ns	0,0151 ns
Erro (a)	18	1,4785	0,0486
Parte (P)	2	0,1137 *	0,0025 ns
P x Q	4	0,0898 *	0,0014 ns
P x T	4	0,0237 ns	0,0010 ns
P x Q x T	8	0,0273 ns	0,0023 ns
Erro (b)	36	0,0285	0,0024

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns – não significativo

TABELA 2 A Valores médios de pH nas partes do queijo, para cada queijo.

Parte	Queijo			Médias
	Controle	10 ³ (UFC/mL)	10 ⁵ (UFC/mL)	
Inferior	5,69	5,78	5,70	5,73 a
Intermediária	5,67	5,77	5,72	5,72 a
Superior	5,69	5,79	5,73	5,74 a
Médias	5,68 A	5,78 A	5,72 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 3 A Tabela de desdobramento estudando o efeito dos tempos de maturação em cada um dos queijos estudados, para variável pH.

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio
		PH
Tempos	2	0,4481 **
Tempos/ Controle	2	0,1512 ns
Tempos/ Queijo A (10 ³ UFC/mL)	2	0,2212 *
Tempos/ Queijo B (10 ⁵ UFC/mL)	2	0,1060 ns
Erro (a)	18	0,0486

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns – não significativo

TABELA 4 A Análise de variância para cloreto, acidez e umidade.

Fonte de variação	gl	Quadrado médio		
		Cloretos	Acidez	Umidade
Queijo (Q)	2	0,7208 ns	0,0555 ns	2,6340 ns
Tempo (T)	2	0,9690 ns	0,0464 ns	12,5915 ns
Q x T	4	0,5323 ns	0,0509 ns	5,5994 ns
Erro (a)	18	0,4197	0,0414	6,8524
Parte (P)	2	0,0817 *	0,0030 ns	6,6305 ns
P x Q	4	0,0203 ns	0,0020 ns	5,7897 ns
P x T	4	0,0500 *	0,0030 ns	7,2490 ns
P x Q x T	8	0,0087 ns	0,0034 ns	4,3628 ns
Erro (b)	36	0,0171	0,0108	4,6606

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns – não significativo

TABELA 5 A Tabela de análise de variância para nitrogênio total (NT), nitrogênio solúvel (NS) e nitrogênio não protéico (NNP).

Fonte de variação	Gl	Quadrado médio		
		NT	NS	NNP
Queijo (Q)	2	0,2689 ns	0,0022 ns	0,0049 ns
Tempo (T)	2	1,9631 ns	0,4467 **	0,0693 **
Q x T	4	0,1896 ns	0,0001 ns	0,0024 ns
Erro (a)	18	2,0554	0,0247	0,0073
Parte (P)	2	0,0481 *	0,0001 ns	0,00002 ns
P x Q	4	0,0125 ns	0,0003 ns	0,0008 ns
P x T	4	0,0140 ns	0,0003 ns	0,0014 ns
P x Q x T	8	0,0288 *	0,0007 ns	0,0001 ns
Erro (b)	36	0,0111	0,0005	0,0005

* (P<0,05); ** (P<0,01); ns – não significativo

TABELA 6A Valores médios de NT para cada parte de cada queijo em função do tempo de maturação.

Queijo	Partes	Tempo de maturação (%)			Médias
		0	15	30	
Controle	Inferior	3,95 a	4,66 a	4,08 a	4,23 a
	Intermediária	4,07 a	4,65 a	3,79 b	4,17 a
	Superior	4,05 a	4,69 a	3,91 ab	4,22 a
	Médias	4,02	4,66	3,93	4,21
Queijo I 10 ³ (UFC/mL)	Inferior	4,17 a	4,31 a	3,88 a	4,12 a
	Intermediária	4,07 a	4,23 a	3,97 a	4,09 a
	Superior	3,98 a	4,24 a	4,05 a	4,09 a
	Médias	4,08	4,26	3,97	4,10
Queijo II 10 ⁵ (UFC/mL)	Inferior	3,87 a	4,48 a	3,95 a	4,09 a
	Intermediária	3,76 a	4,21 b	3,85 a	3,94 b
	Superior	3,74 a	4,28 ab	3,94 a	3,98 ab
	Médias	3,79	4,32	3,91	4,01

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna para cada queijo, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 7 A Valores médios de NS nas partes do queijo, para cada queijo.

Parte	Queijo (%)			Médias
	Controle	I 10 ³ (UFC/mL)	II 10 ⁵ (UFC/mL)	
Inferior	0,4861	0,5056	0,5116	0,5011 a
Intermediária	0,5010	0,4970	0,5166	0,5048 a
Superior	0,5006	0,5046	0,5135	0,5062 a
Médias	0,4959 A	0,5024 A	0,5139 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 8 A Valores médios de NNP nas partes do queijo, para cada queijo.

