



GUSTAVO BACELAR MOREIRA DE CARVALHO

**DIAGNÓSTICOS E AÇÕES VISANDO O CONTROLE DE
OLHADURAS GASOSAS NÃO DESEJÁVEIS EM QUEIJO**

LAVRAS-MG

2018

GUSTAVO BACELAR MOREIRA DE CARVALHO

**DIAGNÓSTICOS E AÇÕES VISANDO O CONTROLE DE OLHADURAS GASOSAS
NÃO DESEJÁVEIS EM QUEIJO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

Coorientadora

Prof^ª. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS-MG

2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carvalho, Gustavo Bacelar moreira.

Diagnósticos e ações visando o controle de olhaduras gasosas não desejáveis em queijo / Gustavo Bacelar moreira Carvalho. - 2018.

47 p. : il.

Orientador(a): Luiz Ronaldo Abreu.

Coorientador(a): Roberta Hilsdorf Piccoli.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Estufamento em queijo. 2. Produção de gás. 3. Defeito de queijo. I. Abreu, Luiz Ronaldo. II. Piccoli, Roberta Hilsdorf. III. Título.

GUSTAVO BACELAR MOREIRA DE CARVALHO

**DIAGNÓSTICOS E AÇÕES VISANDO O CONTROLE DE OLHADURAS GASOSAS
NÃO DESEJÁVEIS EM QUEIJO**

**DIAGNOSES AND ACTIONS AIMING THE CONTROL OF UNDESIRABLE
GAS HOLE IN CHEESE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em
Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 09 de março de 2018.

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu	UFLA
Prof ^ª . Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Prof ^ª . Dra. Rejiane Avelar Silva Bastos	IFsuldestedeminas

Orientador

Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu

LAVRAS-MG

2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e a todos que fazem parte desta maravilhosa instituição, pela oportunidade de ajudar na minha formação profissional e realização deste trabalho.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

A todos dos Laboratórios de Laticínios e de Microbiologia de Alimentos, em especial à Eliane Alcântara, que me auxiliaram nesse período.

Aos Prof. PhD Dr. Luiz Ronaldo, Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli, Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias e Profa. Dra. Sandra Maria Pinto pelas oportunidades e ensinamento durante esses dois anos.

Ao Núcleo de Estudos em Laticínios e a todos seus membros pelo aprendizado e pelas vivências proporcionadas.

Em especial, agradeço àqueles que se tornaram minha família, que desde o primeiro dia me acolheram e me ajudaram com o maior carinho do mundo, e que tornaram essa etapa mais fácil e agradável: Creuza Amaral, Paulo Rezende e Sérgio Augusto.

Àqueles que se tornaram irmãos: Alexandre Dias, Diego Catalano, Filipe Santos, Frederico Oliveira, Jéferson Leandro, Jonathan Gonelli, Kaique Condé, Luiz Gustavo Barbosa, Maiko Ferreira, Pedro Maranhã, Stênio Pereira, Victor Fabri e Willians Stacanelli.

À Larissa Lemos Faria por ser o motivo e base de, e para, tudo em minha vida.

A toda minha família, em especial, à minha mãe, Maria Aparecida Moreira de Carvalho, por sempre fazer tudo e um pouco mais para me ajudar, e que é responsável por eu ser quem sou.

RESUMO

O estufamento tardio é um defeito grave na produção de queijos, que está associado a microrganismos e ocorre durante a maturação do queijo, e tem um grande impacto na indústria de laticínios. Predominantemente, esse defeito é causado pelo crescimento de clostrídios. O estufamento tardio é caracterizado pela produção excessiva de gás. O estufamento tardio constitui um defeito frequentemente observado nos queijos de massa semicozida ou cozida e de maturação prolongada. Bactérias formadoras de esporos do gênero *Clostridium* spp. têm sido apontadas como responsáveis por alterações do leite, principalmente as espécies *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*. Outro tipo de microrganismo produtor de gás em queijos maturados são as bactérias propiônicas. As bactérias propiônicas lácteas, principalmente a espécie *Propionibacterium freudenreichii*, apresentam um papel importante na tecnologia de produção de queijos com olhaduras, como do tipo suíço; já, quando há o aparecimento desse tipo de olhadura em queijos que não possuem essa característica, representa um defeito de queijo, e esse defeito foi relatado por uma empresa a qual possui sede em três cidades (Quintinos, Arapuã e Tiros) na região de Carmo do Paranaíba em Minas Gerais. Como nos foi apresentado, o defeito ocorrente é a aparição de olhaduras em queijos as quais não deveriam aparecer, indicando a contaminação destes por microrganismos produtores de gás. O estudo teve como objetivo promover ações corretivas e preventivas para o controle da ocorrência de olhaduras indesejáveis em queijos. Foram feitas análises microbiológicas (Colimetria, pesquisa de clostrídios, bactérias propiônicas, e *Staphylococcus* e também contagem total de bactérias) e físico-químicas em amostras de queijo, leite, água e soro de leite. Algumas amostras apresentaram contagens extremamente altas para alguns testes e, mesmo não havendo legislação vigente para alguns deles, isso representa uma grave falha de higiene, reforçada pelo fato de que todas as bactérias identificadas possam ter origem no trato digestivo de humanos e animais, como: *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Klebsiella pneumoniae*. As possíveis causas da contaminação são: má qualidade do leite cru, falhas no processo de pasteurização, presença de biofilmes em equipamentos e tubulações por colaboradores durante a manipulação e/ou na salga dos queijos.

Palavras-chave: Estufamento em queijo. Produção de gás. Defeito de queijo.

ABSTRACT

Late blowing is a serious defect in cheese production, it is associated with microorganisms and occurs during cheese ripening and has a major impact on the dairy industry. Mainly, this defect is caused by the clostridia growth. Late blowing is characterized by excessive gas production. Late blowing is a frequently observed defect in semi-cooked or cooked cheeses and prolonged maturation. Spore-forming bacteria of the genus *Clostridium* spp. have been identified as responsible for milk changes, especially the species *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* and *C. sporogenes*. Another kind of gas producer microorganism in matured cheeses is propionic bacteria. Dairy propionic bacteria, mainly the specie *Propionibacterium freudenreichii* has an important role in the technology of gas hole cheese production, as Swiss cheeses, but when appearing this kind of gas hole in cheeses that do not have this characteristic, it represents a defect of cheese, and this defect has been reported by a company headquartered in three different cities (*Quintinos*, *Arapuã* and *Tiros*) in the region of *Carmo do Paranaíba* in *Minas Gerais*. As we were presented, the occurring defect is when appearing gas hole in cheeses which they should not appear, indicating contamination of these cheeses by gas producing microorganisms. The study had as objective to promote corrective and preventive actions to control the occurrence of undesirable gas hole on cheeses. Microbiological analyzes (Colimetry, clostridia, propionic bacteria, and *Staphylococcus* and also total bacterial counts) and physical-chemical analyzes were carried out on samples of cheese, milk, water and whey. Some samples presented extremely high counts for some tests, and even if there is no current legislation for some of them, this represents a serious hygiene failure, reinforced by the fact that all bacteria identified can be originated in the digestive tract of humans and animals, such as: *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Klebsiella pneumoniae*. The possible causes of the contamination are: poor quality of raw milk, failure in pasteurization process, presence of biofilms in equipment and pipes by employees during handling, cheeses salting or combined causes.

Keywords: Cheese blowing. Gas production. Cheese defect.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estimativa da produção formal de queijos no Brasil, 2015.....	15
Tabela 2	Identificação das amostras.....	32
Tabela 3	Resultados das análises microbiológicas.....	33
Tabela 4	Composição centesimal dos queijos.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fermentação da lactose.....	20
Figura 2	Fermentação butírica.....	24
Figura 1	Rota do acrilato.....	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Queijo	12
2.1.1	Definição.....	12
2.1.2	Classificação	12
2.1.3	Composição	13
2.1.4	Requisitos	14
2.2	Importância do queijo no Brasil.....	14
2.3	Qualidade de um alimento	16
2.3.1	Segurança microbiológica	16
2.4	Defeitos em queijos	18
2.5	Estufamento em queijo	18
2.5.1	Estufamento precoce	19
2.5.2	Estufamento tardio	21
2.5.2.1	Fermentação do ácido butírico.....	22
2.5.2.2	Fermentação do ácido propiônico	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Análises:	28
3.1.1	Análise microbiológicas	28
3.1.1.1	Preparo das amostras	28
3.1.1.2	Colimetria	29
3.1.1.3	Contagem total.....	29
3.1.1.4	Quantificação de Clostrídios sulfito redutor.....	29
3.1.1.5	Quantificação de bactérias propiônicas	29
3.1.1.6	Quantificação de Staphylococcus	30
3.1.2	Análises físico-químicas.....	30
3.1.2.1	Umidade.....	30
3.1.2.2	Proteína total e frações	30
3.1.2.3	Lipídeos	31
3.1.2.4	Cinzas	31
3.1.2.5	Cloretos.....	31
3.1.2.6	pH.....	32
3.1.2.7	Acidez titulável	32
3.2	Identificação das amostras.....	32

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Queijos – Fase I.....	33
4.1.1	Avaliação da qualidade microbiológica	33
4.1.1.1	Colimetria	33
4.1.1.2	Quantificação de clostrídios sulfito redutor.....	34
4.1.1.3	Quantificação de bactérias propiônicas	34
4.1.1.4	Quantificação de estafilococos coagulase positiva	35
4.1.1.5	Contagem total	36
4.1.2	Avaliação da qualidade físico-química	36
4.2	Qualidade da água	37
4.2.1	Avaliação da qualidade microbiológica	37
4.2.1.1	Colimetria	37
4.2.1.2	Contagem total	38
4.3	Qualidade do leite e do soro	38
4.3.1	Avaliação da qualidade microbiológica	38
4.3.1.1	Colimetria	38
4.4	Prescrição das ações corretivas e preventivas.....	39
5	CONCLUSÕES	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

Dentre os setores do agronegócio brasileiro, o de laticínios tem grande destaque. Tomando por base o valor bruto de produção (VBP) gerado pelo setor pecuário, a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil reporta que o setor lácteo representa 24% desse valor, ficando abaixo somente do setor de carne bovina e sendo superior, por exemplo, à produção de suínos, frangos e ovos (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL - CNA, 2016). Dentro do setor de laticínios, a indústria queijeira é aquela de maior expressão comercial e econômica. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo, em 2015, a produção de leite no país foi em torno de 34 bilhões de litros, dos quais 46% foram destinados à produção de queijos. (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO - ABIQ, 2015)

O processo produtivo de queijo requer muitos cuidados, visando, além da obtenção de um produto de boa qualidade, a minimização de defeitos e consequentes perdas para a indústria. Dentre os diversos defeitos ocorrentes nos queijos, o estufamento se destaca como um dos, senão o mais importante.

