



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE
PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



CARLA TODESCATTO

**OBTENÇÃO DE FERMENTO LÁTICO ENDÓGENO PARA PRODUÇÃO DE
QUEIJO TÍPICO DA MESORREGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ**

DISSERTAÇÃO

Pato Branco, 2014

CARLA TODESCATTO

**OBTENÇÃO DE FERMENTO LÁTICO ENDÓGENO PARA PRODUÇÃO DE
QUEIJO TÍPICO DA MESORREGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Área do Conhecimento: Alimentos

Orientador: Dr. Edimir Andrade Pereira
Coorientadora: Me. Simone Beux

Pato Branco, 2014

T637o Todescatto, Carla.
Obtenção de fermento láctico endógeno para a produção de queijo típico da mesorregião sudoeste do Paraná / Carla Todescatto. -- 2014.
174 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira
Coorientador: Profa. Dra. Simone Beux
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2014.
Bibliografia: f. 135 – 155.

1. Bactérias lácticas. 2. Fermento láctico autóctone. 3. Queijo regional. I. Pereira, Edimir Andrade, orient. II. Beux, Simone, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. IV. Título.

CDD (22. ed.) 660.281

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco

FOLHA DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação

Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da mesorregião Sudoeste do Paraná

Autora

Carla Todescatto

Esta dissertação foi apresentada às 9 horas e trinta minutos do dia 31 de julho de 2014, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Área do Conhecimento: Alimentos, no Programa de Pós-Graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A autora foi arguida pela banca examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Prof.^a Dr.^a Andrea Leal Badaró

Prof.^a Dr.^a Marina Leite Mitterer Daltoé

Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira

DEDICATÓRIA

À DEUS, por ter me guiado em meus estudos,
a minha mãe Lourdes, pai Miguel, irmã Claudia, meu amor Neymar, todos os amigos,
Aos professores inspiradores,
À todos que estiveram presentes durante esta etapa.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, por me mostrar que sou protegida, guiada e iluminada e por ter colocado na minha vida pessoas sem as quais eu não teria chegado até aqui, são elas:

A minha mãe Lourdes, pai Miguel, pessoas humildes, trabalhadoras, meus exemplos de vida, pessoas que fizeram ser quem sou hoje e me fizeram saber o que é importante na vida.

A minha irmã Claudia, pela companhia, ajuda, apoio e amizade;

A meu namorado Neimar, por confiar no meu potencial e me convencer da minha capacidade, por me dar forças nos momentos difíceis, pelo apoio nos momentos de preocupação, pelos momentos de descontração e por me fazer muito feliz!

As minhas amigas em especial, Tânia, Roberta, Paula, Maira que sempre me deram força e palavras de carinho.

Ao Marcos Bertani Gazola pelas instruções nas análises estatísticas.

À UTFPR dos Câmpus de Pato Branco e Medianeira, professores e técnicos pelo suporte dado às análises.

A meu orientador Prof. Dr. Edimir Andrade Pereira, por ter aceitado o desafio da orientação, por ter confiado no meu trabalho, pelas ideias e apoio;

A minha coorientadora Prof.^a Me. Simone Beux, exemplo de dedicação e inteligência, por todos os ensinamentos e por servir de espelho pra minha carreira;

Aos membros da banca da defesa, pelas contribuições valiosas que deram a este trabalho;

Ao Laboratório LAQUA, em especial Roberta Roncatti, pela ajuda incondicional, apoio técnico nas análises e demais funcionários do laboratório.

Ao Laboratório São Rafael, funcionários, pela ajuda na execução das análises microbiológicas.

Aos italianos, Angiolela Lombardi e Battista Atorni pela contribuição fundamental nos ensinamentos e riqueza técnica.

À Agência de Desenvolvimento Regional de Francisco Beltrão, UTFPR de Francisco Beltrão.

À Associação Bellunesi Nel Mondo da Província de Belluno, Região do Vêneto - Itália.

Ao Instituto BIOAGRO (Instituto de Qualidade e Tecnologia Agroalimentar) na cidade de Thiene-Itália.

A Todos os laticínios, cooperativas, queijarias, produtores de leite, pela ajuda, participação e apoio a este projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa.

Enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste estudo.

Muito Obrigada!

*A perfeita união entre queijos e vinhos é uma prova
de que até o paladar tem horror à solidão.*
(Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

TODESCATTO, Carla. **Obtenção de fermento láctico endógeno para produção de queijo típico da Mesorregião Sudoeste do Paraná.** 2014. 173f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Controle de Processos Químicos e Bioquímicos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2014.

A Mesorregião do Sudoeste Paranaense se destaca pela atividade leiteira, com produção, industrialização e comercialização de derivados. O uso de bactérias lácticas endógenas vem ganhando o mercado mundial com pesquisas e elaboração de produtos, e despertando o interesse de Instituições de Ensino do Brasil. Este trabalho teve como objetivo isolar, caracterizar e identificar a microbiota láctica do leite cru, para desenvolver um fermento endógeno e, a partir deste, elaborar o Queijo Típico. Foram desenvolvidos dois fermentos, compostos pelas bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. Os fermentos foram testados em dois laticínios da região, utilizando leite pasteurizado e os conservantes nitrato de sódio e a enzima lisozima. Os queijos elaborados foram submetidos a análises para o acompanhamento das modificações durante a maturação (30, 60 e 180 dias) e todas as amostras avaliadas exibiram características físico-químicas e microbiológicas de acordo com a legislação brasileira, podendo ser classificados, de um modo geral, como queijos de média umidade, variando de 40,71 a 42,44 g/100 g (30 dias), 35,37 a 40,28 g/100 g (60 dias) e 33,63 a 38,63 g/100 g (180 dias), de acordo com o teor de matéria gordurosa no extrato seco classificam-se em gordos, 40,37 a 48,80 (g/100 g) (30 dias), 44,42 a 48,25 (g/100 g) (60 dias) e 45,30 a 49,80 (g/100 g) (180 dias). As proteínas (g/100 g) variaram de 20,57 a 23,95 g/100 g (30 dias), 21,88 a 24,71 (60 dias), 23,52 a 30,57 (180 dias), os lipídeos entre 20,57 a 23,95 (30 dias), 24,71 a 21,88 (60 dias), e 30,57 a 23,52 (180 dias). Os teores de cinzas ficaram entre 2,99 a 4,88 (g/100 g) (30 dias), 4,10 a 5,00 (g/100 g) (60 dias) e 4,58 a 5,19 (g/100 g) (180 dias), atividade de água (A_w) entre 0,9531 a 0,9635 (30 dias), 0,9366 a 0,9547 (60 dias) e 0,9284 a 0,9380 (180 dias). As análises de textura apontaram que o queijo desenvolvido, no decorrer dos períodos de maturação, apresentou aumento da dureza, onde o menor valor aos 30 dias estava em 18377,19 g passando aos 180 dias para um valor máximo de 27401 g. A elasticidade, que aos 30 dias apresentava-se em 0,82, passou a 0,88 aos 180 dias. A mastigabilidade de 11412,92 (30 dias) passou para 5116,76 (180 dias). A coesividade de 0,67 (30 dias) ficou em 0,20 (180 dias). A adesividade que era de -205,45 (30 dias) passou para -25,04 (180 dias) e a resistibilidade que inicialmente era de 0,21 (30 dias) ficou com 0,04 (180 dias). Em relação à análise de cor, as amostras apresentaram alta luminosidade (L^*) chegando a ter aos 180 dias ($73,51 \pm 3,62$ a $79,75 \pm 0,56$), com predominância da componente amarela (b^*) ($34,10 \pm 0,55$ a $36,81 \pm 0,29$), e amostras dentro do espectro verde (a^*) ($-7,40 \pm 0,06$ a $-7,82 \pm 0,21$), com pequenas variações entre si. As análises sensoriais do queijo apontaram para aceitação diante dos provadores. Este trabalho representa uma das etapas acerca da utilização do fermento endógeno na fabricação de um Queijo Típico Regional, que recebeu a denominação de “Santo Giorno” e contribuiu para a compreensão das variações e interações dos componentes físico-químicos e microbiológicos no desenvolvimento de um produto de elevada qualidade.

Palavras-chave: Bactérias Lácticas. Fermento Láctico Autóctone. Queijo Regional.

ABSTRACT

TODESCATTO, Carla. 2014. **Getting endogenous lactic starter culture to produce typical cheese in the Southwestern Mesoregion of Paraná.** 173p. Dissertation (Postgraduate Program on Technology of Chemical and Biochemical Processes). Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2014.

The Greater Region Southwest of Paraná stands out for dairy farming, with production, processing and trading of derivatives. The use of endogenous lactic acid bacteria is gaining global market research and product development is attracting the interest of Educational Institutions in Brazil. This work aimed to isolate, identify and characterize the lactic microflora of raw milk, to develop endogenous starter culture, and using it, prepare the Cheese Typical. Two starters cultures, *Streptococcus thermophilus* compounds by bacteria and *Lactobacillus delbrueckii* sp *bulgaricus* were developed. The starter culture were tested in two dairy region, using pasteurized milk, preservatives sodium nitrate and lysozyme enzyme. The elaborate cheeses were subjected to analysis for the monitoring of changes during maturation (30, 60 and 180 days) and all samples exhibited physicochemical and microbiological characteristics according to Brazilian legislation. They can be classified broadly as cheese medium humidity ranging from 40.71 to 42.44 g/100 g (30 days), from 35.37 to 40.28 g/100 g (60 days), and from 33.63 to 38.63 g/100 g (180 days), according to the content of fatty matter in dry matter, cheeses can be classified as fat, from 40.37 to 48.80 (30 days), from 44.42 to 48.25 (60 days) and 45.30 to 49.80 (180 days). Proteins ranged from 20.57 to 23.95 g/100 g (30 days), from 21.88 to 24.71 g/100 g (60 days), from 23.52 to 30.57 g/100 g (180 days), lipids between 20.57 to 23.95 g/100 g (30 days), from 24.71 to 21.88 g/100 g (60 days), and from 30.57 to 23.52 g/100 g (180 days). The ash content ranged from 2.99 to 4.88 (30 days), from 4.10 to 5.00 (60 days) and from 4.58 to 5.19 (180 days) the water activity from 0.9531 to 0.9635 (30 days), 0.9366 to 0.9547 (60 days) and 0.9284 to 0.9380 (180 days). Textural analyzes indicated that the cheese developed during periods of maturation, showed an increase in hardness, where the lowest value at 30 days was at 18377.19 g passing the 180 days to a maximum value of 27401 g. The elasticity at 30 days showed that in 0.82, went 0.88 at 180 days. The chewiness of 11412.92 (30 days) increased to 5116.76 (180 days). The cohesiveness of 0.67 (30 days) stood at 0.20 (180 days). The adhesiveness which was -205.45 (30 days) increased to -25.04 (180 days) and the resistivity which was initially 0.21 (30 days) was 0.04 (180 days). Regarding the analysis of the samples showed high color brightness (L^*), coming to have 180 days (73.51 ± 3.62 to 79.75 ± 0.56), with a predominance of yellow component (b^*) (34.10 ± 0.55 to 36.81 ± 0.29), and samples within the green spectrum (a^*) (-7.40 ± 0.06 and -7.82 ± 0.21), showed minor variations. The sensory analysis of Cheese Typical pointed to acceptance by the panelists. This work represents one of the steps of using endogenous starter culture in a cheese, which was called as "Santo Giorno", and contributed to understanding the variations and interactions of physico-chemical and microbiological development of a regional product, with high quality components.

Key words: Lactic Bacteria. Autochthonous Starter Culture. Regional Cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mesorregião Sudoeste Paranaense.....	27
Figura 2 - Coordenadas de cor do Sistema CIELAB.....	50
Figura 3 - Fluxograma para o isolamento das bactérias <i>Streptococcus</i> sp. e <i>Lactobacillus</i> sp e obtenção do fermento endógeno.....	55
Figura 4- Dendograma derivado da elaboração de perfis de RAPD- PCR de cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isoladas do Vênnetto.....	74
Figura 5- Dendograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR das cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isoladas pelo Farbom.....	75
Figura 6 - Dendograma derivado da elaboração de perfis de RAPD- PCR de cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isolados da empresa/laticínio Primo Queijo.....	75
Figura 7 - Dendograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR de cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isoladas da empresa/laticínio Tirol.....	76
Figura 8 - Dendograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR das cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isolados do leite dos produtores Rudinei e Enio Klein.....	77
Figura 9 - Dendograma derivado da elaboração dos perfis RAPD-PCR das cepas de <i>Streptococcus</i> sp. isolados pelo Milkipar.....	77
Figura 10 - Dendograma em relação ao total de <i>Streptococcus</i> sp. O grupo indicado com a letra A é composto por estirpes de <i>S. thermophilus</i>	78
Figura 11 - Curva de acidificação das estirpes de <i>Streptococcus thermophilus</i> em leite desnatado reconstituído (LDR) observada através do declínio do pH durante 16 horas de incubação.....	80
Figura 12 - Curva de acidificação das estirpes de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> em leite desnatado reconstituído (LDR) observada através do declínio do pH durante 16 horas de incubação.....	82
Figura 13 - Fluxograma de produção dos queijos elaborados com Fermento Lático Endógeno A ou B com ou sem conservante.....	85
Figura 14 - Curva dos valores médios de pH durante a acidificação do Fermento A referentes a 6 testes realizados nos laticínios 01 e 02.....	90
Figura 15 - Curva dos valores médios de pH durante a acidificação do Fermento B referentes a 6 testes realizados nos laticínios 01 e 02.....	90
Figura 16- Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 30 dias.....	96
Figura 17- Círculo de Correlação dos queijos com 30 dias.....	97
Figura 18 - Dendograma de dissimilaridade para os queijos de 30 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.....	98
Figura 19 – Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 60 dias.....	99
Figura 20 – Círculo de Correlação dos queijos com 60 dias.....	99
Figura 21 - Dendograma de dissimilaridade para os queijos de 60 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.....	100
Figura 22 - Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 180 dias.....	101
Figura 23 – Círculo de Correlação dos queijos com 180 dias.....	101
Figura 24 - Dendograma de dissimilaridade para os queijos de 180 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.....	102
Figura 25 - TPA - Curva característica das replicatas da amostra de queijo PA1 (60 Dias). 105	
Figura 26 - Coordenada Luminosidade (L*) dos queijos nos três períodos de maturação. ... 113	
Figura 27 - Coordenada das cores vermelha (+) a verde (-) (a*) dos queijos nos três períodos de maturação.....	115