Parte	Queijo (%)			Médias
	Controle	10 ³ (UFC/mL)	10 ⁵ (UFC/mL)	
Inferior	0,3316	0,3218	0,3568	0,3368 a
Intermediária	0,3204	0,3450	0,3495	0,3383 a
Superior	0,3317	0,3286	0,3531	0,3378 a
Médias	0,3279 A	0,3318 A	0,3531 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 9 A Tabela de análise de variância para *Staphylococcus*

Coliformes totais e termotolerantes. Fonte de variação	Gl	Quadrado médio		
		<i>Staphylococcus</i> ¹	Coliformes totais ¹	Coliformes Termotolerantes ¹
Queijo (Q)	2	35,5925 **	4,7615 ns	2,0533 ns
Tempo (T)	2	0,8254 ns	8,3214 *	5,6049 **
Q x T	4	0,4932 ns	0,2188 ns	0,2801 ns
Erro (a)	18	2,2725	2,0944	0,7113
Parte (P)	2	0,5899 **	4,8466 **	2,2562 **
P x Q	4	0,1084 ns	0,7701 *	0,9121 *
P x T	4	0,0832 ns	0,2195 ns	0,2191 ns
P x Q x T	8	0,1599 *	0,1127 ns	0,1066 ns
Erro (b)	36	0,0631	0,2691	0,1953

1-Valores transformados por: Log₁₀ (Y); * (P<0,05); ** (P<0,01); ns – não significativo

TABELA 10 A Valores médios de coliformes totais nas partes do queijo, para cada queijo.

Parte	Queijo (NMP/g)			Médias
	Controle	10 ³ (UFC/mL)	10 ⁵ (UFC/mL)	
Inferior	369 ab	575 b	2383 b	1109 b
Intermediária	770 a	3219 a	18719 a	7569 a
Superior	108 b	814 ab	643 b	522 b
Médias	416 A	1536 A	7248 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

TABELA 11 A Valores médios de coliformes termotolerantes nas partes do queijo, para cada queijo.

Parte	Queijo (NMP/g)			Médias
	Controle	10 ³ (UFC/mL)	10 ⁵ (UFC/mL)	
Inferior	7,77 b	18,77 a	76,88 ab	34,48 b
Intermediária	57,22 ab	49,11 a	104,00 a	70,11 a
Superior	22,44 b	24,44 a	63,11 b	36,66 b
Médias	29,14 A	30,77 A	81,33 A	

Médias seguidas de mesma letra minúscula, na coluna e maiúscula, na linha, são estatisticamente iguais entre si pelo teste de Tukey, com um nível de significância de 5%.

ANEXO B

Pág.

FIGURA 1 B Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus*. 85
Os dados apresentam a quantidade de UFC/mL
versus absorbância medida a 680nm.

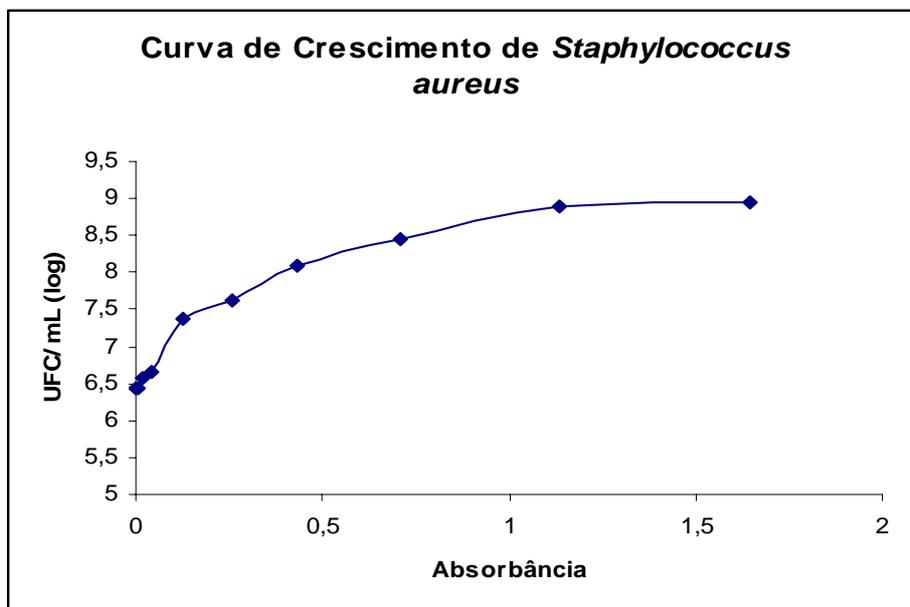


FIGURA 1 B Curva de crescimento de *Staphylococcus aureus*. Os dados apresentam a quantidade de UFC/mL versus absorbância medida a 620nm.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)