O estufamento se dá devido à produção de gás no interior dos queijos, promovendo o aparecimento de olhaduras. Ressalta-se que nem toda olhadura em queijo é defeito, como exemplo, as necessárias aos chamados queijos tipo Suíço (Emmental, Gruyère) e nem toda olhadura é causada por estufamento, como exemplo, as olhaduras mecânicas. As olhaduras mecânicas são necessárias em alguns tipos de queijos e consideradas defeitos em outros, sendo, neste caso, provenientes basicamente de falhas durante os processos de pré-prensagem, enformagem e prensagem, enquanto que as gasosas são decorrentes da presença, e consequentemente, o metabolismo de microrganismos produtores de gás. Em relação ao estufamento gasoso, existem 2 tipos: precoce e tardio.

O estufamento precoce é aquele que ocorre em queijos frescos. Ele acontece em até 8 dias após a produção, é causado por bactérias do grupo coliforme, que tem a capacidade de fermentar a lactose, presente em concentrações elevadas nesse tipo de queijo, produzindo gás carbônico. A contaminação por esse grupo de microrganismos é, normalmente, pela manipulação inadequada do alimento, falta de pasteurização ou até mesmo pela presença de antibióticos no leite.

O estufamento tardio constitui em defeito frequentemente observado nos queijos de massa semicozida ou cozida e de maturação prolongada. Bactérias formadoras de esporos do

gênero *Clostridium* spp. têm sido apontadas como responsáveis por alterações do queijo, principalmente as espécies *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* e *C. sporogenes*. Esses microrganismos caracterizam-se como bastonetes móveis, Gram-positivos, medem de 0,8 a 6,0 µm de comprimento e crescem em uma faixa de temperatura ideal de 32°C a 37°C, e de pH entre 6,8 e 7,0 (FURTADO, 2017).

Outro tipo de microrganismo produtor de gás em queijos maturados são as bactérias propiônicas. As bactérias propiônicas, principalmente a espécie *Propionibacterium freudenreichii*, apresentam papel importante na tecnologia de produção de queijos com olhaduras, como do tipo suíço, uma vez que os produtos do seu metabolismo contribuem para o desenvolvimento de sabor e aroma e olhaduras nesses queijos. Esse tipo de produção de gás é desejável em queijos que possuam como característica a presença de olhaduras, bem como metabolitos secundários de sabor e aroma, são exemplos os queijos suíço, emmental, prato esférico, gruyère, entre outros. Já quando há ocorrência desse tipo de olhadura em queijos que não possuam essa característica, isso representa considerável defeito (FURTADO, 2017).

Tal defeito foi relatado por uma empresa que possui sede em três cidades (Quintinos, Arapuã e Tiros) na região de Carmo do Paranaíba em Minas Gerais. Como nos foi apresentado, o defeito ocorrente é a aparição de olhaduras em queijos em que estas não deveriam aparecer, indicando a contaminação destes por microrganismos produtores de gás.

Face à importância econômica e social do queijo e os prejuízos causados pelo estufamento indesejável nesse produto, objetivou-se promover ações corretivas e preventivas para o controle da ocorrência de olhaduras indesejáveis em queijos, através da identificação dos microrganismos causadores do defeito e das possíveis fontes de contaminação para a prescrição de um plano de ações corretivas e preventivas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Queijo

2.1.1 Definição

Conforme a Portaria de nº 146, de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 1996), no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (RTIQQ):

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua fabricação.

Entende-se por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

A denominação QUEIJO está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea.

2.1.2 Classificação

O mesmo regulamento técnico determina que a classificação se aplicará a todos os queijos e não impede o estabelecimento de denominações e requisitos mais específicos, característicos de cada variedade de queijo que aparecerá, nos padrões individuais.

De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em percentagem, os queijos classificam-se em (BRASIL, 1996):

- Extra Gordo ou Duplo Creme: quando contenham o mínimo de 60%.
- Gordos: quando contenham entre 45,0 e 59,9%.
- Semigordo: quando contenham entre 25,0 e 44,9%.
- Magros: quando contenham entre 10,0 e 24,9%.

- Desnatados: quando contenham menos de 10,0%.

De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classificam-se em:

- Queijos de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijos de massa dura): umidade de até 35,9%.
- Queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijos de massa semidura): umidade entre 36,0 e 45,9%.
- Queijos de alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou “macios”): umidade entre 46,0 e 54,9%.
- Queijos de muito alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou “mole”): umidade não inferior a 55,0%.

Quando submetidos ou não a tratamento térmico logo após a fermentação, os queijos de muito alta umidade se classificam em (BRASIL, 1996):

- Queijos de muito alta umidade tratados termicamente.
- Queijos de muito alta umidade.

2.1.3 Composição

O RTIQQ contido na portaria nº 146, de 07 de março de 1996, do MAPA, estabelece como ingredientes obrigatórios em queijos:

- Leite e/ou Leite reconstituído (integral), semidesnatado, desnatado e/ou soro lácteo. Onde: entende-se por leite o proveniente das espécies bovinas, caprina, ovina ou bubalina. Quando não existe uma referência específica, entende-se como leite da espécie bovina.
- Coagulante apropriado (de natureza física e/ou química e/ou bacteriana e/ou enzimática).

Ingredientes opcionais:

- Cultivos de bactérias lácteas ou outros microrganismos específicos, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, caseína, caseinatos, sólidos de origem láctea, condimentos ou outros ingredientes opcionais permitidos somente conforme o previsto,

explicitamente, nos padrões individuais definidos para variedade de queijo (BRASIL, 1996).

2.1.4 Requisitos

O RTIQQ contido na portaria nº 146, de 07 de março de 1996, do MAPA determina os seguintes requisitos para queijos:

- Os queijos deverão obedecer aos requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade, estabelecidos no padrão individual correspondente.
- Acondicionamento: poderão ser acondicionados ou não, e, dependendo da variedade de queijo de que se trata, apresentarão envases ou envoltórios bromatologicamente aptos recobrando a sua casca, aderindo ou não à mesma (BRASIL, 1996).

2.2 Importância do queijo no Brasil

Segundo levantamento do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal - DIPOA, em 2016, as indústrias de laticínios estão presentes em todo o território nacional e somam 1.679 estabelecimentos. A concentração se dá, em sua maior parte, nas regiões de maior produção de leite, principalmente na região centro-sul de Minas Gerais, que abriga 36% de todas as indústrias de laticínios fiscalizadas, somando 609 unidades. Completando: na região Sudeste são 868 empresas, sendo 180 em São Paulo, 50 no Rio de Janeiro e 29 no Espírito Santo; na região Sul, existem 149 unidades no Paraná, 105 no Rio Grande do Sul e 90 em Santa Catarina; no Centro-Oeste, são 252 unidades e 159 estão em Goiás; nas regiões Norte e Nordeste, mais 100 estabelecimentos em cada uma delas (ZOCCAL, 2016).

A Junta Comercial do Estado de Minas Gerais registra 1.995 unidades de processamento de leite, considerando também a inspeção estadual e municipal. A maioria delas é de médio e pequeno porte. Em território mineiro, estima-se que 6,1 bilhões de litros de leite sejam transformados em queijos por ano. A produção total do Estado é de 9,5 bilhões de litros de leite. A produção de queijo, que acontece em todas as regiões do País, é o destino de cerca de 60% do leite informal, estimado em 10 bilhões de litros, ou seja, 6 bilhões de litros de leite/ano são transformados em diferentes tipos de queijos (JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS - JUCEMG, 2016).

Segundo a ABIQ (2016) a produção de leite no Brasil, em 2015, ficou em aproximadamente 34 bilhões de litros. Desse volume, 24 bilhões de litros foram captados por indústrias. Do leite inspecionado e processado, 54% foram embalados como leite fluido, leite em pó, iogurtes e sobremesas, enquanto 46% (11 bilhões de litros) foram transformados em queijos. Desse total, 68% foram queijos considerados como grandes commodities, que são a muçarela, o queijo prato e o requeijão culinário, como se observa na tabela 1.

Tabela 1 - Estimativa da produção formal de queijos no Brasil, 2015

	Produção T	Importações⁴ T	Exportações⁴ T	Total Kg
Produção Nacional	1.105.431	21.550	2.522	1.124.459
Grandes commodities¹	750.215	11.787	747	761.255
Commodities intermediárias²	285.104	7.053	1.223	290.934
Queijos especiais³	70.112	2.710	552	72.270

Fonte: ABIQ (2016) (empresas com SIF).

¹Grandes commodities – queijo muçarela, prato e requeijão culinário

²Commodities intermediárias – queijo fundido, processado, fresco, minas padrão, coalho e parmesão ralado.

³Queijos especiais – queijos brancos e azuis, amarelos especiais, suíços, duros e semiduros

Os dados sobre o mercado internacional de queijos em 2015 são apresentados na tabela 1. Neste mesmo ano foram importadas 21.550 toneladas de diferentes tipos de queijo e exportamos 2.522 toneladas, o que nos coloca como importadores de lácteos. A origem das importações foi a Argentina (50%) e o Uruguai (36%). Também foram importados queijos da Holanda, França, Itália e Alemanha, além de outros países. Os principais produtos importados foram a muçarela, o queijo fundido e a pasta semidura. Em 2015, as compras totalizaram US\$ 95,6 milhões (ABIQ, 2016). Em 2015, foram captados por indústrias de laticínios com inspeção, aproximadamente 70% da produção nacional. O leite informal é vendido diretamente ao consumidor e processado na própria fazenda. A maior parte desta produção se transforma em queijo minas frescal, minas padrão e muçarela. O comércio desses produtos é frequente nas pequenas cidades do interior do País e na periferia das grandes cidades.