Figura 28 - Coordenada das cores azul (-) a amarelo (+) (b*) dos queijos nos três períodos de maturação.	116
Figura 29- Frequência de consumo de queijos dos provadores nas análises sensoriais.	118
Figura 30- Faixa etária dos provadores na análise sensorial dos queijos com 60 dias de maturação.	119
Figura 31- Faixa etária dos provadores na análise sensorial dos queijos com 180 dias de maturação.	120
Figura 32 - Características do cheiro nos queijos com 60 dias de maturação.	125
Figura 33 - Características da textura nos queijos com 60 dias de maturação.	126
Figura 34 - Características do sabor nos queijos com 60 dias de maturação.	126
Figura 35 - Características do cheiro nos queijos de 180 dias de maturação.	127
Figura 36 - Características da textura nos queijos com 180 dias de maturação.	128
Figura 37 - Características do sabor nos queijos com 180 dias de maturação.	128

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1 - Corte da coalhada.	86
Imagem 2 - Dessoramento da coalhada.	86
Imagem 3 - Enformagem dos queijos.	87
Imagem 4 - Prensagem dos queijos.	87
Imagem 5 - Queijos na salmoura.	88
Imagem 6 - Queijos na câmara fria.	88
Imagem 7 - Queijos revestidos com Polímero.	89

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Definição das Propriedades Texturais na análise de TPA.	51
Quadro 2 - Produtores e Laticínios de onde foram coletadas amostras de leites para análises.	53
Quadro 3 - Queijos elaborados nos Laticínios identificados de acordo com suas formulações.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos queijos de acordo com a porcentagem de gordura no extrato seco e umidade.	42
Tabela 2 - Composição do “mix” para RAPD-PCR.	59
Tabela 3 - Composição do “mix” para PCR- ESPÉCIE-ESPECÍFICA.	61
Tabela 4- Reagentes utilizados para a reação de sequenciamento genético.	63
Tabela 5– Resultado da acidez do <i>Lattoinesto</i> e contagem de <i>Streptococcus</i> sp. e <i>Lactobacillus</i> sp. das amostras com resultado satisfatório.....	73
Tabela 6 - Cepas de Estreptococos com os resultados dos ensaios de PCR Espécie Específica.	77
Tabela 7 - Cepas de <i>Streptococcus</i> sp. resultado da análise de Sequenciamento Genético.....	78
Tabela 8- Cepas de Lactobacilos sp. obtidas pelo Sequenciamento Genético.	79
Tabela 9 - Tempo de coagulação das cepas de <i>S. thermophilus</i> em leite desnatado reconstituído.	81
Tabela 10- Tempo de coagulação das cepas de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> em leite desnatado reconstituído.	82
Tabela 11- Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado do laticínio 01.	83
Tabela 12 - Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado do laticínio 02.	83
Tabela 13- Resultados das análises físico-químicas dos queijos desenvolvidos com fermento endógeno nos períodos de 30, 60 e 180 dias de maturação.....	93
Tabela 14 - Resultados do perfil de textura dos queijos com 30, 60 e 180 dias de maturação.	106
Tabela 15 - Resultados da análise de cor dos queijos com 30, 60 e 180 dias de maturação..	111
Tabela 16- Valores de ΔE das amostras de queijo de 30 dias.	112
Tabela 17- Valores de ΔE das amostras de queijo de 60 dias.	112
Tabela 18- Valores de ΔE das amostras de queijo de 180 dias.	113
Tabela 19- Médias e desvio-padrão dos atributos avaliados no teste de aceitação sensorial dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.....	121
Tabela 20- Índice de Aceitabilidade (IA %) dos atributos avaliados nos queijos com 60 e 180 dias de maturação.....	122
Tabela 21- Intenção de compra dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.....	123
Tabela 22- Influência sociodemográfica na aceitação do queijo Santo Giorno.	129
Tabela 23 - Influência das atitudes dos provadores no índice de aceitação do queijo Santo Giorno.	130
Tabela 24 – Fatores relacionados à aceitação do queijo Santo Giorno.....	130
Tabela 25- Resultados das variáveis significativas na discriminação dos queijos Santo Giorno.	131
Tabela 26- Funções obtidas pela análise canônica.	132

LISTA DE SIGLAS, DE ABREVIATURAS E DE ACRÔNIMOS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
ACP - Análise de Componentes Principais
ANOVA - Análise de Variância
ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
Aw - Atividade de Água
BALs - Bactérias Ácido Láticas
BIOAGRO - Instituto de Qualidade e Tecnologia Agroalimentar
BNDES - Banco Nacional de Desenvolvimento
BPLS - Agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose
CBT - Contagem Bacteriana Total
CCS - Contagem de Células Somáticas
DAFNAE - *Department Aliments Foods Natural Environment dell' Università degli Studi di Padova*
dnTPs - Trifosfatos de desoxinucleotídeos
DOP - Denominação de Origem Protegida
EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESD - Extrato Seco Desengordurado
EST - Extrato Seco Total
FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná
FETAEP - Federação dos Sindicatos dos trabalhadores Rurais do Estado do Paraná
FIL - Federação Internacional do Leite
GES - Gordura no Extrato Seco
HCA - Análise de Grupamentos Hierárquicos
IA - Índice de Aceitabilidade
IAL - Instituto Adolfo Lutz
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INPI - Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IPARDES - Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social
IPCA - Índice Nacional de Preços ao Consumidor
LAQUA - Laboratório de Qualidade Agroindustrial de Alimentos e Água
LDR - Leite Desnatado Reconstituído
M17 - Caldo ou Agar usado para cultivo de *Streptococcus* lácticos
MAPA - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MRS - *Man Rogosa e Sharpe*
NMP - Número Mais Provável
PCA - *Plate Count Agar*
PCR - Reação em Cadeia de Polimerase
PCs - Componentes Principais
PVA - Acetato de Polivinila
RAIS - Relação Anual de Informações Sociais
RAPD-PCR - Amplificação Aleatória Polimórfica de DNA
RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SEAB - Secretaria de Agricultura e do Abastecimento
SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
TBE - Brometo de Etídio em Tampão
TPA - Análise de Perfil de Textura

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UHT - *Ultra High Temperature*

UNICAFES - Federação das Cooperativas da Integração Solidária da Agricultura Familiar do Estado do Paraná

UR - Umidade Relativa

UVM - Caldo de Enriquecimento para *Listeria*

VRBA - Agar Cristal Violeta Vermelho Neutro Bile

XLD - Xilose Lisina Desoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS

< - Menor que
°C - Graus Celsius
°D - Graus Dornic
°H - Graus Horvert
µg - Microgramas
µL - Microlitro
µM - Micromol
A - Volume gasto
adm - Adimensional
B - Volume gasto na titulação do branco
cm - Centímetro
CO₂ - Dióxido de Carbono
D - Densidade
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
f - Fator de correção
g - Gramas
g/s - Grama por segundo
H₂O - Água
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
kb - Kilobytes
kcal - Kilocaloria
kg - Kilograma
L - Lipídios
L - Litro
Log - Logarítmo
M - Molar
m - Perda de massa em gramas
m/m - Relação massa por massa
m' - Massa da amostra em gramas
m1 - Massa do Cadinho vazio
m2 - Massa do Cadinho com amostra
mg - Miligrama
MgSO₄ - Sulfato de Magnésio
mL - Mililitro
mM - Milimol
mm/s - Milímetros por segundo
mo - Massa da amostra
N - Newton
NaCl - Cloreto de Sódio
NaNO₃ - Nitrato de Sódio
NaSO₄ - Sulfato de Sódio
o/n - Over night
P - Peso da amostra
pH¹⁶ - pH ao final de 16 horas
rpm - Rotações por minuto
TM - Tempo em Minutos
tpH - Tempo de Fermentação
U - unidade
V - Voltz

VL - Valor lido na escala do butirômetro

Vm - Velocidade Máxima

Vmáx - Velocidade Máxima de Acidificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 REFERENCIAL TEÓRICO	27
3.1 ATIVIDADE AGROPECUÁRIA NA MESORREGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ ...	27
3.2 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL	28
3.3 LEITE	29
3.4 MICROBIOTA DO LEITE	30
3.4.1 Gêneros: <i>Streptococcus</i> e <i>Lactobacillus</i>	31
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE BALS.....	33
3.5.1 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase).....	33
3.5.2 Eletroforese	34
3.6 CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DAS BALS	35
3.7 CULTURA <i>STARTER</i> NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS.....	37
3.8 QUEIJO	39
3.8.1 Microbiota do queijo	43
3.8.2 Queijos Típicos/Artesanais	43
3.9 DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO TÍPICO DO SUDOESTE DO PARANÁ	45
3.10 PROBLEMAS RELACIONADOS COM A FABRICAÇÃO DE QUEIJOS.....	46
3.11 MATURAÇÃO DOS QUEIJOS.....	47
3.12 CONSERVANTES DO QUEIJO	48
3.13 ANÁLISE DE COR EM QUEIJOS	49
3.14 ANÁLISE DE TEXTURA EM QUEIJOS	51
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 MATERIAL	53
4.1.1 Leite	53
4.1.2 Meios de cultura	53
4.1.3 Fermento Lático.....	53
4.1.4 Coadjuvantes da produção do queijo	54
4.2 MÉTODOS.....	54
4.2.1 Coleta do leite	54

4.2.2 Isolamento e identificação das bactérias	55
4.2.3 Preparação do <i>Lattoinesto</i>	55
4.2.4 Inoculação e contagem	56
4.2.5 Purificação das colônias.....	56
4.2.6 Teste da catalase	56
4.2.7 Teste de coloração Gram	57
4.2.8 Conservação das cepas e preparação para o transporte	57
4.2.9 Análise de PCR /RAPD-PCR e sequenciamento genético.....	57
4.2.10 Revitalização das cepas.....	58
4.2.11 Preparação das cepas estoque para as técnicas moleculares	58
4.2.12 Extração do DNA.....	59
4.2.13 Técnica de RAPD-PCR (AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DO DNA)	59
4.2.14 Análise de eletroforese e geração do perfil eletroforético	60
4.2.15 Identificação dos isolados	61
4.2.16 PCR Espécie-Específica.....	61
4.2.16 Sequenciamento genético (DNA).....	62
4.2.17 Amplificação do fragmento de DNA via PCR	62
4.2.18 Purificação do produto de PCR.....	62
4.2.19 Preparação da reação de sequenciamento com um único <i>primer</i>	62
4.2.20 Purificação do produto do sequenciamento	63
4.2.21 Preparação das cepas para sequenciamento	64
4.2.22 Capacidade acidificante das cepas identificadas.....	64
4.3 PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS NOS LATICÍNIOS.....	64
4.3.2 Desenvolvimento de protocolo de fabricação do queijo Santo Giorno.	65
4.4 ANÁLISES DOS QUEIJOS ELABORADOS	65
4.4.1 Análises microbiológicas	65
4.4.2 Análises físico-químicas	67
4.4.3 Inspeção visual	70
4.4.4 Análise sensorial.....	70
4.4.5 Análise de cor.....	71
4.4.6 Análise de textura	72
4.4.7 Análise estatística	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
5.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS DE LEITE	73

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS.....	73
5.2.1 Identificação de <i>Streptococcus thermophilus</i>	74
5.2.2 Identificação de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i>	79
5.3 ATIVIDADE ACIDIFICANTE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS.....	80
5.4 ANÁLISES DOS LEITES PASTEURIZADOS NOS LATICÍNIOS.....	83
5.5 PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO.....	84
5.5.1 Processo Produtivo.....	84
5.6 CARACTERÍSTICAS DOS FERMENTOS ENDÓGENOS NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO “SANTO GIORNO”.....	89
5.7 CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TÍPICO “SANTO GIORNO”.....	91
5.7.1 Parâmetros Sensoriais Visíveis.....	91
5.7.2 Análises físico-químicas.....	92
5.7.3 Análise de Componentes Principais (ACP).....	96
5.7.4 Análises microbiológicas.....	102
5.7.6 Análise de cor.....	111
5.7.7 Análise sensorial.....	117
5.7.8 Efeito dos determinantes individuais na avaliação hedônica do atributo sabor do queijo “Santo Giorno”.....	129
5.7.10 Relação entre análises de cor, perfil de textura instrumental e análise sensorial.....	132
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	134
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE A.....	157
APÊNDICE B.....	169

1 INTRODUÇÃO

A atividade leiteira e a produção de derivados lácticos têm se destacado no setor agropecuário brasileiro. A produção de leite de vaca no Brasil cresceu em uma taxa relativamente constante desde 1974 até os dias atuais. Segundo dados da Pesquisa Pecuária Municipal do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o país saiu do patamar de 7,1 bilhões de litros de leite produzidos naquele ano, alcançando 32,1 bilhões de litros em 2011 (crescimento superior a 350% no período) (BNDES, 2013).