As exportações brasileiras ainda são bastante pequenas e totalizaram US\$ 10,8 milhões. Os queijos brasileiros foram consumidos em 13 países, mas nosso maior comprador no ano passado foi o Chile (39%); em menor proporção, o Paraguai (13%) e Taiwan (12%). Nos primeiros seis meses de 2016, foram importadas 17.417 toneladas, com valor aproximado

de US\$ 57,1 milhões. As importações foram principalmente de musçarela (36%) e queijos de pasta semidura (25%). Esses produtos vieram do Uruguai (46%) e da Argentina (25%). As exportações, até junho desse ano, renderam US\$ 5,7 milhões (1.394 toneladas exportadas) e foram para 12 países, sendo a Rússia e o Chile os maiores compradores (ABIQ, 2016).

2.3 Qualidade de um alimento

2.3.1 Segurança microbiológica

Os microrganismos estão presentes no ambiente, em animais, vegetais, bem como no próprio ser humano. Dessa forma, qualquer alimento, *in natura* ou processado, pode conter algum tipo de contaminação. Essa contaminação pode ter como consequência simplesmente alterações físico-químicas do produto ou até graves infecções no consumidor. São necessários devidos cuidados para que um alimento seja considerado seguro para o consumo, como: higiene ambiental, dos alimentos, das mãos, dos manipuladores, de utensílios e equipamentos, além da temperatura em que o alimento será mantido durante a manipulação, preparo, armazenamento até seu consumo, bem como o tempo em que ele ficará exposto a essas temperaturas durante essas etapas (EDUARDO et al., 2008).

As Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs), de origem microbiana, vêm aumentando significativamente, mesmo em países desenvolvidos. Grande parte dessas doenças, ocorridas nos países latino-americanos, é causada por alimentos contaminados com microrganismos patógenos e, no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016), no período de 2007 a 2016, os principais microrganismos causadores de DVAs são, *Salmonella* spp. (7,5%), *Escheria coli* (7,2%), *Staphylococcus aureus* (5,8%), *Bacillus cereus* (2,6%), coliformes (1,8%) e *Clostridium perfringes* (1,7%).

Dentre os principais microrganismos indicadores de segurança está o grupo de coliformes que é composto por bactérias da família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos e não formadores de esporos. Esse grupo é composto basicamente por bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Entre eles, apenas a *Escherichia coli* tem como habitat primário o trato intestinal do homem e animais, sendo indicada de contaminação fecal. Os outros, podem também, ser encontrados em outros ambientes como vegetais e no solo, onde conseguem resistir por um maior tempo se comparados às bactérias patógenas de origem intestinal. O grupo de Coliformes totais inclui as bactérias na forma de bastonetes Gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou aeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose

com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Apresenta-se cerca de 20 espécies, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato intestinal de humanos e outros animais de sangue quente. Os Coliformes fecais são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5°C - 45,5°C. Esse grupo inclui três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo as cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* de origem não fecal. A *E. Coli* é a mais conhecida, sendo seu habitat o trato gastrintestinal, ela é a indicadora de contaminação fecal em alimentos processados (GEUS; LIMA, 2008; SILVA, 1997).

Dessa forma, a presença de coliformes totais nos alimentos não é indicativo de contaminação fecal recente, no entanto, são importantes indicadores de condições de higiene precária, podendo haver contaminação pós-processamento, indicando deficiência nos processos de limpeza, sanitização e tratamento térmico, além de possível multiplicação e desenvolvimento durante o processamento e estocagem do produto (MENDES; SILVA; ABRANTES, 2009).

A presença de coliformes termotolerantes no alimento representa a grande possibilidade do mesmo ter tido contato com materiais de origem fecal, esse tipo de coliforme é um grupo que faz parte dos coliformes totais. Esse grupo possui a capacidade de consumir lactose produzindo ácido e gás, com sua temperatura ótima de atuação em torno de 45°C. Por ser o melhor indicador de contaminação fecal, é sempre desejável a determinação da *E. coli* na população de coliformes.

O conhecimento a respeito dos coliformes fecais se faz importante, pois cepas enteropatogênicas podem causar diarreia e vômito em crianças e cepas toxigênicas, como a *E. coli* O:157H7, podem causar síndrome urêmica hemolítica (JAY, 2005; MHONE; MATORE; SAIDI, 2011).

Os coliformes são bastante difundidos e encontrados em muitos alimentos, mas não indicam necessariamente uma contaminação fecal (MILLER, 2008). Antigamente, os coliformes fecais eram definidos como aqueles capazes de fermentar a lactose com produção de gás em 48 horas a 45°C, porém não só a *Escherichia coli* como algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* podem apresentar essa característica, sendo que somente a *Escherichia coli* tem como habitat primário o intestino humano e de animais. Frente a isso, o Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) adotou a denominação de coliformes a 45°C tanto para “coliformes de origem fecal” como para “coliformes termotolerantes”. Esses microrganismos são subdivididos em dois grupos: os coliformes totais (coliformes a 35°C, oriundos do trato gastrointestinal e do ambiente, usados como indicadores da qualidade higiênica dos

alimentos) e os coliformes a 45°C (provenientes de contaminação fecal e usados como indicadores da qualidade sanitária dos alimentos) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.4 Defeitos em queijos

A produção de queijo é processo delicado e demanda uma série de cuidados. Devido à composição do leite, ao processo de coagulação, à manipulação da massa até a maturação dos mesmos pela ação de microrganismos, o produto final pode apresentar uma série de defeitos se não forem tomados os devidos cuidados durante todo esse processo. Furtado (2017) descreve diversos problemas em queijos desde aqueles relacionados com a qualidade do leite até aos problemas relacionados ao processo fermentativo. Os principais problemas citados pelo autor são: alterações de sabor, problema de textura e consistência, problemas de manchas e descoloração, trincas, olhaduras periféricas, olhaduras mais centrais além dos estufamentos precoce e tardio.

Dentre os problemas citados anteriormente, o estufamento merece grande atenção das indústrias queijeiras, sendo esse um dos problemas mais recorrentes.

2.5 Estufamento em queijo

Dos estufamentos que acontecem em queijos existem os desejáveis e os indesejáveis. Os desejáveis são produzidos, normalmente, por bactérias propiônicas e apresentam a formação de olhaduras redondas e regulares, são desejáveis em alguns tipos de queijo, como os suíços emmental e gruyère. Entretanto, esse tipo de olhadura se torna defeito em queijos cuja textura deve ser fechada ou com pequenas olhaduras produzidas por outros tipos de bactérias, denominadas heterofermentativas ou aromáticas, como *Lactococcus lactis* subs. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides*.

Os estufamentos não desejáveis são aqueles que acontecem em queijos que não possuam essa característica, o que representa um defeito. Dentre os considerados defeito, há dois tipos: o precoce e o tardio.

Os estufamentos, tardio e precoce, são defeitos graves em queijos, estando associados a microrganismos e ocorrem logo após a fabricação no caso do estufamento precoce, enquanto que o estufamento tardio aparece depois de algum tempo, durante o processo de maturação. Ambos apresentam grande impacto na indústria queijeira.

2.5.1 Estufamento precoce

O estufamento precoce ocorre logo após a fabricação, podendo inclusive aparecer no tanque, durante a manipulação. Esse defeito é causado pela presença de bactérias coliformes que, por fermentarem a lactose, produzem gás precocemente, quando a concentração desse carboidrato ainda é elevada. Para o controle desse grupo de microrganismo são, tecnicamente, recomendadas apenas duas ações, quais sejam: pasteurização do leite e utilização correta das boas práticas de fabricação (BPF).

Além de oferecer risco à saúde dos consumidores, a presença de resíduos de antibióticos está vinculada a outros problemas, como à perda de eficiência na produção de derivados, como queijos e iogurtes.

São incontáveis os prejuízos aos laticínios devido à presença de antibióticos no leite. Sua presença é capaz de promover a inibição parcial das bactérias lácticas utilizadas nos processos fermentativos, com isso há uma diminuição do pH, comprometendo a qualidade sensorial de seus derivados, além dos riscos de crescimento de coliformes e bactérias patogênicas serem maiores, pois essas substâncias agem sobre bactérias Gram-positivas, e como os coliformes e algumas bactérias patogênicas são Gram-negativas, não sofrem efeito desses antibióticos. É importante lembrar que processos térmicos não reduzem a atividade dos antibióticos, e que fermentos lácteos podem ser inibidos até mesmo por traços de antibióticos (TRONCO, 2008).

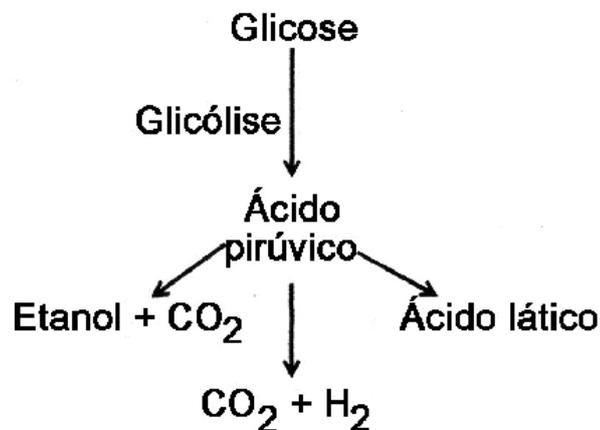
A presença de contaminantes residuais tem sido um dos pontos mais visados pela indústria de laticínios, visto os grandes problemas que ela traz para a produção de derivados (ANDREW et al., 2009). Além dos riscos que a presença desses antibióticos em leite pode causar ao consumidor, como os microbiológicos, os imunopatológicos bem como os toxicológicos.

O risco microbiológico é causado pela ação de seleção de cepas resistentes, o que compromete o equilíbrio intestinal além de possíveis tratamentos médicos futuros (COSTA, 2002). A exposição a essas substâncias pode gerar uma resistência em bactérias o que pode trazer complicações a procedimentos médicos, o que resulta num aumento das taxas de mortalidade e morbidade na população (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2013).

A respeito dos riscos toxicológicos, o principal é o consumo do leite contaminado por gestantes, a exposição do feto a substâncias com potencial efeito teratogênico, pode ser tóxico e causar alterações no desenvolvimento ósseo fetal (COSTA, 1996). Também pode haver desenvolvimento da anemia aplásica, que está ligada à ingestão de cloranfenicol (CHUNG, 2009), além dos nitrofuranos desenvolverem ação carcinogênica (COSTA, 2002).