Há décadas, a maior parte do leite produzido no país foi oriunda da região Sudeste. Entretanto, a região que foi responsável por mais da metade da produção nacional, desde 1974, vem perdendo participação relativa, e em 2011 passou a responder por, aproximadamente, um terço do leite brasileiro. O Nordeste manteve contribuição estável (em torno de 13%), enquanto que as regiões Norte, Centro-Oeste e, sobretudo a região Sul ganharam maior participação. Esta última apresentou um salto de produção na década de 2000, chegando em 2011 a 32% da produção nacional (MAIA et al., 2012).

O leite é considerado um dos alimentos mais completos, principalmente devido ao elevado teor de proteínas e sais minerais, além de outras substâncias como a lactose e gordura. Devido a essa composição, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de diversos grupos de microrganismos, bactérias proteolíticas, ácido lácticas e lipolíticas (FERREIRA, 2006).

O amplo uso de fermento láctico comercial em queijos fabricados a partir do leite pasteurizado resulta na perda das características típicas dos vários tipos de queijos quando comparados aos produzidos com leite cru. Isto ocorre em consequência da substituição integral da complexa microbiota nativa presente no leite cru por fermentos lácticos comerciais uniformes, que conduzem a uma padronização do produto (MACEDO et al., 2004).

Para minimizar tais problemas, tem-se buscado selecionar cepas que sejam parte da microbiota presente no leite cru e nos queijos artesanais, de modo a obter culturas iniciadoras e adjuntas especificamente preparadas para adição ao leite tratado termicamente e destinado à produção de queijos típicos (MARINO et al., 2003; MACEDO et al., 2004; MENÉNDEZ et al., 2004; CARVALHO, 2007).

Uma combinação de fatores físicos e naturais, tais como relevo, clima e vegetação, proporcionaram, ao longo do tempo, pastagens típicas e o desenvolvimento de bactérias específicas de multiplicação possível em determinados micro-climas. O presente estudo teve

buscou realizar a coleta de leites provenientes de propriedades rurais e laticínios da Mesorregião Sudoeste do Paraná, isolando e selecionando bactérias lácticas das espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subs. *bulgaricus* com posterior elaboração de um fermento láctico endógeno (nativo) para o desenvolvimento de queijos de massa semicozida.

Este estudo foi desenvolvido a partir de uma proposta de inovação no mercado queijeiro visado pelo projeto Rede, apoiado pela região do Vêneto e coordenado pela Associação Bellunesi nel Mondo e a família Mezzomo da Itália e do Brasil. A partir dessa ideia, a UTFPR de Pato Branco e o Instituto de pesquisas Bioagro realizaram o projeto que tinha como principal objetivo o desenvolvimento de fermentos endógenos para e elaboração do queijo Típico Sudoestino, que posteriormente foi nomeado como “Santo Giorno”.

O estudo contou com a participação de várias entidades, sendo os principais promotores dessa pesquisa a Agência de Desenvolvimento Regional do Sudoeste do Paraná, ABM - Associazione Bellunesi nel Mondo, Família Mezzomo Circolo Veneto Italo-Brasileiro Di Coronel Vivida - PR. Os Parceiros financiadores e/ou colaboradores do projeto foram: Regione Del Veneto - Itália, Província di Belluno - Itália, Cortal Extrasoy - Itália, Comat do Brasil, AMSOP - Associação dos municípios do Sudoeste do Paraná, SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas do Paraná, UNICAFES - Federação das Cooperativas da Integração Solidária da Agricultura Familiar do Estado do Paraná, Laticínio Alto Alegre-PR, Laticínio HE - PR, Laticínio Primo Queijo - PR, Laticínio Cooperfarbom - PR, Laticínio Bodanese - PR, BONETTI AGRONUTRI-PR, Prefeitura Municipal de Coronel Vivida - PR, Laticínio Vênetto - PR, Laticínio Lamedor-PR, FAEP - Federação da Agricultura do Estado do Paraná, FETAEP - Federação dos Sindicatos dos Trabalhadores Rurais do Estado do Paraná, SEAB - Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná e EMATER - Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado do Paraná; os parceiros técnicos foram: UTFPR - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, DAFNAE - *Department Aliments Food Natural Environment dell'Università degli Studi di Padova*, Bioagro Società partecipata di Veneto Agricultura-Itália.

Diante deste contexto, tornou-se de extrema importância para elaboração deste novo produto, o desenvolvimento de pesquisas que considerassem o binômio alimento-qualidade, através da avaliação físico-química, microbiológica e sensorial, que contribuirão para definição de identidade e qualidade do queijo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um fermento láctico endógeno, a partir da seleção, isolamento e identificação das bactérias *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* de leite coletado em municípios do Sudoeste Paranaense e verificar suas propriedades tecnológicas na elaboração do queijo de massa semicozida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de leite de municípios da bacia leiteira do Sudoeste do Paraná;
- Isolar, purificar e identificar morfológicamente um número representativo de colônias de *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. das amostras de leite coletadas;
- Realizar análise de amplificação aleatória polimórfica de DNA (RAPD-PCR) e Reação em cadeia de polimerase (PCR-espécie específica) para identificação genética;
- Verificar a capacidade fermentativa das bactérias identificadas através de ensaio tecnológico;
- Desenvolver o fermento láctico termofílico liofilizado utilizando as bactérias que tiveram melhor desempenho nos testes de acidificação;
- Elaborar queijos utilizando o(s) fermento(s) desenvolvido(s);
- Realizar análises físico-químicas, microbiológicas, inspeção visual com 30, 60 e 180 dias de maturação e análise sensorial dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ATIVIDADE AGROPECUÁRIA NA MESORREGIÃO SUDOESTE DO PARANÁ

A Mesorregião do Sudoeste do Paraná é composto por 42 municípios (Figura 1), distribuídos por 4 Microrregiões: Capanema, Francisco Beltrão, Pato Branco e Palmas (IBGE, 2011).

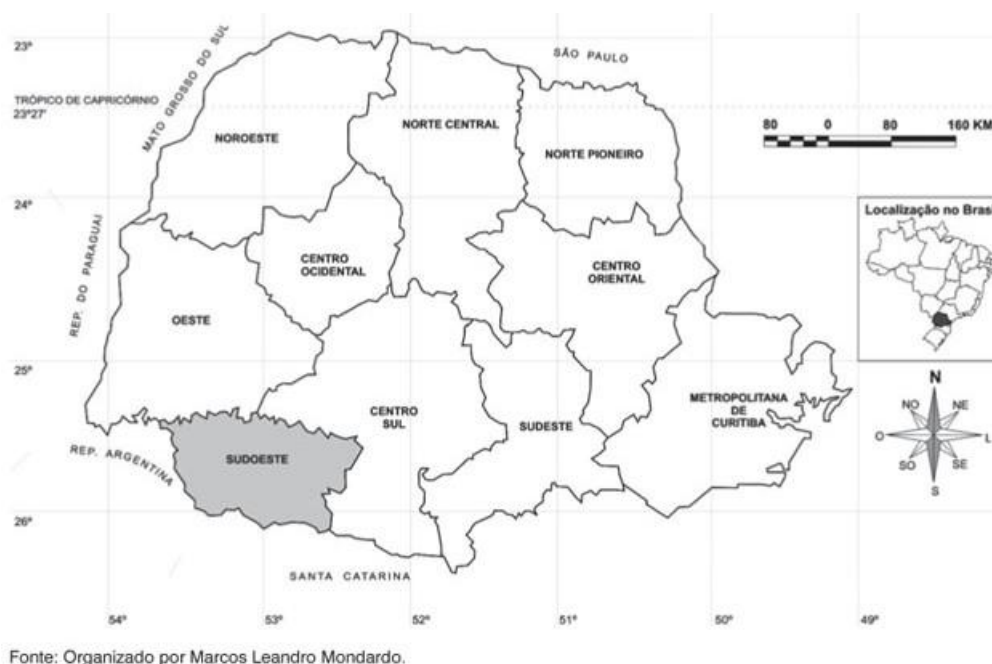


Figura 1- Mesorregião Sudoeste Paranaense.

No período que compreende as décadas de 50 e 60, o Sudoeste passou por grande transformação na sua base produtiva, com a introdução de novas práticas de cultivo a partir da expansão da cultura da soja. A adubação química, o uso do calcário e a mecanização das terras substituíram a técnica do pousio (descanso ou repouso proporcionado às terras cultiváveis, interrompendo-lhe as culturas para tornar o solo mais fértil). A industrialização da agricultura no Sudoeste foi intensa, mesmo nas áreas onde o relevo não permitia. A soja e o milho passaram a ocupar grandes extensões de terra e possibilitaram a implantação de indústrias de ração, que vieram a subsidiar a produção e industrialização da carne de aves (IPARDES, 2004).

A terra permanece sendo o local de trabalho e moradia para as famílias. Os filhos que permanecem na terra estão envolvidos na continuidade do trabalho na propriedade, propiciando a visão de que o estabelecimento continua sendo uma unidade de produção e de

consumo, uma unidade de produção e de reprodução social para boa parte desse segmento da população rural. Essa continuidade da unidade familiar na propriedade proporciona, de alguma maneira, o sustento econômico dessas famílias fazendo com que as propriedades não sejam vendidas e incorporadas a propriedades maiores. Ainda de acordo com o IPARDES (2009), a Mesorregião Sudoeste do Paraná possui uma base agrícola fundamentada na renda para os pequenos produtores da região. Observa-se, nos últimos anos, um aumento da produção leiteira, com expressivos avanços na adoção de tecnologias, com potencial de crescimento, destacados pela agricultura familiar, pela presença de segmentos de organização como mão-de-obra, necessários para o desenvolvimento da atividade leiteira.

De acordo com Muzilli et al. (2008), as regiões Sudoeste do Paraná, Oeste de Santa Catarina e Noroeste do Rio Grande do Sul, juntas, concentram o maior elenco de estabelecimentos rurais do estrato de agricultura familiar da América Latina e se destacam no cenário nacional pelo ótimo potencial de crescimento como bacia leiteira. Tais evidências apontam que o apoio à cadeia produtiva do leite constitui ação essencial para o crescimento do agronegócio sul-brasileiro como um todo e da agricultura familiar em especial.

A análise prospectiva das cadeias produtivas no contexto do agronegócio, baseada em estudos realizados pelo IPARDES no primeiro trimestre de 2007 evidenciou que a pecuária leiteira seria, dentre outras, a atividade prioritária para o desenvolvimento da agricultura familiar e da agroindústria paranaense (MUZILLI et al., 2008).

No Paraná, o número de pequenos produtores na atividade leiteira continua aumentando, e de acordo com a Federação da Agricultura do Estado do Paraná (FAEP, 2011) não existe outra atividade agrícola que garanta renda mensal como o leite. Nos últimos anos, as regiões Oeste e Sudoeste do estado ultrapassaram a bacia leiteira de Castro (Piraí do Sul, Doutor Ulysses, Cerro Azul, Rio Branco do Sul, Itaperuçu, Campo Largo, Ponta Grossa, Carambeí e Tibagi) que tem mais amparo tecnológico.

3.2 PRODUÇÃO DE LEITE NO BRASIL

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em 2012, a Índia foi o maior produtor de leite do mundo, seguido pelos Estados Unidos e China. Considerando-se os dados oficiais mais recentes do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) sobre a produção brasileira, os 33 bilhões de litros de leite captados em 2012 colocam o Brasil em quarto lugar no *ranking* dos maiores produtores de leite do mundo daquele ano, na frente da Rússia e da Nova Zelândia. Entretanto, a posição brasileira no

ranking mundial pode mudar para os próximos anos. O IBGE prevê que a produção leiteira nacional de 2013 tenha alcançado 35 bilhões de litros, um salto de 6% em comparação ao ano anterior (CEPEA, 2014).

A produção brasileira é superior se comparado aos países que mais exportam produtos lácteos para o Brasil, como o Uruguai, que se enquadra em 46^a posição e a Argentina que fica com 17^a colocação. No Brasil, os Estados que se destacam nesse setor são Minas Gerais, produtor de 27,3% do leite nacional, Rio Grande do Sul (11,8%) e Paraná com 11,7% da produção e média de dois milhões trezentos e dezenove mil litros ao ano (EMBRAPA GADO DE LEITE, 2012).

De acordo com dados fornecidos pelo IBGE (2013), a aquisição de leite cru pela indústria brasileira foi de 5,686 bilhões de litros no 1^o trimestre de 2013 indicando queda de 1,4% e 2,0% com relação ao 1^o e 4^o trimestres de 2012, respectivamente. Minas Gerais foi o estado que mais comprou leite cru e destinou à industrialização no 1^o trimestre de 2013. Este estado participou com 25,7% do total nacional, seguido pelo Rio Grande do Sul (14,6%) e Paraná (12,5%). Comparativamente ao 1^o trimestre de 2012, houve ganhos de participação do Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro e Santa Catarina. A região Sul do Brasil ocupa a 2^a posição em produção de leite (9,6 bilhões de litros), enquanto a região Sudeste continua na liderança (10,9 bilhões de litros).

Segundo a SEAB (Secretaria de Agricultura e do Abastecimento), a Mesorregião Sudoeste do Paraná produz 998,8 milhões de litros de leite por ano. Os municípios que compõem essa mesorregião aumentaram em 900 mil litros a produção em relação ao ano de 2011. Os municípios que mais se destacam são Chopinzinho, cuja produção no ano de 2012 foi de 67,8 milhões de litros com um aumento de 500 mil litros em relação ao ano anterior, seguido por Francisco Beltrão, que aumentou 3,5 milhões de litros em um ano. Pato Branco apresentou uma queda de 1,4 milhões de litros e agora o município está quase empatado com Dois Vizinhos, com 38,1 milhões (SISTEMA BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO, 2012).

3.3 LEITE

O leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias das quais algumas estão em emulsão (gordura e substâncias associadas), algumas em suspensão (caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais) (ORDÓÑEZ, 2005).

De acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas” (BRASIL, 2011).

Por sua composição, o leite é considerado um dos alimentos mais completos em termos nutricionais e fundamentais para dieta humana, mas pela mesma razão, constitui-se num excelente substrato para o desenvolvimento de uma grande diversidade de microrganismos, inclusive os patogênicos. A qualidade do leite ser uma constante preocupação para técnicos e autoridades ligadas à área de saúde, principalmente pelo risco de veiculação de microrganismos relacionados com surtos de doenças de origem alimentar (LEITE JR; TORRANO; GELLI, 2000; TIMM et al., 2003).

O leite pasteurizado, utilizado pela indústria de derivados lácticos, segundo a Instrução Normativa 62 (BRASIL, 2011) deve apresentar-se quanto aos parâmetros microbiológicos: contagem padrão em placas máximo de $8,0 \times 10^4$ UFC/mL, máximo de contagem de coliformes a 35 °C 4 NMP/mL e contagem de coliformes a 45 °C 2 NMP/mL e ausência de *Salmonella* spp. em 25 mL (BRASIL, 2011). Quanto aos parâmetros físico-químicos, o leite pasteurizado deve possuir gordura mínima de 3,0 g/100g, acidez de 0,14 a 0,18 gramas de ác. Láctico/100 mL, sólidos não gordurosos no mínimo de 8,4 g/100g e índice crioscópico de -0,530 a -0,550 °H, equivalentes a -0,512 e -0,531 °C.

3.4 MICROBIOTA DO LEITE

O leite contido na glândula mamária de animais saudáveis é considerado praticamente estéril, entretanto, vários pontos são considerados críticos no que diz respeito à obtenção do leite. Imediatamente após a ordenha, o leite contém poucos microrganismos, porém, após um certo tempo, a carga microbiana do leite pode aumentar devido a contaminação por microrganismos provenientes do ambiente e do homem (FONSECA; SANTOS, 2000).

O conhecimento do conteúdo bacteriano presente no leite é de grande importância no controle de qualidade, uma vez que, uma contagem elevada pode indicar leite velho, refrigeração inadequada, métodos não higiênicos de produção no manuseio e no processamento.

A pasteurização do leite tem como objetivo eliminar células vegetativas de microrganismos patogênicos e a maioria dos deterioradores, promovendo inocuidade ao

produto láctico obtido, porém elimina também parte da microbiota láctica benéfica. Assim, o uso de leite pasteurizado na fabricação de queijos prejudica o desenvolvimento de sabor e aroma, devido à inativação de enzimas e eliminação de microrganismos benéficos (ATASOY; TÜRKÖGLÜ, 2009), sendo necessário o uso fermento láctico comercial.

As BALs são inerentes da matéria-prima e desempenham um papel primordial no processo de fermentação do leite, além de produzirem substâncias capazes de controlar microrganismos patogênicos. Esta capacidade de controle dos patógenos é conhecida como atividade antagonista, que ocorre devido a multiplicação competitiva com outros microrganismos, potencializado pelos efeitos inibitórios dos seus metabólitos. O principal é o ácido láctico, além de peróxido de hidrogênio, CO₂, diacetil e as bacteriocinas (NAIDU et al., 1999).

As BALs podem ser classificadas de acordo com a temperatura de crescimento em mesofílicas e termofílicas. As mesofílicas possuem a temperatura ótima de multiplicação entre 25 e 40 °C, mínima entre 5 e 25 °C, e máxima entre 40 e 50°C. As termofílicas, das quais se destacam as espécies *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, são aquelas que têm temperatura ótima de multiplicação entre 45 e 65 °C, mínima de 35 e 45 °C, e máxima entre 60 e 90 °C (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

3.4.1 Gêneros: *Streptococcus* e *Lactobacillus*

A bactéria láctica *Streptococcus thermophilus* está relacionada com os *Lactococcus lactis*, mas é filogeneticamente mais próxima às espécies de *Streptococcus* do grupo *viridans*. *Streptococcus viridans* são divididos em cinco grupos: (I) o grupo *mutans*, (II) o grupo *anginosus*, (III) o grupo *sanguinus*, (IV) grupo *mitis*, (V) grupo *salivarius*, que inclui *S. salivarius*, *S. vestibularis* e *S. thermophilus* (FACKLAM, 2002).

De todas as espécies de *Streptococcus*, a mais utilizada nas fermentações lácticas é o *Streptococcus thermophilus* (HASSAN; FRANK, 2001). O que diferencia esta espécie das demais é a sua resistência ao aquecimento, multiplicando bem entre 45 a 52 °C e conseguindo, inclusive, sobreviver ao aquecimento de 60 °C por 30 minutos (HARDIE; WHILEY, 1995). Na fermentação láctica, o papel do *S. thermophilus* está relacionado a sua rápida conversão de lactose em ácido láctico, promovendo uma rápida diminuição do pH, e a produção de metabólitos com propriedades tecnológicas importantes, como exopolissacarídeos e bacteriocinas (DELORME, 2008).

O *Streptococcus thermophilus* é frequentemente utilizado em combinações com *Lactobacillus* sp. que desempenham o importante papel metabolizando a galactose, porção de lactose que não é utilizada pelo *S. thermophilus* complementando a acidificação do queijo (MICHEL; MARTLEY, 2001).

S. thermophilus e *L. bulgaricus* apresentam no leite uma interação que é mutuamente favorável, caracterizado pelo fato de que cada bactéria produz uma ou mais substâncias que estimulam o desenvolvimento da outra. O fenômeno de simbiose foi estudado, observando-se um efeito positivo da co-cultura em relação a mono-cultura em termos de crescimento, acidificação, produção de sabor e proteólise, os dois organismos multiplicam sinergicamente. Inicialmente, *S. thermophilus* se desenvolve rapidamente e produz ácido láctico, à medida que a acidez aumenta, o *L. delbreuckii* sp. *bulgaricus* se torna mais ativo e produz mais ácido assim como compostos aromáticos. Verifica-se que a multiplicação de *S. thermophilus* estimula o desenvolvimento do *Lactobacillus*, provavelmente, através da produção de um fator de crescimento, o ácido fórmico, que estimula a atividade proteolítica. O crescimento da população de *Lactobacillus* é estimulado pela produção de níveis baixos de dióxido de carbono (CO₂) e ureia (30 - 50 mg de leite CO₂/kg dentro da primeira hora de incubação). Os lactobacilos, por sua vez, estimulam o desenvolvimento de *S. thermophilus* liberando peptídeos, e em menor escala, os aminoácidos na forma de subprodutos de proteólise (FERNANDES, 2009).

Os *Lactobacillus* participam do desenvolvimento do aroma e sabor do queijo devido às suas atividades proteolíticas e lipolíticas (LÓPEZ-DÍAZ, 2000). Este gênero contém cerca de 60 espécies. Destas, *Lb. helveticus*, *Lb. delbruecki*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum* são as mais encontradas em alimentos (LÓPEZ-DÍAZ, 2000).

Lactobacillus delbrueckii inclui três subespécies: *delbrueckii*, *bulgaricus* e *lactis*. O principal interesse em relação a estas bactérias lácticas é proveniente do uso mais expressivo das subespécies *bulgaricus* e *lactis* na indústria de derivados lácticos (GERMOND et al., 2003).

Os *Lactobacillus* podem ser divididos em 3 grupos, tendo por critério o produto final de sua fermentação: *Lactobacillus* termofílicos homofermentativos obrigatórios que fermentam apenas hexoses à ácido láctico (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus helveticus*); *Lactobacillus* mesofílicos heterofermentativos facultativos, que são capazes de fermentar outras fontes de carbono além das hexoses, produzindo ácidos orgânicos, CO₂, álcool e H₂O₂ (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum*); e *Lactobacillus* mesofílicos

heterofermentativos obrigatórios, que utilizam obrigatoriamente hexoses e pentoses como fonte de carbono, fermentando hexoses a ácido lático, ácido acético, etanol e CO₂ e pentoses a ácido lático e ácido acético (*Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*) (FOX et al., 2000).

Estas bactérias são utilizadas para a elaboração de vários produtos lácticos, destacando-se os iogurtes e queijos. A maioria da produção de iogurtes comerciais usam um inóculo misto contendo cepas de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Os produtos lácticos que são submetidos a temperaturas elevadas durante a fermentação são acidificados pelo desenvolvimento combinado de *S. thermophilus* e *Lactobacillus* sp. (FERNANDES, 2009).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DE BALS

A caracterização de BALs representa um avanço tecnológico significativo na produção de produtos lácticos fermentados, colocando-os entre os mais sofisticados e mais pesquisados entre os alimentos fermentados (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Para a identificação de bactérias são realizados ensaios microbiológicos clássicos utilizando meios de cultura específicos para o microrganismo que se deseja identificar. Testes bioquímicos, fenotípicos e fisiológicos, normalmente usados para identificar taxonomicamente a microbiota presente no queijo, são demoradas e não são capazes de diferenciar espécies fenotipicamente relacionados. O desenvolvimento de técnicas moleculares, como a PCR, oferece novas perspectivas na taxonomia microbiana e no estudo de diagnósticos, propiciando a seleção de linhagens de BALs com características desejáveis (DELGADO; MAYO, 2004).

3.5.1 PCR (Reação em Cadeia de Polimerase)

A PCR (Reação em cadeia de polimerase) é assim chamada porque envolve a enzima polimerase, e os produtos sintetizados em cada ciclo servem como modelo para o próximo ciclo, gerando uma reação em cadeia (KOCHER; WILSON, 1991).

A ideia básica da reação em cadeia da polimerase foi formulada por Kary Mullis em 1983 e o primeiro procedimento de uso foi publicado em 1985. A versão inicial da técnica usou a Klenow polimerase, enzima responsável pela cópia do DNA na PCR, para fazer cópias

de um DNA *template* e dois primers de oligonucleotídeos, delineando a região a ser amplificada. Após cada ciclo de síntese de DNA *template*, a mistura tinha que ser aquecida a uma temperatura maior que 90 °C para iniciar um novo padrão de síntese de *templates* originais. Como a Klenow polymerase é inativada durante o ciclo que utilizava elevadas temperaturas, foi necessário repetir a reação várias vezes com uma enzima nova, o que encareceu o procedimento e o fez ser reprovado em laboratório.

A consolidação da técnica de PCR foi alcançada a partir da adoção da enzima Taq DNA polimerase para a técnica. Essa enzima termoestável é capaz de tolerar temperaturas elevadas por um determinado período de tempo. Isto permitiu que a reação da PCR ocorresse com múltiplos ciclos de síntese de DNA sem precisar da intervenção de um operador. Outra grande vantagem foi em relação às mudanças bruscas de temperatura, as quais passaram a ser feitas por um termociclador automático (BROWN, 1998).

Segundo Brown (1998), a reação em cadeia da polimerase promove o aumento do número de cópias de um fragmento de DNA. A região do DNA a ser amplificada é determinada pelo par de *primers* ou iniciadores, que são pequenas sequências de DNA, construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse. Ou seja, são segmentos de DNA que pareiam suas bases com a fita molde funcionando como um “iniciador” para as cópias de DNA a serem formadas, uma vez que eles se hibridizam à fita molde.

Cada ciclo de replicação *in vitro* de DNA envolve três etapas básicas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação, normalmente a 94 °C ocorre a separação da dupla fita de DNA para exposição dos sítios-alvo. Na segunda etapa, com a diminuição da temperatura, que pode ser, por exemplo, a 55 °C ocorre o anelamento dos *primers* em regiões específicas de cada fita de DNA separada, que serve como molde, delimitando, assim, a região inicial e a região final da sequência genética a ser amplificada. Finalmente, na etapa de extensão, ocorre a síntese de DNA complementar à fita-molde e geralmente é feita em uma temperatura em torno de 72 °C. Em 25 a 40 ciclos, é possível produzir em poucas horas milhões de cópias específicas de DNA, até mesmo quando a amostra de partida contém apenas uma única sequência alvo original (WALKER et al., 1999).

3.5.2 Eletroforese

A análise de DNA por eletroforese é uma das técnicas fundamentais nos laboratórios de pesquisa e de diagnóstico. O princípio é baseado no fato da molécula de DNA possuir

carga negativa em valores de pH neutro ou alcalino e conseqüentemente, quando aplicado ou imerso em uma matriz de gel submetida a um campo elétrico, migra em direção ao pólo positivo (ânodo). A velocidade da migração depende do tamanho da molécula. Por isso em um dado momento da eletroforese moléculas de tamanhos distintos se encontram em diferentes pontos da matriz. O tipo de matriz que é usada (agarose ou poliacrilamida) depende do tamanho dos fragmentos de DNA que se pretende separar e visualizar. Devido à diferença no tamanho dos poros dessas matrizes, utiliza-se normalmente o gel de agarose para a separação de fragmentos que variam de 0,2 kb a 50 kb (1 kb = 1000 pares de bases) e o gel de poliacrilamida para separação de fragmentos pequenos, de até 1kb. Alternativamente, para a resolução de fragmentos superiores a 1 kb, pode-se utilizar a agarose com baixo ponto de fusão (*Low Melting*), que é um tipo de agarose derivada de síntese orgânica (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A eletroforese em gel de agarose é um método simples e eficiente que permite separação, identificação e purificação de moléculas de DNA obtidas como produto da PCR/RAPD-PCR. As moléculas são separadas através da migração de partículas no gel, com a aplicação de uma diferença de potencial elétrico, onde as moléculas de menor massa migram mais rápido. O protocolo padrão de gel de agarose permite separar fragmentos de DNA entre 0,5 a 25 kb. A eletroforese também pode ser utilizada para separar proteínas e moléculas de RNA. A agarose utilizada no gel é um polissacarídeo que forma uma rede e permite regular a velocidade da migração das moléculas durante a separação. A adição de corante fluorescente (brometo de etídio ou sybr®), que se intercala entre as bases do DNA, e o uso de radiação ultravioleta permitem a visualização e a fotografia (NASCIMENTO et al., 1999; SOUZA, 2003).