Além dos prejuízos na produção de produtos lácteos e dos riscos à saúde do consumidor, a presença de antibióticos também pode se tornar um risco ambiental, pois esses resíduos muitas vezes são descartados indevidamente em rios e lagos depois de seu uso (HSIEH et al., 2009). Para que não ocorra esse tipo de contaminação, os produtores devem reduzir a eliminação de resíduos químicos das operações de limpeza e desinfecção durante toda a ordenha (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO - FAO / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE - OMS, 2009). As bactérias causadoras do estufamento precoce têm como substrato principal a lactose, podendo ocorrer dois tipos de fermentação: homolática (produto final: ácido láctico) e heterolática (produtos finais: ácido láctico, etanol e gás carbônico). Nesse processo, a molécula de lactose é clivada em monossacarídeos de glicose e galactose, esses são hidrolisados formando o ácido pirúvico que é reduzido diretamente a ácido láctico pelo NADH e liberando energia. As bactérias do grupo coliforme realizam fermentação heterolática, ou seja, além da produção de ácido láctico, produzem gás carbônico, gás responsável pelo estufamento tardio. Esta rota é ilustrada na figura 1, a seguir:

Figura 1- Fermentação da lactose



Fonte: Do autor (2018).

Tal reação obedece a seguinte estequiometria:



A partir de 2 moléculas de glicose são geradas 2 moléculas de ácido láctico, 1 molécula de ácido acético, 1 molécula de etanol, 2 moléculas de gás carbônico e 2 moléculas de hidrogênio (FURTADO, 2017).

2.5.2 Estufamento tardio

O estufamento tardio, por sua vez, é causado pelo crescimento de bactérias esporuladas, tendo como principal causador o *Clostridium tyrobutyricum* e menos intensamente por *C.butyricum*, *C.sporogenes* e *C.beijerinckii*, os quais também contribuem, embora menos frequentemente, para a produção de gás em queijo. Esses esporulados não fermentam a lactose mas sim lactatos, que só se apresentam em concentrações significativas após dez dias de maturação, além disso, somente após esse período é que na massa do queijo são criadas condições favoráveis à germinação de seus esporos, tais como: ambiente anaeróbio, presença de peptídeos de baixo peso molecular dentre outros, centro do queijo ainda desprovido de sal. Com isso, nesse período, os esporos germinam, e células vegetativas se multiplicam, produzindo: CO₂, hidrogênio e produtos de de proteólise de odor e gosto extremamente desagradável. O estufamento é causado pelo acúmulo de hidrogênio, que não sendo solúvel em água, abre verdadeiras crateras na massa do queijo. Como citado por Donnelly e Busta (1981), o defeito não se torna perceptível até depois de alguns meses de maturação, que o distingue do gás formado pelos coliformes, que ocorre dentro de 1 e 3 Dias de fabricação. Em 2017, Furtado cita alguns pontos de possível contaminação na produção de queijos:

- Uso de fermento láctico sem estar em plena atividade: o fermento láctico estando ativo, serve como concorrente à carga contaminante, metabolizando a lactose (no caso do estufamento precoce) e o lactato (no caso do estufamento tardio) mais rapidamente e impedindo a produção de gás. Pasteurizador: defeitos no processo de pasteurização são pontos graves de contaminação, desde a presença de microfuros no pasteurizador, ocasionando a recontaminação do leite, bem como falhas no controle de temperatura, não havendo a destruição da carga microbiana necessária.

- Tubulações e conexões: a não higienização correta e periódica desses itens se torna um grave problema. Mesmo em casos onde há o sistema fechado (CIP) é aconselhado que o circuito seja desmontado periodicamente.
- Tanques de fabricação: necessária a limpeza e desinfecção correta, além da constante verificação da presença de furos, podendo se tornar importantes focos de contaminação.
- Utensílios: quando há a certeza de que a pasteurização está sendo corretamente conduzida e que não há problemas em tanques e tubulações, os utensílios de fabricação são os principais responsáveis por recontaminação quando estes não são bem limpos e sanitizados.
- Higiene pessoal dos funcionários: é de importância fundamental a observação das boas práticas de higiene por quaisquer pessoas que participem do processo de fabricação de queijos.
- Qualidade microbiológica do leite: em se tratando do estufamento tardio, este problema está intimamente ligado à presença de bactérias esporuladas do grupo butírico (*Clostridium butyricum* e *Clostridium tyrobutyricum*). Essas bactérias resistem à temperatura de pasteurização, permanecendo no leite até o tanque de fabricação (FURTADO, 2017).

Os lactobacilos hetero-fermentativos são também produtores de gás, que em alguns tipos de queijos são desejáveis, mas em outros são considerados defeitos que podem ser de textura e sabor. Inicialmente encontrados em pequenas quantidades no leite, estas bactérias podem atingir mais de 10^7 UFC.g⁻¹ dentro de 4-6 semanas e pode produzir quantidades excessivas de CO₂, dando origem à formação olhaduras ou rachaduras dependendo da consistência do queijo) e de sabor não característico do queijo (FURTADO, 2017).

2.5.2.1 Fermentação do ácido butírico

Um dos maiores problemas concernentes ao aparecimento de olhaduras em queijos onde as mesmas não são características daquele tipo específico, é identificar o agente causador desse defeito. Como já citado, o *C. tyrobutyricum* é o principal suspeito nesses casos, demandando maiores atenções.

A fermentação do ácido butírico, também conhecida como defeito do estufamento tardio (Late blowing defect - LBD), é uma causa principal de deterioração em queijos

semiduros e duros. Isso resulta no aparecimento de defeitos de textura e sabor que geram perdas econômicas severas na indústria de queijos. *C. tyrobutyricum* é uma bactéria formadora de esporos, Gram-positiva anaeróbica, que é considerada principal causa de LBD no queijo, mas outras espécies de clostrídios tais como *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* e *C. butyricum* também contribuíram significativamente para a ocorrência de LBD em queijo (ÁVILA et al., 2014; BERMÚDEZ et al., 2016; LE BOURHIS et al., 2007).

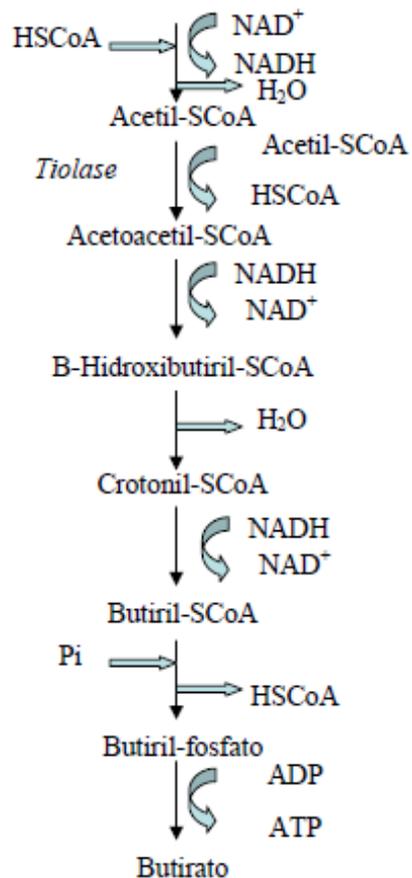
O LBD aparece quando as cepas de clostrídios realizam a fermentação do ácido láctico durante a maturação do queijo. Quando o ácido láctico é metabolizado, outros ácidos orgânicos, principalmente ácido butírico e gases, tais como dióxido de carbono e hidrogênio são produzidos. A pressão de gases acumulados provoca fissuras e fendas, que geralmente são acompanhadas por aroma desagradável e sabor de ranço. Os queijos com LBD apresentam níveis mais baixos de lactose, galactose, ácido cítrico e ácido láctico do que os queijos sem o defeito, enquanto que os ácidos acético e butírico, além de outros compostos voláteis, tais como 2-propanol e 1-butanol, encontram-se em níveis elevados (BASSI; PUGLISI; COCCONCELLI, 2015).

Bactofugação e microfiltração de leite, bem como a adição de nitrato ou Lisozima, são estratégias comuns para prevenir LBD de queijo. Contudo, a redução dos números de esporos obtidos pela bactofugação podem ser insuficientes para impedir o LBD, a microfiltração só pode ser aplicada ao leite desnatado, porque os glóbulos de gordura do leite são muito grandes para passar pelos poros da membrana. Uma estratégia alternativa bem sucedida para prevenir LBD é a inoculação do leite de queijo com bactérias lácteas (Lactic acid bacteria - LAB). A irradiação também está sendo investigada para controlar LBD em queijo (ÁVILA et al., 2014).

O controle do crescimento do *Clostridium tyrobutyricum* é feito pelas indústrias através da adição de, basicamente, um dos seguintes componentes: Nitrato, lisozima ou lizina. O mais comumente utilizado era o nitrato, devido ao seu custo ser bastante inferior aos demais. Tem sua ação dependente de uma enzima presente naturalmente no leite, a Xantina-oxireductase, que tem a função de reduzir o nitrato a nitrito, sendo o nitrito responsável pela inibição do microrganismo. Essa determinada enzima pode ser desnaturada se houver uma superpasteurização; dessa forma, a adição do nitrato perde o efeito inibitório, uma vez que ele não será convertido em nitrito. O nitrato possui como desvantagens ser consirado um componente carcinogênico e o soro proveniente não pode ser usado para produtos infantis, por exemplo, dificultando ter uma finalidade para ele, o que representa prejuízo à indústria (ÁVILA et al., 2014).

Atualmente, o mais usado pelas indústrias é a lisozima. Tem ação de enfraquecer a parede celular das bactérias. Assim, com a diferença de potencial osmótico resulta no rompimento e, conseqüentemente, na morte dessas bactérias. Apresenta um custo mais elevado, no entanto não inviabiliza a utilização do soro produzido. A fermentação butírica geralmente está associada ou ocorre depois da fermentação láctica, que produz ácido láctico e este, em meio aquoso, se dissocia em lactato e o íon H^+ . A reação química é realizada por bactérias anaeróbias, que têm a capacidade de fermentar lactatos presentes no queijo, formando metabolicamente o ácido butírico, acético, fórmico, gás carbônico e hidrogênio além de odores desagradáveis. A figura 2 demonstra a rota de formação do ácido butírico:

Figura 2 - Fermentação butírica



Fonte: Oliveira, Zanine e Santos (2007).