3.6 CARACTERÍSTICAS TECNOLÓGICAS DAS BALS

A rápida redução do pH, pelo acúmulo de ácido láctico, atua, principalmente no controle da microbiota contaminante (ARAÚJO, 2008).

A atividade acidificante durante o período de fermentação pode ser monitorada pela cinética da acidificação, que avalia a curva de pH, medindo a variação em intervalos de tempos regulares, assim, a velocidade máxima de acidificação ($V_{m\acute{a}x}$) pode ser calculada. O tempo para atingir a $V_{m\acute{a}x}$ e o pH correspondente também podem ser monitorados. De acordo

com Picque et al. (1992), esses parâmetros são os que melhor descrevem a cinética de acidificação. Os parâmetros cinéticos de acidificação, como velocidade máxima de acidificação ($V_{m\acute{a}x}$) e tempo de fermentação (tpH) de BALs em leite têm sido extensivamente documentados (KRISTO; BILIADERIS; TZANETAKIS, 2003; LUCAS et al., 2004; CHAMMAS et al., 2006; ALMEIDA; TAMINE; OLIVEIRA, 2008; DAMIN, 2008 *apud* SACCARO, 2008).

Ayad et al. (2004) pesquisaram a habilidade de produção de ácido em 755 linhagens de bactérias lácticas isoladas de leite e derivados. Sessenta por cento (60%) dos *Lc. lactis* subsp. *lactis* mostraram média atividade acidificante (redução de 0,4 unidades após 3 a 5 horas). A maioria das linhagens de *Lb. plantarum* demonstraram baixa capacidade acidificante (redução de 0,4 unidades após período maior que 5 horas) e as linhagens *E. faecium* apresentaram atividade acidificante variando entre baixa e média.

De acordo com Furtado (2011), o *Streptococcus thermophilus* sob as condições ideais de temperatura (37 a 43 °C) produz acidez muito rapidamente, sobretudo se estiver associado com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, com o qual interage em boa simbiose. Mas *Streptococcus thermophilus* não é um forte produtor de acidez e é gradualmente inibido quando o teor de ácido láctico passa de aproximadamente 1,2% (120 °D).

A proteólise é a degradação das proteínas do leite (caseína), originando a liberação de peptídeos curtos e aminoácidos livres (FORSYTHE, 2002; MOULAY et al., 2006). Este efeito tem uma grande importância na maturação dos queijos e no desenvolvimento do sabor, aroma e textura característico do produto acabado (FORSYTHE, 2002).

Este é o evento bioquímico mais complexo que ocorre durante a maturação de queijos (FOX et al., 2004). Na maturação, a proteólise é catalisada por enzimas do coagulante (quimosina, pepsina, proteases microbianas ou de plantas); proteases presentes no leite (plasmina e possivelmente catepsina D e outras enzimas de células somáticas); enzimas das bactérias *starter*, não *starter* ou de culturas secundárias (*P. camemberti*, *P. roqueforti*, *Propionibacterium* sp., *B. linens* entre outras); proteases exógenas ou peptidases ou ambas, adicionadas para acelerar a maturação (SOUSA et al., 2001). A proteólise de um queijo pode ser medida em termos de extensão e profundidade. A extensão da proteólise está relacionada com a hidrólise do paracaseinato de cálcio ao longo do tempo, principalmente devido à ação de quimosina residual, cuja atividade é influenciada pelo pH e, conseqüentemente, pela acidez (WANG; SUN, 2002).

Renz e Puhan (1975) relataram que a atividade proteolítica realizada pelas bactérias iniciadoras pode apresentar alguns efeitos adversos em iogurtes e leites fermentados, produtos

dos quais pode ocorrer a produção de sabor amargo devido ao acúmulo de peptídeos, resultado relacionado à intensa atividade proteolítica do *L. bulgaricus*.

As BALs apresentam diversas características tecnológicas que são importantes na elaboração de derivados lácticos. Entre as características tecnológicas que as BALs devem apresentar para serem utilizadas na composição de um fermento láctico, destaca-se a sua resistência à infecção por bacteriófagos. Bacteriófagos ou fagos são vírus intracelulares exclusivos de bactérias. Cada fago é específico para uma determinada espécie bacteriana, sendo incapazes de infectar outras (HAGENS; OFFERHAUS, 2008).

A infecção por bacteriófagos na indústria de produtos fermentados pode ocasionar a diminuição da capacidade de acidificação das culturas lácticas, resultando em problemas como a ausência da fermentação e má dessoragem do queijo, ocasionando substanciais perdas econômicas (ALLISON; KLAENHAMMER, 1998; QUIBERONI et al., 2003; GUGLIELMOTTI et al., 2009).

3.7 CULTURA *STARTER* NA FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

A cultura *starter* é definida como uma cultura pura de microrganismos úteis capazes de diminuir o tempo de fabricação de produtos, garantindo produtos de qualidade uniforme (TERRA, 1998).

A função primária da cultura *starter* é a produção de ácido láctico, o pH da massa cai para próximo de 5,0 em um espaço de tempo entre 5 e 20 horas, dependendo da variedade do queijo a ser fabricado. A acidificação é proporcionada pela fermentação da lactose para ácido láctico pelas bactérias lácticas adicionadas ao leite ou pela acidificação direta com adição de ácido láctico em alguns casos. Tradicionalmente, os queijeiros confiavam na microbiota endógena presente no leite cru para a fermentação da lactose, processo que ainda é utilizado na fabricação do queijo Minas Artesanal. No entanto, essa microbiota pode variar muito, modificando o grau de acidificação e, conseqüentemente, a qualidade do queijo (FOX; MCSWEENEY, 1998; WALSTRA et. al., 1999).

Os fermentos lácticos são importantes para promover a acidificação do leite, bem como contribuir para os aspectos sensoriais. A acidificação é conseguida a partir da fermentação da lactose pelas culturas bacterianas iniciadoras que produzem ácido láctico, embora alguns queijos possam ser acidificados por adição direta de ácido, não necessitando de um fermento láctico. No passado, a acidificação era conseguida pelo desenvolvimento da microbiota

endógena do leite, este método ainda é usado em alguns queijos artesanais tradicionais, no entanto. Este processo é difícil de controlar e tende a dar um produto variável que pode sofrer contaminações e produção de aromas inconsistentes. Portanto, a indústria utiliza fermentos cuidadosamente selecionados, que proporcionam aspectos previsíveis e desejáveis. *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus delbrueckii* são as principais espécies de bactérias *starter* utilizadas como fermentos na fabricação de queijos. Atualmente, o uso de culturas concentradas e liofilizadas que podem ser adicionadas diretamente ao tanque de fabricação estão se tornando comuns por razões de conveniência, pois minimizam os riscos de contaminação (FERNANDES, 2009).

O ácido láctico gerado pelas culturas *starter* ácido lácticas durante a fermentação causa uma redução do pH externo, alterando a homeostasia de diferentes patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp., *Salmonella* spp.) e deteriorantes (*Pseudomonas* e *Enterococcus*). A rápida redução do pH para valores inferiores a 5,3 é suficiente para inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* se os produtos forem fermentados acima de 18 °C (JAY, 2005).

A acidificação do leite é o passo fundamental na fabricação do queijo, ela é essencial para o desenvolvimento do sabor e da textura. Ela promove a coagulação e a redução do pH inibindo a multiplicação de agentes patogênicos e deteriorantes. A acidificação é normalmente obtida a partir da fermentação da lactose pelas culturas iniciadoras bacterianas presentes no fermento láctico, produzindo ácido láctico (FERNANDES, 2009).

A escolha do fermento láctico depende do tipo de queijo a ser produzido. A temperatura escaldante, ou cozimento da coalhada é uma importante consideração. Abaixo de 30 °C são utilizadas culturas mesófilas, isoladamente, ou em combinação, tais como *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, e *Leuconostoc* spp. Porém, quando as temperaturas de cozimento da coalhada, são maiores (45 - 55 °C), como em queijos suíços e queijos muito duros, são usadas as culturas termófilas (cuja temperatura ótima multiplicação é 40 °C), tal como *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Outras propriedades dos fermentos que são importantes incluem atividade proteolítica, importante em função do desenvolvimento do sabor durante a maturação, e o metabolismo de citrato, necessário para a produção do diacetil, composto aromatizante encontrado em algumas variedades de queijos (FERNANDES, 2009).

3.8 QUEIJO

De acordo com a história, os antigos gregos creditavam a descoberta do queijo a Aristeu, rei da Arcádia, filho de Apolo e Cirene. Uma lenda a atribui a um nômade árabe que, em uma de suas jornadas pelo deserto, teria levado como alimento tâmaras secas e leite mantido em um cantil feito de estômago seco de carneiro. Depois de certo tempo, quando foi beber o leite, descobriu que ele havia se transformado em um sólido de sabor agradável. Independente de como ele foi descoberto, porém, o que se sabe é que o queijo tem sido utilizado ao longo do tempo como uma forma de preservação do leite (PERRY, 2004).

O queijo pode ser definido como 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 lácticos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes (BRASIL, 1996).

Segundo o RIISPOA (1952), entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação e, por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo.

Os queijos surgiram no Brasil no estado de Minas Gerais, mais especificamente nas cidades de São Vicente de Minas, Seritinga, Serrano, Cruzilha e Minduri, por volta de 1920, pela produção de imigrantes dinamarqueses. Os queijos considerados brasileiros, por terem sido desenvolvidos localmente (mesmo que por imigrantes) são Prato, Minas Frescal, Minas Padrão, Minas Meia Cura, Reino, Requeijão (cremoso e culinário) e Queijo de Coalho (SEBRAE, 2008).

Os dados do mercado de queijos no Brasil são favoráveis, de 2010 para 2011, houve um aumento de 31,8% na importação e diminuição de 25% na exportação de queijos. Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de queijos, com 700 mil toneladas no ano de 2011, ficando atrás somente dos Estados Unidos com aproximadamente 5 milhões de toneladas e da União Europeia, com 710 mil toneladas.

De acordo com a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijos), a produção de queijos no Brasil deve ultrapassar 1,0 milhão de toneladas em 2013. Em 2011 foram produzidos 867,1 mil toneladas de queijos no país, 9,4% mais que em 2010. Os queijos mais produzidos são: mussarela, requeijão culinário, prato, requeijão cremoso e *petit suisse*, nesta

ordem. O queijo mussarela, principal queijo produzido, representa 28,1% do total, seguido do requeijão (18,7%) e ricota, queijo minas padrão e provolone que juntos representam 10% da produção. Apesar do consumo de queijos frescos ou tradicionais serem a maioria, observou-se que o consumo de queijos finos ou especiais no país passou de 2 a 3 quilos ao ano para 4,5 quilos *per capita*.

No que diz respeito ao processamento e transformação do leite, observa-se que o Paraná registra importante participação no setor em nível nacional. De acordo com os dados da Relação Anual de Informações Sociais (RAIS), do Ministério do Trabalho e Emprego, o Estado possui 275 estabelecimentos formais produtores de lácteos que declararam contratar mão de obra (BRASIL, 2009). Isso representa 7,5% do total de estabelecimentos brasileiros (3.683). Segundo essa fonte, o Paraná ocupa o terceiro lugar no *ranking* nacional, ficando atrás do Estado de Minas Gerais, que concentra 28,8% do total, e de São Paulo, que possui 616 laticínios formais (16,7%) instalados em seu território.

A indústria de laticínios paranaense possui um número elevado de empresas produtoras de queijo e de leite pasteurizado, que constam da pauta de produtos de mais de 40% dos laticínios paranaenses. Do ponto de vista da diversificação produtiva, 44% dos laticínios produzem apenas um único produto. Essas duas constatações demonstram uma limitação produtiva e tecnológica entre os laticínios de pequeno porte, uma vez que 53% destes produzem somente um tipo de produto, na sua grande maioria queijo (colonial, mussarela ou minas) ou leite pasteurizado. A indústria paranaense processa uma grande quantidade de queijo, para o qual destina mais de 50% do volume processado de leite. Possui sete laticínios detentores de tecnologia UHT e um laticínio produtor de leite em pó. Os produtos que requerem menores níveis de tecnologia (especialmente o leite pasteurizado) são produzidos pelas empresas de pequeno porte, responsáveis por 37% da produção estadual desse produto (IPARDES LATICÍNIOS, 2011).

A indústria paranaense de lácteos ainda não se projetou em nível nacional na oferta de produtos de maior valor agregado, o que constitui a maior limitação produtiva deste ramo industrial, dependendo da importação de produtos dos estados vizinhos para o abastecimento e consumo de produtos mais elaborados. Apesar dessas limitações, cabe observar que existem condições favoráveis para que a indústria de lácteos paranaense amplie e diversifique a sua base industrial, via incorporação de produtos de maior valor agregado, atualmente procedentes principalmente de São Paulo e do Rio Grande do Sul, visto que o Paraná dispõe de matéria-prima abundante e de alta qualidade, possui um elevado nível de capacidade

instalada de processamento e transformação do leite, além de dispor de um mercado consumidor em expansão (IPARDES LATICÍNIOS, 2011).