Tal rota obedece a seguinte estequiometria:



A partir de 2 moléculas de lactato são geradas 1 moléculas de ácido butírico, 2 moléculas de gás carbônico e 2 moléculas de hidrogênio (FURTADO, 2017).

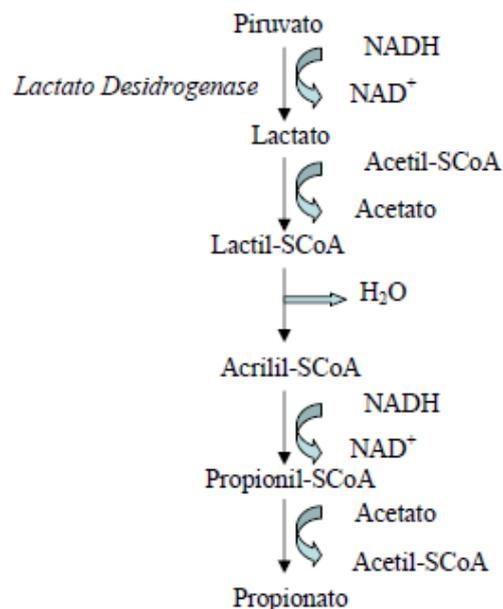
2.5.2.2 Fermentação do ácido propiônico

O CO₂ é um dos gases mais importantes que podem ser formados por microrganismos (bactérias, leveduras e fungos filamentosos) durante a maturação do queijo e sua vida útil, a formação do CO₂ é devido à conversão metabólica de diversos substratos disponíveis (os ácidos, lactose, citrato, lactato e aminoácidos, entre outros) (FURTADO, 2017). A mais importante das vias metabólicas, como reportado por Freohlich-Wijder e Bachmann (2004) em termos de quantidade de produção de CO₂ em queijos curados, são das bactérias do ácido propiônico (PAB), que são utilizadas na fabricação de vários queijos do tipo suíço como Emmental, Gruyere, Maasdam, dentre outros. Estes queijos são diferentes de todos os outros queijos devido à presença dos olhaduras típicas, que são considerados como um elemento fundamental de parâmetro de qualidade. Alguns pesquisadores Frohlich-Wyder e Bachmann (2004) e Huc et al. (2014). têm destacado que a produção de CO₂ é um dos fatores mais importantes que afetam o crescimento das olhaduras nos queijos acima referidos. Queijos duros e semiduros com intensa fermentação PAB (por exemplo Emmental e Maasdam, entre outros) geralmente em salmoura e a sua maturação é caracterizado pela presença de um período sala quente. Depois de salga, estes queijos são mantidos a uma temperatura relativamente baixa por 1 ou 2 semanas, antes de ser transferida para um quarto relativamente mais quente para algumas semanas (MIKS-KRAJNJK et al., 2013). A fermentação PAB é intensificada à temperatura ambiente quente, que conduzem à produção de CO₂ intensa e consequente formação dos orifícios típicos. Uma vez que a produção de CO₂ em tais queijos é estritamente dependente de fermentação PAB, condições ambientais que afetam a atividade da PAB terá impacto sobre a produção de CO₂, e, por conseguinte, a qualidade do queijo final, em termos de crescimento, olhadura e distribuição. Embora os fatores ambientais que possam afetar a PAB, no queijo são conhecidos em termos gerais (relação de massa de sal para queijo umidade S / atividade de água, temperatura de maturação, pH do queijo, a disponibilidade do substrato, pressão parcial de oxigênio) (BERESFORD et al., 2001).

Com exceção do estufamento precoce, os produtos mais frequentemente sujeitos ao defeito de olhaduras indesejáveis são as que aparecem em queijos de média e longa maturação, preparado a partir de coagulação enzimático. Estes tipos de queijo são

caracterizados por uma textura impermeável. Consequentemente, o gás fica preso no queijo, já que não pode difundir para o exterior. Acumulação de gás resulta na formação de olhaduras ou crateras e, inevitavelmente no estufamento da massa do queijo. Este fenômeno é incomum se o produto for armazenado sob refrigeração devido à natureza mesofílica dos clostrídios, mas sua frequência aumenta quando ocorre abuso de temperatura e se as condições são favoráveis para o crescimento de clostrídios, isto é, água atividade (aw) superior a 0,93 e pH relativamente elevado (DONNELLY; BUSTA, 1981). As bactérias propiônicas podem crescer e produzir o ácido propiônico mesmo se a microbiota do ácido láctico estão presentes, como nas variedades de queijo Gouda e Emmental. O ácido propiônico é formado através da rota do acrilato, que a partir da conversão do lactato em acrilato, forma o propionato, tal rota é ilustrada na figura 3, a seguir:

Figura 2 - Rota do acrilato



Fonte: Oliveira, Zanine e Santos (2007).

Esta reação obedece a seguinte estequiometria:



A partir de 2 moléculas de ácido láctico são geradas 2 moléculas de ácido propiônico, 1 molécula de ácido acético, 1 moléculas de gás carbônico e 1 moléculas de água (FURTADO, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida através das seguintes etapas: identificação do laticínio em questão, levantamento das possíveis falhas causadoras do problema (Conversa direta com o supervisor de produção), primeira fase de coleta de amostras para análises (Amostras foram coletadas pelo supervisor de produção na cidade de Arapuá-MG e enviadas para análise nos laboratórios de lácteos e de microbiologia dos alimentos do departamento de ciências dos alimentos – UFLA, segunda fase de coleta de amostras para análise (Visita ao laticínio para coleta de amostras de queijo, água, leite e soro) e levantamento de informações para detecção das possíveis falhas) e, assim, foram detectadas as possíveis causas da contaminação e prescritas as ações corretivas e preventivas.

- Identificação do laticínio: O laticínio é composto por fábricas de queijo identificadas na região do Alto Paranaíba do estado de Minas Gerais. A fábrica possui três unidades fabris localizadas nas cidades de Tiros, Arapuá e Quintinos. Dentre outros produtos de sua fabricação, os queijos que apresentavam o defeito de olhaduras indesejáveis foram: Reino, Parmesão, Prato, Prato esférico, Montanhês.
- Fase I: Os primeiros queijos avaliados foram 2 queijos parmesão em diferentes estágios de maturação, sendo a amostra 1 com 120 dias de maturação e a amostra 2 com 90 dias de maturação. A avaliação da qualidade microbiológica foi feita através de colimetria, contagem total em placa, quantificação de Clostrídios sulfito redutor e bactérias propiônicas. Além de ser feita composição físico-química.
- Fase II: Na segunda etapa foram avaliados 6 queijos, sendo 4 amostras de parmesão em diferentes estágios de maturação, sendo a amostra 3 e 4 com 120 dias de maturação, mas de lotes de produção diferentes, a amostra 5 com 60 dias de maturação e a amostra 6 com 30 dias de maturação, as amostras 7 e 8 foram de queijo prato e prato esférico, respectivamente. A avaliação da qualidade microbiológica dos queijos foi feita através de colimetria, contagem total em placa, quantificação de Clostrídios sulfito redutor, bactérias propiônicas e estafilococcus coagulase positiva. Além de ser feita composição físico-química.
 - ÁGUA: A qualidade da água foi avaliada pelas coletas de amostras de água em

diferentes fontes no interior da indústria, sendo as seguintes: A1 – Água utilizada para limpeza da linha de produção de creme de leite, A2 – Água utilizada no sistema CIP, A3 – Água utilizada para limpeza da linha de produção de queijo parmesão e A4 – Água pós-sanificação da linha de queijo parmesão. As análises feitas foram a colimetria e contagem em placa.

- LEITE E SORO: Foi verificada a qualidade do leite e do soro através de amostras de leite já pasteurizado, do soro fermento utilizado para a fabricação do queijo parmesão e do soro coletado após a prensagem da massa e foram identificadas da seguinte forma: L1 – Leite pós-pasteurização; L2 – Soro pós-prensagem; L3 – Soro fermento. As análises feitas foram a colimetria e contagem total em placa.

3.1 Análises

As amostras foram devidamente coletadas e acondicionadas e trazidas para os Setores de Laticínios e Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos, onde foram submetidas às seguintes análises:

- Composição físico-química (pH, teor de sal, umidade, gordura dentre outras), segundo metodologias descritas pela Association of Official Agricultural Chemists - AOAC (2005) e Federation Internationale du Lait - FIL / International Dairy Federation - IDF (2004).
- Análises microbiológicas: Foram realizadas as análises de colimetria, quantificação de clostrídios, estafilococos coagulase positiva, bactérias propiônicas e contagem total em placa.

3.1.1 Análise microbiológicas

Todas as análises foram realizadas de acordo com Silva et al. (2010).

3.1.1.1 Preparo das amostras

Foram retiradas de cada queijo, de forma representativa, 25g de amostra que foram adicionadas em 225mL de solução de citrato de sódio (5%). As amostras foram

homogeneizadas em homogeneizador do tipo Stomacher (490golpes/min) e utilizadas.

3.1.1.2 Colimetria

Foram feitas as quantificações de coliformes totais e coliformes termotolerantes, utilizando a técnica do número mais provável (NMP). Todas as amostras foram avaliadas empregando-se a técnica de diluição múltipla com séries de 3 tubos. O teste presuntivo foi realizado utilizando caldo lauril sulfato de sódio com incubação a 37°C por 24-48 horas. Para o teste confirmativo foi utilizado o caldo bile verde brilhante com incubação a 37°C por 24-48 horas e a quantificação de coliformes termotolerantes foi realizada empregando-se caldo EC com incubação a 45°C por 24-48h. Os resultados foram analisados em tabela do Número Mais Provável (NMP).

3.1.1.3 Contagem total

Alíquotas de 1mL das diluições adequadas (realizadas em água peptonada 0,1%) foram inoculadas em ágar Triptona de soja (TSA) e incubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento, as colônias foram quantificadas e cerca de 5 de cada de cada placa foram isoladas e transferidas para tubos contendo TSA inclinado e incubados a 37°C por 24 horas. Após verificação da pureza, os isolados foram identificados em MALDI-TOF, empregando-se o *software* Biotyper versão 3.0 (Bruker).

3.1.1.4 Quantificação de Clostrídios sulfito redutor

Alíquotas de 100µL das diluições adequadas (realizadas em água peptonada 0,1%) foram inoculadas em ágar Sulfite Polymyxin Sulfadiazine (SPS) e incubadas a 37°C por 48 horas, em jarra contendo gerador de anaerobiose. Após crescimento as colônias foram quantificadas e os isolados foram identificados em MALDI-TOF, empregando-se o *software* Biotyper versão 3.0 (Bruker).

3.1.1.5 Quantificação de bactérias propiônicas

Alíquotas de 100µL das diluições adequadas (realizadas em água peptonada 0,1%) foram inoculadas em ágar lactato e incubadas a 30°C por 48 horas, em jarra contendo gerador

de anaerobiose. Após crescimento, as colônias foram quantificadas e cerca de 5 de cada placa foram isoladas e transferidas para tubos contendo TSA inclinado e incubados a 37°C por 24 horas. Após verificação da pureza, os isolados foram identificados em MALDI-TOF, empregando-se o *software* Biotyper versão 3.0 (Bruker).

3.1.1.6 Quantificação de Staphylococcus

Alíquotas de 100µL das diluições adequadas (realizadas em água peptonada 0,1%) foram inoculadas em ágar Baird-Parker e incubadas a 37°C por 48 horas. Após crescimento, colônias típicas e atípicas foram isoladas e transferidas para o meio de cultura adequado. Após verificação da pureza, os isolados foram identificados em MALDI-TOF, empregando-se o *software* Biotyper versão 3.0 (Bruker).

3.1.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas utilizando-se da metodologia sugerida pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC (2005).

3.1.2.1 Umidade

O método utilizado foi o de secagem em estufa (105°C ± 5°C), baseado na remoção da água por aquecimento. As amostras foram colocadas em cadinhos de alumínio, com massas previamente determinadas, ficando em estufa até a secagem. Os cadinhos contendo as amostras foram, então, resfriados à temperatura ambiente, em dessecador, tendo sua massa novamente determinada. Logo após, os cadinhos retornaram à estufa e este procedimento foi repetido até a obtenção de massa constante. Foi calculada, então, a porcentagem de umidade. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.1.2.2 Proteína total e frações

A determinação de proteínas foi realizada pelo método de Kjeldahl, no qual se avaliou o teor de nitrogênio total de origem orgânica, utilizando-se 0,5g de amostra em tubo para digestão. O procedimento do método baseou-se na digestão da amostra com ácido sulfúrico e mistura catalisadora contendo sulfato de cobre e sulfato de potássio para acelerar a reação. Assim, todo o

carbono e hidrogênio foram oxidados a gás carbônico e água. O nitrogênio da proteína foi reduzido e transformado em sulfato de amônio. O nitrogênio solúvel foi estabelecido em tampão de acetato a pH 4,6 e o nitrogênio não proteico, estabelecido em ácido tricloroacético (TCA) 12%. Destilou-se a amostra digerida em meio básico por adição de hidróxido de sódio 50%, para a liberação da amônia. A amônia foi recolhida em solução de ácido bórico, formando borato de amônio. O borato de amônio formado foi quantificado por titulação com ácido clorídrico padronizado com carbonato de sódio. Utilizou-se o fator de conversão de 6.38, sugerido para proteínas lácteas. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.1.2.3 Lipídeos

O teor de lipídeos foi quantificado através do método butirométrico de Gerber. Baseia-se na separação e quantificação da gordura por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico. O ácido digere as proteínas que se encontram ligadas à gordura, diminuindo a viscosidade do meio, aumentando a densidade da fase aquosa e fundindo a gordura, devido a liberação do calor proveniente da reação, o que favorece a separação da gordura pelo extrator (álcool isoamílico) o qual modifica a tensão superficial do meio. A leitura é feita na escala do butirômetro, após centrifugação e imersão em banho-maria.

3.1.2.4 Cinzas

O método empregado foi o da incineração em mufla, no qual toda a matéria orgânica foi queimada. Cada amostra foi colocada em um cadinho de porcelana, com massa previamente estabelecida e permaneceu na mufla ($550^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) até total queima da matéria orgânica. A diferença entre a massa da amostra mais cadinho e a massa do cadinho forneceu a massa das cinzas da amostra. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.1.2.5 Cloretos

A quantificação de cloretos é feita por meio de uma titulação, onde se empregam dois padrões: o nitrato de prata, que, adicionado em excesso, reage com os cloretos do queijo, e o tiocianato de potássio, pelo qual se titula o nitrato de prata restante, em presença de sulfato férrico amoniacal. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.1.2.6 pH

A determinação do pH foi realizada em um potenciômetro, previamente calibrado, realizando a inserção do eletrodo diretamente na solução do queijo analisado. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.1.2.7 Acidez titulável

A determinação da acidez consiste na titulação de determinada massa de queijo por uma solução alcalina de concentração conhecida (Hidróxido de sódio 0,1mol/L), utilizando como indicador a fenolftaleína. O resultado é dado em porcentagem de compostos com caráter ácido expressa como ácido láctico. Todas as determinações foram feitas em triplicatas.

3.2 Identificação das amostras

As amostras foram identificadas conforme a descrição no item 3 e são apresentadas da seguinte forma na tabela 2, a seguir:

Tabela 2 - Identificação das amostras

TABELA 2		
Amostra	Descrição	Fase
1	Queijo Parmesão (120 dias de Maturação)	I
2	Queijo Parmesão (90 dias de Maturação)	I
3	Queijo Parmesão (120 dias de Maturação)	II
4	Queijo Parmesão (120 dias de Maturação)	II
5	Queijo Parmesão (60 dias de Maturação)	II
6	Queijo Parmesão (30 dias de Maturação)	II
7	Queijo Prato	II
8	Queijo Prato Esférico	II
A1	Água utilizada para limpeza da linha de produção de creme de leite	II
A2	Água utilizada no sistema CIP	II
A3	Água utilizada para limpeza da linha de produção de queijo parmesão	II
A4	Água pós-sanificação da linha de queijo parmesão	II
L1	Leite pós-pasteurização	II
L2	Soro pós-prensagem	II
L3	Soro fermento	II

Fonte: Do autor (2018).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos resultados obtidos para ambas fases e para todas as amostras são apresentados na tabela 3, a seguir:

Tabela 3 - Resultados das análises microbiológicas

Análises	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	Clostrídios	B. Propiônicas	Estafilococos	Contagem total
Amostras	75 NMP.g ⁻¹	X	1,2x10 ⁷ UFC.g ⁻¹	4,8x10 ³ UFC.g ⁻¹	X	4,7x10 ³ UFC.g ⁻¹
1	≥ 1,1 x 10 ⁸ NMP.g ⁻¹	X	2,9x10 ⁴ UFC.g ⁻¹	1,3x10 ⁴ UFC.g ⁻¹	X	5,3x10 ⁴ UFC.g ⁻¹
2	X	X	X	X	X	-
3	240 NMP.g ⁻¹	X	X	4,14x10 ⁴ UFC.g ⁻¹	1,18x10 ⁴ UFC.g ⁻¹	-
4	23 NMP.g ⁻¹	X	X	X	X	-
5	X	X	X	X	X	-
6	X	X	X	X	X	-
7	X	X	X	X	X	-
8	X	X	X	X	X	-
A1	X	X	-	-	-	X
A2	X	X	-	-	-	X
A3	X	X	-	-	-	X
A4	2,3x10 ⁴ NMP.mL ⁻¹	2,3x10 ⁴ NMP.mL ⁻¹	-	-	-	1,27x10 ⁴ UFC.g ⁻¹
L1	240 NMP.mL ⁻¹	23 NMP.mL ⁻¹	-	-	-	-
L2	X	X	-	-	-	-
L3	X	X	-	-	-	-

Fonte: Do autor (2018).

4.1 Queijos – Fase I

4.1.1 Avaliação da qualidade microbiológica

4.1.1.1 Colimetria

Não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes nas amostras 1 e 2 de queijo. Entretanto, coliformes totais estavam presentes na concentração de 75 NMP.g⁻¹ na amostra 1 e ≥ 1,1 x 10⁸ NMP.g⁻¹ para amostra 2, 240 NMP.g⁻¹ na amostra 4 e 23 NMP.g⁻¹ na amostra 5.. Os isolados provenientes dos tubos de ambas as amostras foram identificados,

sendo todos identificados *Hafnia alvei*.

A contagem de coliformes totais para a amostra 2, foi extremamente alta, entretanto, a legislação vigente não estabelece valores para coliformes totais, somente para coliformes termotolerantes e, como descrito na RDC n.º12 (BRASIL, 2001), o limite máximo, para amostras indicativas, de coliformes termotolerantes em queijos parmesão é de 5×10^2 NMP.g⁻¹. No entanto, a contaminação com coliformes pode indicar 2 fatos: não utilização de boas práticas de higiene durante a fabricação e/ou a presença de leite cru (Não pasteurização e/ou contaminação do leite pasteurizado com leite cru através da presença de microfuros).

A presença de *Hafnia alvei* comprova falha gravíssima de higiene, pois a bactéria tem origem, principalmente, no trato digestório de mamíferos. A presença desse tipo de bactéria reforça a possibilidade de que essa contaminação venha durante a manipulação, uma vez que há grande probabilidade de a mesma vir por falha nas boas práticas de higiene por parte dos colaboradores. No entanto, não se pode descartar outras fontes, como essa fonte de contaminação ser devido à alta carga microbiana presente no leite cru, falhas no processo de pasteurização e/ou contaminação microbiana em tubulações, conexões e tanques.

4.1.1.2 Quantificação de clostrídios sulfito redutor

Não foi observado o crescimento de clostrídios sulfito redutor em nenhuma das amostras. Houve elevado crescimento após incubação, na amostra 1 ($1,2 \times 10^7$ UFC.g⁻¹) e na amostra 2 ($2,9 \times 10^6$ UFC.g⁻¹) onde todos os isolados foram identificados *Enterococcus faecalis* o qual é uma bactéria Gram-positiva e aeróbica facultativa. Esse resultado reforça os resultados obtidos na colimetria, sobre a qualidade inferior da amostra 2. O resultado esperado era o crescimento de bactérias do gênero Clostridio, já que, como descrito por Furtado (2017) a aparição de olhaduras como as encontradas nas amostras são, comumente ocasionadas por esse tipo de bactérias. As fontes de contaminação principais desse tipo de bactéria são o ambiente e o trato intestinal de animais, com isso pode-se inferir sua presença em alimento indica falha de higiene no processo. Esse resultado confirma a suspeita anterior, apresentada no item 4.1.1.1., de que a falha que ocorreu no processo de produção do queijo é, muito provavelmente, falhas no processo de pasteurização e a não observância da boas práticas de fabricação (BPF).