Com relação ao consumo de queijos no Brasil, houve um crescimento acentuado, passando de 666 mil toneladas em 2010 para 701 mil toneladas em 2011, com aumento *per capita* de 4,1% nesse período (ANUALPEC, 2012).

Os queijos convencionais e os queijos processados foram as duas classes que impulsionaram o crescimento do setor no Brasil, com 30% e 40%, respectivamente, no período de 2003 a 2007. Os queijos finos apresentaram 23% de aumento de produção, fato observado pela demanda de consumidores com maior poder aquisitivo que realizam viagens internacionais e conhecem novos produtos (ABIQ, 2013).

A grande maioria dos queijos são alimentos fermentados elaborados a partir do leite e que, devido ao processo de fermentação, apresentam uma microbiota bastante diversificada, podendo ser constituída de microrganismos desejáveis e indesejáveis. As bactérias ácido-láticas (BAL) constituem um exemplo do grupo dos desejáveis presentes nos diferentes tipos de queijo. No entanto, os indesejáveis, deteriorantes e/ou patogênicos também podem estar presentes nos queijos, em função de contaminações resultantes de higiene deficitária, relacionada a todo o processo de produção, desde a obtenção do leite até o consumo do produto final (GUEDES; NETO, 2004).

O queijo é uma das formas mais práticas, gostosas e saudáveis de se consumir as propriedades do leite, assim como é a forma mais simples e segura de preservá-lo. Fresco (pronto para o consumo logo após a fabricação) ou maturado (submetido a um processo de cura), sólido ou cremoso, de massa crua, cozida, semicozida, filada ou processada (ROBERT, 2007).

Considerado um dos melhores alimentos que o homem dispõe, não somente, por seu grande valor nutritivo em função de sua composição química, alto conteúdo de gordura, proteína de excelente qualidade e de outros compostos como cálcio, fosfatos, vitamina A, riboflavina entre outros, mas também pelas suas características sensoriais (NHUCH et al., 2004).

A fabricação de queijos envolve alguns procedimentos gerais, como preparo do leite, coagulação, dessoragem e outros que são específicos de cada tipo. O leite utilizado na produção de queijos frescos tem, obrigatoriamente, que ser pasteurizado. Para aqueles que passam por um período de maturação antes de serem consumidos, o leite pode ou não ser utilizado cru, dependendo do tipo de queijo. A legislação brasileira, porém, exige que

produtos derivados de leite cru sejam comercializados somente após maturação de 60 dias (PERRY, 2004).

A fabricação de queijo começa com a seleção microbiológica e química do leite. É essencial que o leite seja livre de antibióticos e quanto melhor a qualidade microbiológica, maior será a chance de sucesso na fabricação do queijo. Portanto, um leite de qualidade superior deve ser usado.

Existem inúmeros tipos de queijo, com diferentes características e para isso é necessária uma classificação facilitando a observação dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos: A Portaria Nº 146/1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), classifica os queijos de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco e umidade, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação dos queijos de acordo com a porcentagem de gordura no extrato seco e umidade.

Gordura (%)	
Queijo Extra Gordo ou Duplo Creme	mínimo de 60%
Queijo Gordo	entre 45,0 e 59,9%
Queijo Semigordo	entre 25,0 e 44,9%
Queijo Magro	entre 10,0 e 24,9%
Queijo Desnatado	menos de 10,0%
Umidade (%)	
Queijo Baixa umidade	até 35,9%
Queijo Média umidade	entre 36,0 e 45,9%
Queijo Alta umidade	entre 46,0 e 54,9%
Queijo Muita alta umidade	não inferior a 55,0%

Fonte: Portaria Nº 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996).

De acordo com a legislação brasileira, (BRASIL, 2001), os parâmetros microbiológicos para queijos variam conforme a classificação dada quanto à umidade (baixa, média, alta umidade, muito alta umidade), se são ralados, em pó, processados fundidos, temperados ou condimentados, com bactérias lácticas e coagulação enzimática. Para queijos de média umidade indicam-se a detecção de *Listeria monocytogenes*/25g, *Salmonella* sp./25g, contagem de Coliformes a 45 °C/g e contagem de Estafilococos coagulase positiva/g (BRASIL, 2001). No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) permite a fabricação e comercialização de queijos de massa semidura e dura elaborados a partir de leite cru desde que sua maturação seja em temperatura acima de 5 °C e por um período de, no mínimo, 60 dias (BRASIL, 1996).

3.8.1 Microbiota do queijo

A microbiota do queijo compreende o grupo de microrganismos iniciadores, composto pelas bactérias ácido-láticas e o grupo de microrganismos secundários. As bactérias ácido-láticas constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos comumente utilizados na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (MADERA et al., 2003). As culturas secundárias são microrganismos que não tem a função específica de produção de acidez, mas com o objetivo de obtenção de alguma característica particular desejável para a categoria do queijo a ser produzido, como *Propionibacterium* que produz gás provocando o aparecimento de olhaduras nos queijos Suíços os mofos azuis e brancos são utilizados para a fabricação dos queijos como Gorgonzola, Camembert e Brie as bactérias utilizadas especificamente para o tratamento da superfície dos queijos com maturação de casca e as culturas aromáticas (FOX; MCSWEENEY, 1998; ROBINSON; WILBEY 2002). A microbiota secundária, embora não contribua para a acidez, geralmente tem papel significativo na fase de maturação do queijo. Esse grupo inclui as BAL não iniciadoras, como espécies mesofílicas dos gêneros *Pediococcus* e *Lactobacillus* e outros microrganismos a exemplo de *Micrococcus*, *Brevibacterium*, bactérias propiônicas, bactérias corineformes, fungos e leveduras (GOBETTI et al., 1999; BERESFORD et al., 2001).

Carvalho (2007) encontrou uma incidência de 14,6% de *Streptococcus*, 30,5% de *Enterococcus*, 13,4% de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 41,5% de *Lactobacillus* e 1,7% de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* em queijos de coalho artesanais comercializados em Fortaleza.

Resende (2010) observou a presença de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* em amostras de leite, soro-fermento e queijo, além de *Enterococcus* spp. *Lactococcus* spp. e outras espécies de *Lactobacillus*. Sugere-se que estas espécies estejam bem adaptadas ao ambiente de produção do queijo Minas artesanal produzido na região da Serra da Canastra, contribuindo para o desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto.

3.8.2 Queijos Típicos/Artesanais

Os queijos artesanais são exemplos clássicos da manutenção da diversidade dos povos e de proteção dos seus costumes, suas tradições e seus valores, ocupando lugar de destaque na

economia de diversos países europeus, como França, Itália, Portugal e Espanha (FOX 1993; MOR-MUR et al., 1994; PARENTE et al., 1997; MENENDEZ et al., 2001).

No Brasil, é comum o uso de fermentos lácticos em produtos de laticínios industrializados, já que, para atenderem a legislação em vigor, são produzidos a partir de leite pasteurizado, e devido a uma diminuição da microbiota natural, são adicionados fermentos comerciais, que garantem a qualidade sanitária e o desenvolvimento do *flavour* do produto (BROLAZO, 2003). Porém, essa substituição da microbiota nativa resulta numa perda de características típicas do queijo regional (BRUNO, CARVALHO, 2009).

Paquereau (2007) acredita que a organização dos produtores em associações favorece a busca da Denominação de Origem para agregar valor ao produto em regiões em que a agricultura é pouco competitiva. A Denominação de Origem, segundo ele, está relacionada ao conceito de “sabor da terra”. É um produto ligado a uma região geográfica delimitada e com aspecto sensorial bem específico, através do clima, solo e os aspectos humanos que envolvem o sistema de produção.

Segundo Nassar (1999), a Denominação de Origem se aplica a produtos que possuem atributos qualitativos indissociáveis das características próprias de uma região ou micro região bem delimitada, sejam elas relativas ao clima, ao solo, à história ou à mão-de-obra. São produtos cujos processos de produção não são reproduzidos fora do local de procedência tradicional e, em vista disto, são regulamentados por uma legislação que os protege, certifica e fiscaliza sua autenticidade. Segundo Paquereau (2007), a qualificação de um produto desenvolvido no quadro territorial estabelece uma produção específica, conferindo-lhe excelência e distinção, como também, agregando-lhe valor, através da construção de uma notoriedade e uma identidade cultural, atrelada ao espaço, aos hábitos, às tradições e à confiança. A Denominação de Origem é, portanto, um instrumento de qualificação do produto, resultante de uma construção social, que consolida redes locais de produção. É uma prática comum nos mercados de alimentos e bebidas europeus, especialmente na França.

O queijos-de-minas foi reconhecido como patrimônio cultural brasileiro pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional (IPHAN, 2008), e receberam o registro de Indicação Geográfica na modalidade Indicação de Procedência assim como os queijos da Canastra (MG) e os queijos minas artesanais do Serro (MG) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2014).

Uma característica importante desses queijos é a forma artesanal de fabricação, utilizando o leite cru e o soro coletado dos queijos fabricados no dia anterior (chamado de pingo pelos produtores). A microbiota nativa formada principalmente por bactérias lácticas e leveduras

presentes no leite e no pingo, é de grande importância para as características sensoriais do produto final (LIMA et al., 2009).

O queijo Minas artesanal da Serra da Canastra é um dos queijos mais antigos e tradicionais produzidos no Brasil. É uma atividade de geração de renda para um grande número de pequenos agricultores. Sua produção centenária consiste em inocular fermentos endógenos, que são coletados a partir de lotes anteriores, em leite cru recém-coletados, a fim de influenciar o processo de fermentação. Os principais gêneros da partida endógena são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* com contagens de aproximadamente 8 log UFC/mL (BORELLI et al, 2006;. NOBREGA; FERREIRA; DORES, 2008).

O queijo Coalho é fabricado com massa semicozida e tradicionalmente consumido fresco ou maturado. É produzido há mais de 150 anos, em vários Estados da Região Nordeste do Brasil a partir de leite de vaca cru e/ou leite pasteurizado. Antigamente utilizava-se para coagulação do leite o coalho do estômago seco e salgado de animais silvestres ou bezerros. Atualmente, esta prática foi substituída pelo uso de coalho industrial (GONDIM, 1995; LIMA, 1996). Em geral, o formato deste queijo é retangular e o seu peso varia entre 1,0 e 5,0 kg. Trata-se de produto popular e que faz parte da cultura da Região Nordeste. Entretanto, não existe padronização do seu processo de elaboração, sendo comum o emprego de leite cru, o que coloca em risco a saúde do consumidor. A maioria dos queijos Coalho é fabricada em pequenas fazendas rurais e/ou em pequenas queijarias urbanas ou rurais (ESCOBAR, 2001).

3.9 DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO TÍPICO DO SUDOESTE DO PARANÁ

A Associação Bellunesi Nel Mondo da Província de Belluno, Região do Vêneto-Itália firmou convênio de cooperação financeira com a Agência de Desenvolvimento Regional do Sudoeste do Paraná (AGÊNCIA), com sede no município de Francisco Beltrão – PR, para execução do Projeto Rede, visando o fortalecimento da atividade queijeira da região através do Consórcio de Agroindústrias para Produção de Queijos.

Foram ofertados diversos treinamentos, ministrados por um mestre queijeiro italiano, cujo público alvo era atender e qualificar pequenos produtores e laticínios da região. Surgiu a ideia de elaborar um queijo Típico do Sudoeste utilizando um fermento endógeno, o que traria um grande respaldo e *marketing* para região.

A transferência de Tecnologia foi reforçada com a participação da Universidade de Pádua e a parceria firmada pelo Termo de Cooperação Técnica entre a UTFPR (Câmpus Pato Branco, Dois Vizinhos e Francisco Beltrão) e a AGÊNCIA.

Dentre as contrapartidas, a UTFPR disponibilizou profissionais para dar suporte a este Projeto de Extensão e o Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos possui orientações de trabalhos de dissertação de mestrado, o que dará respaldo científico ao projeto e a pesquisa, e contribuindo para etapas futuras, tais como, o Registro do Produto no MAPA, a certificação com IG (Indicação Geográfica) na modalidade de procedência, o que poderá contribuir para valorização do queijo produzido na região, ampliando o mercado até o reconhecimento como a Denominação de Origem Protegida (DOP), o que poderá promover uma importância fundamental como um produto inovador.

O desenvolvimento de um fermento liofilizado composto de culturas de microrganismos nativos do leite de municípios da Mesorregião Sudoeste do Paraná para a elaboração do queijo Típico destaca a produtividade e a inovação dessa região. De acordo com a Embrapa Gado de Leite (2012), a região, forte produtora de leite, apresentou no ano de 2011 com a 8ª maior produção leiteira das principais mesorregiões do país.

A base econômica e social paranaense poderá ser favorecida através da utilização de um fermento endógeno no processo de produção do queijo típico “Santo Giorno” e de outros produtos. O fermento constituirá uma inovação para o Estado do Paraná e para o Brasil que possui uma crescente demanda por leite e derivados lácteos devido ao crescimento populacional e o aumento da produção leiteira. O fermento endógeno é uma alternativa para a elaboração de novos queijos a fim de suprir esse crescimento, melhorar a qualidade dos produtos elaborados e inovar no que diz respeito ao desenvolvimento de um produto com identidade da Mesorregião Sudoeste Paranaense.