4.1.1.3 Quantificação de bactérias propiônicas

Foi observado crescimento de colônias nas placas, com contagem para amostra 1 de

$4,8 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e para amostra 2 de $1,27 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e amostra 4 de $4,14 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Entretanto, nenhum dos isolados identificados foram bactérias propiônicas, sendo elas: *Enterococcus faecalis*, *Hafnia alvei* e *Staphylococcus saprophyticus*. A RDC nº 12 (BRASIL, 2001) não estabelece padrão para contagem de bactérias propiônicas em queijos, uma vez que estas são responsáveis por características únicas de alguns queijos, no entanto, por serem produtoras de gás, sua presença pode ser a causadora do problema recorrente da presença de olhaduras. A alta contagem encontrada nas amostras não representa um problema de segurança alimentar, no entanto se configura defeito, uma vez que o queijo parmesão é um queijo de massa compacta e fechada. Porém, quando se fez a identificação desses microrganismos pôde-se ver que os resultados vêm de encontro aos resultados anteriores, sendo que não foram identificadas bactérias propiônicas. Os resultados seguem o mesmo padrão das análises anteriores. Todas as 3 bactérias identificadas podem ser originárias do trato digestivo humano e de animais e são anaeróbias facultativas. Excetuando-se a *Hafnia alvei* e *Enterococcus faecalis* que também podem ser encontradas no ambiente, como solo e água, a *Staphylococcus saprophyticus* é proveniente de contaminação por manipuladores, reforçando ainda mais a hipótese de essa ser a fonte de contaminação, no entanto como a bactéria *Hafnia alvei* e *Enterococcus faecalis* podem ter contaminado o leite durante o processo de ordenha, frente a isso a contaminação no queijo pode ser devido a falhas no processo de pasteurização e/ou alta contaminação microbiana no leite, fazendo com que a pasteurização, mesmo que feita corretamente, não fosse suficiente para destruir a carga microbiológica.

4.1.1.4 Quantificação de estafilococos coagulase positiva

A amostra 4 foi a única que apresentou crescimento com contagem de $1,18 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. A RDC n.º12 (BRASIL, 2001) estabelece limites para os *Staphylococcus* que são produtores da enzima coagulase, o qual o *Staphylococcus aureus* é o principal exemplar. De acordo com a RDC n.º12 (BRASIL, 2001), o limite máximo de microrganismos do grupo *Staphylococcus* coagulase positivo, para amostras indicativas de queijos de baixa ou média umidade é de 10^3 UFC.g⁻¹, sendo assim, o resultado obtido está exponencialmente superior ao permitido. No entanto, não houve crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo que todos os isolados foram identificados como *Hafnia alvei* o que comprova falha gravíssima de higiene, pois a bactéria tem origem, principalmente, no trato digestório de humanos e de animais. A presença desse tipo de bactéria reforça a possibilidade de que essa

contaminação venha durante a manipulação, uma vez que há grande probabilidade de falha nas boas práticas de higiene por parte de colaboradores. Porém, não se pode descartar outras fontes, como essa fonte de contaminação ser devido à alta carga microbiana presente no leite cru, falhas no processo de pasteurização e/ou contaminação em tubos, conexões e tanques.

4.1.1.5 Contagem total

Foram obtidas as contagens para a amostra 1 de $4,7 \times 10^5$ UFC.g⁻¹ e para a amostra 2 de $5,28 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, sendo identificadas novamente as bactérias *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus saprophyticus*.

Pode-se ver pelos resultados uma contagem total elevadíssima para ambas as amostras, especialmente para a amostra 2. Apesar de não haver na legislação brasileira limite estabelecido para microrganismos heterotróficos mesófilos em queijos parmesão, alguns autores relatam que alimentos com populações acima de 10^6 UFC.g⁻¹ não devem ser consumidos (AGUILAR, 2016), pois podem ser responsáveis por desencadear doenças de origem alimentar (JAY, 2005). As constatações anteriores permanecem, reforçando as possíveis falhas já mencionadas.

4.1.2 Avaliação da qualidade físico-química

Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4, a seguir:

Tabela 4 – Composição centesimal dos queijos

TABELA 4								
Amostra	Umidade (%)	Proteína total (%)	Proteína solúvel (%)	Gordura no ES (%)	Cinzas (%)	pH	Acidez titulável (%)	Cloretos (%)
1	33,1	28,1	11,7	45	4,5	4,9	0,72	1,6
2	37,9	26,7	9,1	43	3,3	5,2	0,63	1,5
3	31,5	33,3	12,2	40	4,2	4,92	0,98	1,7
4	31,2	33,2	12,3	40	4,1	5,12	0,71	1,6
5	35,7	28,8	9,3	38	3,2	5,32	0,63	1,5
6	40,7	26,8	8,4	36	3,1	5,72	0,48	1,4
7	44,8	27,6	10,1	44	3,5	5,36	0,44	1,6
8	44,4	27,7	9,7	43	3,5	5,35	0,43	1,6

Fonte: Do autor (2018).

A RDC nº 12 (BRASIL, 2001) classifica os queijos quanto ao teor de gordura no extrato seco e pelo teor de umidade, ambos em porcentagem. O queijo parmesão é conhecido por ser um queijo de massa dura, portanto sendo classificado, quanto à umidade, como queijo de baixa umidade (umidade de até 35,9%) e, quanto à gordura, como gordo (entre 25% e 44,9%). No entanto, as amostras avaliadas estavam no processo de maturação, assim sendo, não é possível comparar os resultados obtidos com a classificação contida na RDC nº 12. As principais alterações que ocorrem durante a etapa de maturação, se tratando da composição centesimal dos mesmos, é o decréscimo da umidade e, concomitantemente, o aumento do extrato seco, no caso de queijos maturados o extrato seco é composto, principalmente, por gordura e proteínas. Mesmo assim é possível um padrão de normalidade para os resultados da amostra 2 (90 dias de maturação) e a amostra 1 (120 dias de maturação), amostra 6 (30 dias de maturação), a amostra 5 (60 dias de maturação), amostras 3 e 4 (120 dias de maturação) pode-se notar que a umidade diminui, e no caso das amostras 2 e 3 já estão dentro da classificação da RDC nº 12 de 2001. O mesmo padrão se apresenta quando avaliamos os teores de gordura no extrato seco e de proteínas, onde há um aumento nos mesmos, a RDC nº 12 não estabelece valores para o teor de proteínas, no entanto, quanto à gordura, pode-se ver que, se a maturação seguir o padrão normal, o mesmo se adequaria à legislação. Já quanto ao caso dos queijos Prato e Prato esférico, todos os valores obtidos estão dentro dos valores estabelecidos pela RDC nº 12 e também em conformidade com os valores apresentados pela tabela nutricional apresentada nos produtos (BRASIL, 2001). Com isso dito, pode-se dizer que não houveram alterações notáveis na composição centesimal dos queijos avaliados, sendo possível dizer que a contaminação ocorrente não produz mudanças físico-químicas às amostras.

4.2 Qualidade da água

4.2.1 Avaliação da qualidade microbiológica

4.2.1.1 Colimetria

A amostra A4 foi a única a apresentar crescimento, tendo como contagem de coliformes totais e termotolerantes iguais a $2,3 \times 10^4$ NMP.g⁻¹. Não há a possibilidade de se comparar tal resultado com algum tipo de legislação vigente. No entanto, o resultado esperado para tal teste seria a ausência de microrganismos, uma vez que a sanitização já havia sido efetuada. A presença nesse teste pode indicar que o sanitizante não está sendo eficiente e/ou a

presença de biofilmes no tanque de fabricação do queijo. Todos os isolados foram identificados *Klebsiella pneumoniae*.

4.2.1.2 Contagem total

A única amostra que apresentou crescimento foi a amostra A4, com contagem igual a $1,27 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. Como já dito anteriormente, o resultado esperado para testes feitos sobre essa amostra seria ausência de microrganismos, uma vez que a sanitização já havia sido efetuada. Contudo, pode-se observar uma elevada contagem total para tal amostra. Esse resultado reforça a ideia de que o sanitizante não está sendo eficiente e/ou a presença de biofilmes no tanque de fabricação do queijo. Os isolados foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*, isso confirma todas suspeitas e hipóteses já citadas. As bactérias encontradas podem ser originárias do trato digestivo de humanos ou mesmo do ambiente, como solo ou água, ou seja, a presença desse tipo de bactéria reforça a possibilidade de que essa contaminação venha durante a manipulação, uma vez que há grande probabilidade de a mesma vir por falhas nas boas práticas de higiene por parte dos colaboradores. No entanto, não se pode descartar outras fontes, como essa fonte de contaminação ser devido à alta carga microbiana presente no leite cru, falhas no processo de pasteurização e/ou contaminação microbiana em tubos, conexões e tanques. Hipótese essa, vindo de encontro a todas as outras apresentadas anteriormente.

4.3 Qualidade do leite e do soro

4.3.1 Avaliação da qualidade microbiológica

4.3.1.1 Colimetria

As únicas amostras que apresentaram crescimento foram as amostras L1 e L3 sendo a contagem para L1: 240 NMP.mL⁻¹ para coliformes totais e 23NMP.mL⁻¹ coliformes termotolerantes, e para a amostra L3: >1100 NMP.mL⁻¹ para coliformes totais e termorolerantes. Os isolados foram identificados como *Klebsiella pneumoniae* e *Hafnia alvei*.

A contagem de coliformes totais e termotolerantes para a amostra L3 foi elevadíssima, configurando o soro fermento utilizado como uma potencial fonte de contaminação dos queijos. No entanto, pode-se ver contradição nesse resultado, já que o soro fermento apresenta

alta carga enquanto que o soro pós-prensagem não apresentou contagem significativa. Uma hipótese para explicar tal fato é a possibilidade de toda contaminação, durante o processo de coagulação e prensagem da massa, ficar na massa, fazendo com que o soro fique livre dessa contaminação. Isto confirma todas as suspeitas e hipóteses anteriormente citadas. As bactérias encontradas podem ser originárias do trato digestivo de humanos ou mesmo do ambiente, como solo ou água, ou seja, há falhas no processo de pasteurização e/ou falhas de higiene na manipulação e/ou a presença de biofilmes nos tanques ou tubulações.

Através de todos os resultados já apresentados pode-se afirmar que há grave problema na linha de produção de queijo, havendo uma ou mais falhas de higiene durante todo o processo. É necessário enfatizar que não foi permitida a análise mais criteriosa do pasteurizador, nem mesmo análises de padrão enzimático para a confirmação do tratamento térmico. Contudo, não é possível se cravar uma única e específica fonte de contaminação, já que, como pôde ser visto, tanto o leite após ser pasteurizado quanto o soro fermento apresentaram uma grande carga de microrganismos, e microrganismos estes possivelmente de contaminação fecal, aliado a este fato, também não é possível desconsiderar a contaminação devido a manipulação por colaboradores, pois como pode-se ver amostras de queijo fabricadas no mesmo dia, de lotes diferentes apresentaram diferença significativa quanto à carga microbiológica.

4.4 Prescrição das ações corretivas e preventivas

Através de todas as informações e resultados obtidos nesse estudo enfatiza-se que:

- A queijaria em questão apresenta fortes falhas de higiene no processo produtivo de queijo parmesão com amostras de queijo apresentando altas contagens microbiológicas e os microrganismos contaminantes podendo ser de origem fecal.
- As contaminações ocorrentes podem ter como fonte: Má qualidade do leite cru, falhas no processo de pasteurização, presença de biofilmes em equipamentos e tubulações, por colaboradores durante a manipulação e/ou na salga dos queijos.
- É necessário um maior controle de qualidade nesse processo produtivo, desde a recepção do leite, tendo maior rigor quanto à qualidade do leite que está sendo direcionado para a produção dos queijos.
- É indicado o desmonte, a análise de todos equipamentos e tubulações aos quais o leite tem contato, com o intuito de buscar e eliminar possíveis biofilmes presentes.

- É indicada a troca do soro fermento utilizado na produção do queijo parmesão, já que o mesmo apresenta baixa qualidade microbiológica.
- É necessária a aferição e calibração do pasteurizador, controle mais rígido sobre as análises para a confirmação da pasteurização, além do controle sobre possíveis microfuros presentes nas placas do pasteurizador.
- É necessária a conferência se as boas práticas de fabricação e as boas práticas de higiene estão sendo corretamente executadas, bem como outras ferramentas de qualidade como análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) e procedimentos padrões de higiene operacional (PPHO), e se necessário executar correções e adequações à estas.

5 CONCLUSÕES

Através do exposto, podemos concluir que a fábrica queijeira em questão apresenta graves falhas de higiene em seu processo produtivo, acarretando perdas e prejuízo ao laticínio, e também apresentando possíveis riscos de saúde aos consumidores. Com base nos microrganismos identificados, podemos afirmar baixíssima qualidade microbiológica dos queijos analisados, tornando-os impróprios para consumo, sendo que todos os microrganismos são de origem fecal, são eles: *Hafnia alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Klebsiella pneumoniae*. As possíveis causas da contaminação são: má qualidade do leite cru, falhas no processo de pasteurização, presença de biofilmes em equipamentos e tubulações, por colaboradores durante a manipulação e/ou na salga dos queijos. São indicadas diversas ações para tal problema, como: maior controle de qualidade em toda a cadeia do leite dentro do laticínio, detecção e remoção de possíveis biofilmes presentes em equipamentos e tubulações, conferência do bom funcionamento do pasteurizador e também a adequação e confirmação das Boas Práticas de Fabricação e Higiene bem como outras ferramentas da qualidade como, por exemplo, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle e Procedimentos Padrões de Higiene Operacional.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar alguns pontos que aconteceram durante o trabalho e que dificultaram a execução do mesmo. Fomos procurados pelos laticínios em questão para a solução do problema de contaminação. No entanto, quando foi percebido que para a resolução do problema seria necessário explorar toda indústria e, dessa forma, podendo expor inadequações, começaram a surgir impedimentos, impostos pelo próprio solicitante, para a realização do trabalho. Foram encontradas dificuldades, como: proibição de registros de imagens, realização de análises na fábrica, exploração de equipamentos, livre acesso a toda fábrica, restrição nas coletas de amostras, dificuldades para agendamento de visita. Após todas essas dificuldades, ainda houve troca na gerência de produção da empresa, inviabilizando novas visitas ou mesmo envio de mais amostras. Todos esses acontecimentos impossibilitaram de se fazer um trabalho mais preciso, cravando-se com certeza qual era a fonte de contaminação.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, C. E. G. et al. "Microbial quality of industrial and retail market grated parmesan cheese in the State of São Paulo, Brazil," **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 46, n. 12, p. 2257–2263, 2016.
- ANDREW, S. M. et al. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 134, n. 1/2, p. 150-156, 2009.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Notícias, Mercado nacional de lácteos 2016**. Disponível em: <http://www.abiq.com.br/noticias_interna.asp?codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=6>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official method 2001.05: Petrifilm™ rapid S. aureus count plate method for the rapid enumeration of Staphylococcus aureus in selected foods**. Gaithersburg, 2005.
- ÁVILA, M. et al. Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related Clostridium species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 172, p. 70-75, 2014.
- BERESFORD, T. P. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, n. 4/7, p. 259-274, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 7 mar. 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº 12 de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.
- BRASIL. Ministério da saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Surtos de DTA's - Perfil epidemiológico**. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/apresenta---o-surtos-DTA-2016.pdf>>. Acesso em: 8 jan. 2018.
- CHUNG, H. H. et al. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 1, p. 297-301, 2009.
- CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. **Boletim VBP 2017**. Disponível em: <<http://cnabrazil.org.br/boletim/2017/10/30/vbp-29a-edicao/>>. Acesso em: 12 dez. 2017.
- COSTA, E. O. Resíduos de antibióticos no leite: um risco à saúde do consumidor. **Higiene alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 44, p. 15-17, 1996.

COSTA, E. O. Uso de antimicrobianos na mastite. In: SPINOSA, H. S. (Org.). **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

DONNELLY, L. S.; BUSTA, F. F. Anaerobic sporeforming microorganisms in dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, p. 161-166, 1981.

EDUARDO, M. B. P. et al. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por água e alimentos**. São Paulo: Centro de vigilância epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, 2008. Disponível em: <http://200.144.0.30/doc_tec/hidrica/doc/VEDTA08_manual.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Panorama do Leite**. 2013. Disponível em: <www.cileite.com.br/sites/default/files/2013_02_PanoramaLeite.pdf>. Acesso em: 5 fev. 2016.

FEDERATION INTERNACIONALE DU LAITE; FIL INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **196: Milk**: quantitative determination of bacteriological quality: guidance for establishing and verifying a conversion relationship between routine method results and anchor method results. Brussels, 2004.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FROHLICH-WYDER, M. T.; BACHMAN, H. P. Cheeses with propionic acid fermentation. In: FOX, P. F. et al. **Cheese chemistry physics and microbiology**. London: Elsevier, 2004. p. 141-156.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**. São Paulo: Setembro Editora, 2017.

GEUS, J. A. M.; LIMA, I. A. Análise de coliformes totais e fecais: um comparativo entre técnicas oficiais VRBA e Petrifilm EC aplicados em uma indústria de carnes. In: ENCONTRO DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA DOS CAMPOS GERAIS, 2., 2008, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: [s. n.], 2008. 1 CD-ROM.

HSIEH, S. H.; HUANG, H. Y.; LEE, S. Determination of eight penicillin antibiotics in pharmaceuticals, milk and porcine tissues by nano-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 43, p. 7186-7194, 2009.

JAY, J. M. Indicadores microbiológicos de qualidade e segurança dos alimentos. In: _____. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. Disponível em: <[lamento InspecaoIndustrial.pdf](#)>. Acesso em: 21 jan. 2016.

JUNTA COMERCIAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Balança comercial do estado, 2016**. Disponível em: <<https://www.jucemg.mg.gov.br/ibr/noticias+informa070616-1613>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

LE BOURHIS, A. G. et al. Contribution of *C. beijerickii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, p. 154-163, 2007.

- MENDES, C. G.; SILVA, J. B. A.; ABRANTES, M. R. Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. **Acta veterinária Brasileira**, Mossoró, v. 3, n. 1, p. 5-12, 2009.
- MHONE, T. A.; MATORE, G.; SAIDI, P. T. Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia Coli*, and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected small holder dairy farms of Zimbabwe. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.151, p. 223-228, 2011.
- MIKŠ-KRAJNIK, M.; BABUCHOWSKI, A.; BIAŁOBRZEWSKI, I. Impact of physiological state of starter culture on ripening and flavour development of Swiss–Dutch-type cheese. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 66, p. 562-569, 2013.
- MILLER, N. B. **Perfil do consumo de leite e derivados no município de Colantina-ES**. 83 f. Monografia (Especialização Lato Sensu em Defesa e Vigilância Sanitária Animal) - Instituto Brasileiro de Pós-Graduação QUALITTAS, Vitória, 2008. Disponível em: <<http://www.qualittas.com.br/documentos/Perfil%20do%20Consumo%20de%20leite%20e%20Derivados%20Lacteos%20%20Nubia%20Broeto%20Miller.PDF>>. Acesso em: 11 dez. 2017.
- OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Malaga, v. 8, n. 2, p. 1695-7504, 2007. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020207.html>>. Acesso em: 21 jan. 2017.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA AGRICULTURA E ALIMENTAÇÃO /ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Produção de alimentos de origem animal: código de práticas de higiene para leite e produtos lácteos – CAC/RCP 57-2004**. 2nd. ed. Rome, 2009.
- SILVA, N. et al. Contagem de coliformes totais coliformes termotolerantes *Escherichia coli*. In: -----, **Manual de métodos de análise Microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. Cap. 9.
- SILVA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 31 p.
- TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 3. ed. Santa Maria: Ed. UFSM, 2008.
- ZOCCAL, R. **Queijos: produção e importação**. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>>. Acesso em: 22 dez. 2016.