3.10 PROBLEMAS RELACIONADOS COM A FABRICAÇÃO DE QUEIJOS

O leite utilizado na fabricação de queijos frescos tem que ser pasteurizado. Já para os queijos maturados, pode-se utilizar o leite cru desde que sejam respeitados os prazos de maturação e utilizadas as boas práticas de fabricação, que incluem desde a exigência de só utilizar leite de alta qualidade até rigorosa higiene no local de produção.

A presença do grupo dos coliformes é um dos principais causadores de estufamento precoce em queijos, caracteriza por numerosas olhaduras irregulares, pequenas e bem distribuídas (FURTADO, 2005).

Deve-se dar uma particular atenção na fabricação de queijos no que diz respeito à contaminação com *Clostridium tyrobutyricum*, bactérias esporuladas que causam estufamento tardio em vários tipos de queijos duros maturados, e essa contaminação pode ser controlada ou mantida baixa com boas práticas higiênicas ou com o uso de nitrato de sódio (NaNO₃), Lisozima ou bactofugação (centrifugação) do leite, prevenindo, assim, o seu desenvolvimento e o aparecimento do defeito (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

3.11 MATURAÇÃO DOS QUEIJOS

Apesar de muitos queijos serem consumidos frescos, existem outros que são curados durante um período compreendido entre 3 semanas a 2 anos. Geralmente, a duração do período de maturação é inversamente proporcional ao teor de umidade do queijo (FOX et al., 2000, 2004).

A maturação consiste em uma série de processos físicos, bioquímicos e microbiológicos que ocorrem em todos os queijos, exceto aqueles que são consumidos frescos. Estes processos alteram a composição química dos queijos, principalmente no que tange a seu conteúdo em açúcares, proteínas e lipídios. O tempo de maturação varia para cada tipo e é neste processo que se desenvolvem as características sensoriais e de textura, características de cada um deles. A maturação dos queijos é feita, na maioria dos casos, em câmaras com controle de temperatura e umidade. O tempo varia de acordo com o tipo, podendo ir de poucas semanas a muitos meses (QUEIJOS NO BRASIL, 2013). Tradicionalmente, o índice de maturação é medido pela degradação de caseína, através da avaliação da proporção entre nitrogênio total e nitrogênio solúvel, assim denominado o nitrogênio oriundo de matéria orgânica. Este índice deve aumentar com o avanço da maturação (PERRY, 2004).

A proteólise e a lipólise são dois processos primários no amadurecimento do queijo, com uma variedade de características físicas, químicas, microbiológicas, mudanças de textura e reológicas que ocorrem em condições ambientais controladas (PARK, 2001).

A proteólise pode ser considerada como dois fenômenos. A proteólise primária representa o grau de desagregação da caseína nativa e é estimada por eletroforese. A

proteólise secundária é uma degradação maior que conduz à formação de peptídeos e aminoácidos livres. A quantidade global destes compostos é mensurada através do fracionamento do nitrogênio e suas proporções pela cromatografia líquida de alta eficiência (BEUVIER; BUCHIN, 2004).

As bactérias do ácido láctico possuem um complexo sistema proteolítico que lhes permite satisfazer as suas exigências de aminoácidos a partir da hidrólise de proteínas do leite. Os peptídeos e aminoácidos liberados contribuem e atuam como precursores, favorecendo o desenvolvimento do sabor nos queijos (BERESFORD; WILLIANS, 2004).

A quebra de caseínas é altamente dependente da variedade do queijo e reflete em diferentes parâmetros de produção (temperatura de cozimento, pH na dessoragem) e diferentes características físico-químicas (pH, umidade, sal) e seus efeitos sobre a atividade de enzimas proteolíticas (BEUVIER; BUCHIN, 2004).

A lipólise em queijos acontece devido à atividade da lipoproteína lipase presente no leite, de lipases ou esterases de bactérias *starter* ou da microbiota nativa. O nível de lipólise e seu impacto na qualidade do queijo depende da variedade do queijo, ele é limitado em queijos tipo Suíço e queijos semi-rígidos, onde um nível mais elevado do que 0,25 - 1,5% (Cheddar), 1,5% (Gouda), 1% (Emmental) e 2% (Comté), é considerado níveis elevados que podem provocar defeitos no sabor, como o desenvolvimento do sabor ranço (BEUVIER; BUCHIN, 2004).

3.12 CONSERVANTES DO QUEIJO

Para evitar os problemas relacionados com o estufamento tardio nos queijos devido a ação do *Clostridium tyrobutyricum* utilizam-se o Nitrato de sódio ou de Potássio e a enzima Lisozima, que é obtida da clara de ovo, e tem a capacidade de hidrolisar polissacarídeos, destruindo a parede celular de bactérias (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2011).

Com a adição de Nitrato de Sódio ou de Potássio nos queijos, o nitrato é reduzido a nitrito pela ação da xantina oxidase, durante a maturação. O nitrito não inibe a ação das bactérias lácticas, mas impede o crescimento *Propionibacterium*, essenciais para a formação de ácido propiônico, responsável pelas olhaduras características de queijos como o Emmenthal e, portanto, não é apropriado para controle de *Clostridium* neles. Além disso, ele pode reagir com aminoácidos aromáticos do queijo, formando nitrosaminas muitas das quais são carcinogênicas. Essa reação, porém, ocorre preferencialmente na faixa entre pH 2,0-4,5 de modo que na maioria dos queijos, onde o pH é mais alto, a formação de nitrosaminas é muito

lenta. A maior parte do nitrato adicionado é eliminado através do lactosoro, ou difunde-se na salmoura, fazendo com que os níveis de nitrito encontrados no queijo pronto para consumo sejam, geralmente, bem menores que 50 mg/kg. Mesmo assim, em alguns países o uso de nitratos na fabricação de queijos é proibido. Além disso, a adição de excesso deste sal pode inibir a microbiota láctea (PERRY, 2004).

O uso de Nitrato de Sódio ou Potássio pode ter resultados irregulares, pois depende muito do pH, teor de sal e umidade do queijo, além do nível de contaminação inicial do leite. Se o queijo possui um pH mais baixo (mais acidez), baixa atividade de água (teor de sal mais alto) além de um potencial de oxidação mais elevado (massa menos compactada ou com maior índice de aerobiose), o uso de oxidantes como o Nitrato de Sódio ou Potássio é bastante efetivo, sobretudo se o leite não possuir uma contaminação muito elevada (menos de 1000 esporos/litro de leite) (FURTADO, 2005).

A enzima lisozima é capaz de destruir a microbiota anaeróbica esporulada sem afetar as culturas propiônicas e lácticas usadas na fabricação de queijos. Apesar de seu considerável custo, este produto tem sido usado, por exemplo, na fabricação do Grana na Itália e do Emmenthal na França, que são dois queijos de maturação longa e muito suscetíveis à fermentação butírica. A lisozima é retida na coalhada (cerca de 90%) onde é muito estável. Calcula-se que 500 unidades de lisozima por mL de leite (cerca de 2,5g/100L) sejam capazes de inibir esporos do gênero *Clostridium* sem afetar o desenvolvimento do fermento láctico. Se a contaminação do leite for muito elevada (mais de 300 esporos/litro segundo observações feitas no queijo Gouda, na Holanda) o uso de lisozima perde muito sua eficiência. Neste caso, recomenda-se que o produto seja usado em conjunto com o Nitrato de Sódio ou Potássio, o que definitivamente aumenta a proteção contra a fermentação butírica, entretanto a lisozima não tem atuação contra as bactérias gram-negativas como, por exemplo, os coliformes (FURTADO, 2005).

3.13 ANÁLISE DE COR EM QUEIJOS

A análise de cor nos alimentos é importante porque ela é um dos principais parâmetros indicadores de qualidade e tem forte influência na aceitação do consumidor.

A cor consiste na percepção visual que resulta da detecção da luz após interação com um objeto e pode variar em três dimensões: tonalidade cromática, luminosidade ou brilho e croma, saturação ou pureza (TUNICK, 2000).

A cor dos alimentos deve-se, principalmente, à presença de pigmentos naturais. Estes pigmentos participam de diferentes reações e, em função disto, a alteração de cor de um alimento é um indicador das alterações químicas e bioquímicas possíveis de ocorrer durante o processamento e estocagem (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004).

Os principais pigmentos responsáveis pela coloração dos queijos são a riboflavina e os carotenóides (MORTENSEN et al., 2004). A cor dos queijos está intimamente ligada à gordura do leite e, por isso mesmo, é sujeita a variações sazonais que são corrigidas pela adição de corantes (PERRY, 2004). A cor dos queijos é influenciada também por fatores como tempo de armazenamento, temperatura e exposição à luz (CHATELAIN et al., 2003; KRISTENSEN et al., 2001).

Os carotenóides, pigmentos secundários envolvidos na fotossíntese, são utilizados como pró-vitamina A e armazenados nos tecidos animais, sendo a cor amarelada dependente do teor absorvido de pigmentos. No caso das vacas, estes pigmentos podem ser transferidos do tecido adiposo para o leite, permitindo que os seus produtos sejam mais amarelos que os de cabra e ovelha, que são mais brancos (FOX; MCSWEENEY, 1998; FOX et al., 2000; FUQUAY et al., 2011).

A avaliação da cor instrumental no interior da pasta e da crosta de um queijo pode ser feita utilizando o sistema de coordenadas L^* , a^* , b^* , definido pela “*Comission Internationale de L'éclairage*” – “*CIE 1976 $L^*a^*b^*$ Uniform Colour Space*”. A coordenada L^* mede a luminosidade, oscilando entre 0 (para o negro) e 100 (para o branco); a coordenada a^* mede as tonalidades vermelha (valores positivos) e verde (valores negativos) e a b^* mede as tonalidades amarela (valores positivos) e azul (valores negativos) como é apresentado na Figura 2 (ALVARENGA, 2000).

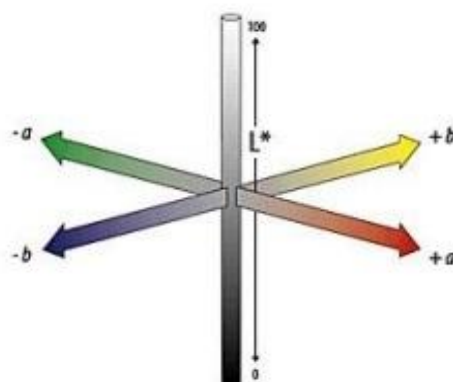


Figura 2 - Coordenadas de cor do Sistema CIELAB.
Fonte - Alvarenga, (2000).

3.14 ANÁLISE DE TEXTURA EM QUEIJOS

A textura é a manifestação sensorial e funcional das propriedades estruturais, mecânicas e superficiais dos alimentos, detectadas pelos sentidos da visão, audição, tato e sinestésicas (SZCZESNIAK, 2002). De acordo com Kluge et al. (2002), textura é o reflexo da sensação produzida nos lábios, língua, mucosa da boca, dentes e ouvidos sendo representada pela dureza, maciez, fibrosidade, granulabilidade, resistência e elasticidade (Quadro 1).

Propriedades Texturais	Definição
Dureza	Força necessária para obter uma dada deformação.
Adesividade	Trabalho necessário para vencer as forças de atração entre a superfície do alimento e as superfícies com as quais este entra em contato.
Coesividade	Forças das ligações internas que definem a estrutura do alimento.
Elasticidade	Capacidade que uma amostra, após deformação, recupera a sua condição inicial quando retirada a força aplicada.
Gomosidade	É considerado um parâmetro secundário obtido a partir dos parâmetros primários: dureza x coesividade .
Mastigabilidade	É considerado um parâmetro secundário obtido a partir dos parâmetros primários: gomosidade x elasticidade

Quadro 1 - Definição das Propriedades Texturais na análise de TPA.

Fonte - Ribeiro (1998), Alvarenga (2000), Machado (2003), Nollet e Toldrá, (2010).

Uma característica importante na qualidade e, conseqüentemente, aceitação de um queijo é a sua textura. Sendo assim, textura da massa pode ser definida como sendo a forma em que estão dispostas as partes que compõem e que, independentemente do seu tamanho lhe conferem características reológicas particulares (ANDREATTA, 2006).

A reologia dos queijos pode ser definida como o estudo da sua deformação e sua fluidez quando sujeita a uma força ou tensão. As propriedades reológicas do queijo são o que determinam a sua resposta ao estresse ou tensão, tal como é aplicado, por exemplo, durante a compressão, cisalhamento ou corte. Na prática, estas pressões e tensões são aplicadas ao queijo durante o processamento. As propriedades reológicas incluem características intrínsecas, tais como a elasticidade, viscosidade e viscoelasticidade, que estão relacionadas principalmente com a composição, estrutura e força de atração entre os elementos estruturais do queijo (CALLAGHAN; GUINEE, 2004).

Vários são os constituintes que influenciam a textura do queijo. Em destaque, considera-se a quantidade de gordura, cálcio, proteínas, mais especificamente a caseína, da matéria-prima e também o pH da massa. O teor de umidade tem efeito determinante, pois quanto mais elevado o teor de umidade da massa, mais macia será sua consistência (TEXTURA, 2002 *apud* ANDREATTA, 2006).

Segundo Cavalcante et al. (2007), no processo de produção do queijo, a espécie predominante na cultura lática e o ponto de corte da coalhada, bem como a maneira que essa é realizada, influencia na textura e no rendimento do queijo.

A perda de cálcio e fosfato da micela de caseína determina a extensão das ligações entre as micelas e isto determina a estrutura básica e textura dos queijos. Em geral, queijos de baixo pH de dessoragem tendem a ter uma textura mais macia, enquanto os de alto pH tendem a ter uma textura mais elástica (FOX et al., 2000; LUCEY; JOHNSON; HORNE, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Leite

Foram coletadas amostras de leites de tanques isotérmicos em 20 laticínios e/ou produtores de alguns municípios da região Sudoeste Paranaense, fornecidos pelos produtores/laticínios (Quadro 2).

Produtor/Laticínio	Município
Laticínio Primo Queijo	Renascença- PR
Laticínio HE	Coronel Vivida-PR
Laticínio Alto Alegre	Verê-PR
Laticínio Tirol	Dois Vizinhos-PR
Laticínio Milkipar	Dois Vizinhos-PR
Laticínio Farbom	Bom Jesus do Sul-PR
Laticínio Festugato	Pato Branco-PR
Laticínio Tafael	Verê-PR
Laticínio Vênето	Marmeleiro-PR
Cepagro Queijos Bodanese	Coronel Vivida-PR
Joel Luiz Lopes	Pato Branco-PR
Gilmar Fortuna	Coronel Vivida-PR
Rogério Raspold	Enéas Marques-PR
Casiano Conte	Chopinzinho-PR
Roseli Capra	Francisco Beltrão-PR
Alziro Civa	Marmeleiro-PR
Aryzone Mendes de Araújo	Dois Vizinhos-PR
Carla Todescatto	Vitorino-PR
Rudinei Klein	Salgado Filho-PR
Enio Klein	Salgado Filho-PR

Quadro 2 - Produtores e Laticínios de onde foram coletadas amostras de leites para análises.

4.1.2 Meios de cultura

Os meios para isolamento das bactérias *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. foram o caldo M17, caldo MRS (Man Rogosa e Sharpe) e Agar Agar, todos da marca HIMEDIA.

4.1.3 Fermento Láctico

O fermento láctico endógeno utilizado foi desenvolvido pela BIOAGRO (Instituto de Qualidade e Tecnologia Agroalimentar) na cidade de Thiene Itália a partir das bactérias

Streptococcus thermophilus e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* isoladas de amostras de leite do sudoeste Paranaense.

4.1.4 Coadjuvantes da produção do queijo

Para promover a coagulação do leite foi utilizado o coalho em pó de Quimosina natural marca ENZIMAX[®] poder coagulante 1:100000 (Enzima de vitelo, Cloreto de sódio e Ácido bórico), os inibidores de *Clostridium* sp. foram o Nitrato de Sódio, marca NICROM[®] e a enzima Lisozima marca DELVOZYME[®]. Para tornar o produto mais atrativo visualmente e diminuir a contaminação por microrganismos foi utilizado como revestimento nos queijos o polímero de Acetato de Polivinila (PVA), da marca GLOBALSYSTEM COAT INCOLOR[®].

4.2 MÉTODOS

As análises de preparação do *lattoinesto*, seleção e isolamento das bactérias, identificação morfológica, microbiologia dos queijos e análises físico-químicas foram desenvolvidas no laboratório LAQUA-UTFPR (Pato Branco – PR); as análises dos leites utilizados na fabricação dos queijos nos laticínios foram realizadas no Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (Curitiba – PR); a análise de *Listeria monocytogenes* foi realizada no Laboratório São Rafael (Pato Branco – PR), as análises de cor, atividade de água e textura no Laboratório da UTFPR (Câmpus Medianeira – PR) e as análises de identificação genética e testes de acidificação no Instituto BIOAGRO (Instituto de Qualidade e Tecnologia Agroalimentar) localizado na cidade de Thiene – Itália. Realizaram-se análises nas amostras de leite para a fabricação dos queijos e nos queijos com 30, 60 e 180 dias de maturação.

4.2.1 Coleta do leite

Foram coletadas amostras de 1 litro de leite de cada produtor/laticínio em frascos estéreis e encaminhados para o laboratório LAQUA em caixas isotérmicas.

4.2.2 Isolamento e identificação das bactérias

Na Figura 3 é apresentado o fluxograma para o isolamento das bactérias *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. e obtenção do fermento endógeno, conforme etapas a seguir.

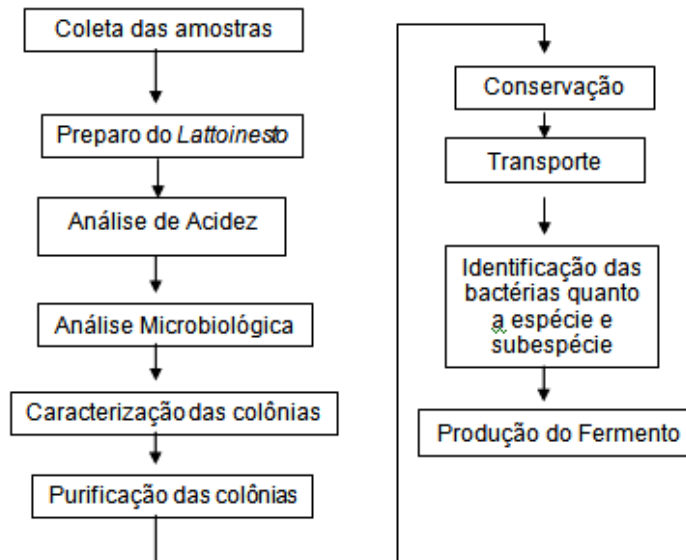


Figura 3 - Fluxograma para o isolamento das bactérias *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. e obtenção do fermento endógeno.

4.2.3 Preparação do Lattoinesto

Após a chegada das amostras no laboratório LAQUA, foi realizada a etapa de preparação do *lattoinesto*.

O *lattoinesto* é uma cultura mãe, ou fermento natural obtido através de um tratamento térmico do leite, esta técnica foi realizada de acordo com o Instituto BIOAGRO-Laboratório de Biotecnologia, onde se visa eliminar os microrganismos mesófilos e reduzir os contaminantes. Desejava-se isolar apenas as bactérias termofílicas, para tanto, foi realizada uma termização na temperatura de 63 °C por 12 minutos com posterior resfriamento à 44 °C.

O *lattoinesto* foi mantido à 44 °C por 12 horas ou até que a acidez medida estivesse entre 22,5-27 °D (Graus Dornic) para a inoculação das amostras de leite nos meios de cultura, o que indica que as bactérias se desenvolveram em boa quantidade e consumiram a lactose do leite formando o ácido láctico (BIOAGRO-LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA, 2012). Para a determinação da acidez o *lattoinesto* foi coletado do frasco controle (1 L do leite foi dividido em dois frascos de 500 mL, sendo um deles o frasco

controle de onde se retiravam amostras para verificação da acidez) da respectiva amostra de leite, 50 mL do *lattoinnesto* com indicador fenolftaleína foi titulado com NaOH 0,100 mol/L até a coloração rosa. Cada 0,1 mL gasto na titulação equivale a 1°D de acidez.

4.2.4 Inoculação e contagem

As bactérias lácticas existentes no *lattoinnesto* foram inoculadas nos meios de cultura seletivos. Em meio MRS acidificado à pH de 5,45, foi inoculado assepticamente 0,1 mL na superfície do agar já solidificado, as diluições 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} em duplicata e espalhadas com o uso de alça de Drigalski até completa absorção do inóculo. As placas foram incubadas à 44 °C em jarra de anaerobiose por 72 horas. Nesse meio de cultura foram isoladas as bactérias lácticas *Lactobacillus* sp. Em meio M17 foi inoculado 0,1 mL das seguintes diluições: M17: 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} em duplicata. O M17 foi incubado em aerobiose a 44 °C por 48 horas. Após incubação, as colônias foram contadas e aquelas que apresentaram características de bactérias lácticas foram submetidas à purificação (BIOAGRO-LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA, 2012).

4.2.5 Purificação das colônias

Foram selecionadas 10 a 12 colônias de cada amostra e com características de serem *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. foram purificadas. Foram realizados 3 repiques de cada colônia em seus respectivos meios de cultura. Para cada colônia escolhida foram realizadas estrias de esgotamento com a colônia escolhida no meio de cultura solidificado. Nos outros dois repiques escolheram-se as colônias terminais de cada esgotamento. O objetivo foi manter as bactérias puras, impedindo o desenvolvimento de outras no meio de cultura em uso e isolá-las para uma melhor identificação (BIOAGRO-LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA, 2012).

4.2.6 Teste da catalase

O teste da catalase baseia-se na detecção da presença da enzima catalase pela decomposição de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, que ocorre na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. Para tanto esse teste foi com a suspensão da colônia em peróxido de hidrogênio, se não ocorrer borbulhamento do peróxido a bactéria é

catalase negativa (SILVA et al., 2010).. Não ocorrendo nenhuma modificação a bactéria foi considerada catalase negativa, as BALs são catalase negativa. (BARROW; FELTHAM, 1993).

4.2.7 Teste de coloração Gram

Esta é uma técnica de diferenciação de microrganismos através da coloração e morfologia (SILVA et al., 2010).

As colônias selecionadas foram fixadas numa placa para microscópio, em seguida foi realizada a coloração com os corantes violeta cristal (corante primário), lugol (mordente), álcool (agente descolorante) e contrastante (fucsina). Após a secagem da placa esta foi observada em microscópio observando-se a morfologia e a coloração. As que se apresentaram como cocos de coloração púrpura confirmou-se como *Streptococcus* sp. e bastonetes também na coloração púrpura confirmou-se como *Lactobacillus* sp. as colônias foram confirmadas como GRAM positivas (BARROW; FELTHAM, 1993).

4.2.8 Conservação das cepas e preparação para o transporte

Após a realização de três purificações, as colônias selecionadas e purificadas foram inseridas em tubos de 2 mL contendo 0,25 mL de um mix de congelamento constituído por Sulfato de Magnésio e Glicerol (20 mM MgSO₄, glicerol 80%) e 0,25 mL de Caldo MRS ou M17 e 0,5 mL de leite em pó reconstituído. Nesta formulação de 1 mL colocou-se uma alçada cheia de 10 µL da colônia purificada. Agitaram-se os microtubos para que as bactérias se homogeneizassem inteiramente com todo mix de congelamento e os tubos foram mantidos a temperatura de -40 °C. As bactérias contidas nos microtubos foram identificadas com números e letras ST de *Streptococcus* (ST 01 a ST 97) e LB de *Lactobacillus* (LB 01 a LB 63) e acondicionadas em caixas suporte para microtubos e mantidas em refrigerador. Em janeiro de 2013 as caixas foram encaminhadas para o Instituto BIOAGRO.

4.2.9 Análise de PCR /RAPD-PCR e sequenciamento genético

A etapa de identificação genética das bactérias lácticas foi realizada utilizando métodos de RAPD-PCR, PCR-espécie específica e sequenciamento genético, nos laboratórios do

Instituto BIOAGRO a fim de confirmar as espécies e subespécies e posteriormente liofilizar as bactérias dando origem ao fermento láctico. A metodologia para o isolamento e caracterização morfológica seguiu o protocolo usado nos laboratórios Agricultura Vêneto e BIOAGRO na Itália: ISO 7889 IDF 117: 2003, *Yogurt Enumeration of characteristic microorganisms-Colony count technique at 37°C*, com modificações para uso em leite e com temperatura de incubação a 44 °C. Para a verificação dos *Enterococcus* nos leites, o protocolo seguido foi *CCFRA Method 2.7.1: 2007 Guideline n.43 5ª ed. 2007. Enumeration of Presumptive Enterococcus Species-Colony Count Technique*.

4.2.10 Revitalização das cepas

As cepas foram revitalizadas pela técnica de estriamento das colônias em placas de petri com os meios de cultura específicos (M17-BioLife® para Estreptococos e MRS-BioLife® para os Lactobacilos) e incubadas à 44 °C por 48 horas em aerobiose para os Estreptococos e 37 °C por 72 horas em anaerobiose para os Lactobacilos.

Após a revitalização, as cepas foram armazenadas em solução de glicerol (80%) e posterior congelamento à -80 °C de acordo com as etapas a seguir:

- a) “Over-night” (o/n) das cepas: uma colônia de cada placa, que teve crescimento, foi inoculada em tubos de ensaio com 10 mL dos caldos específicos (M17 para Estreptococos e MRS para Lactobacilos), deixando-as multiplicar sob temperaturas adequadas por uma noite.
- b) Após esse período, 2 mL de cada tubo foram centrifugados (13200 rpm por 5 minutos) com o objetivo de precipitar as células.
- c) O sobrenadante foi descartado e a massa celular ressuspensa em 0,25 mL do caldo específico (MRS ou M17) juntamente com 0,25 mL do “freezing mix” (20 mM MgSO₄, glicerol 80%), e 0,5 mL de leite em pó desnatado a 10% (BioLife®), esterilizado por autoclavagem à 121 °C por 15 minutos. Depois de homogeneizadas, as cepas foram conservadas à - 80°C (cultura estoque) até a realização das análises de RAPD-PCR e PCR-Espécie- Específica.

4.2.11 Preparação das cepas estoque para as técnicas moleculares

De maneira estéril, uma alçada de cada cultura estoque foi inoculada assepticamente em tubos de 10 mL contendo os caldos específicos (MRS e M17) e incubados “over night” nas temperaturas e condições específicas para cada cepa.

4.2.12 Extração do DNA

De cada cultura obtida na etapa anterior, foram transferidos 2 mL para microtubos, que foram centrifugados e o sobrenadante descartado. A massa celular obtida no processo foi ressuspendida em 500 µL de água estéril. A extração do DNA para o RAPD-PCR foi obtida com o uso de um kit contendo agente lisante Kit MicroLYSIS® (Labogen) que se baseia na utilização de uma solução que contém substâncias capazes de promover a lise celular. Em microtubos, 20 µL da solução lisante foi misturada à 1 µL de cada amostra celular, adicionou-se 1 gota de óleo mineral para evitar a evaporação durante os sucessivos ciclos de desnaturação a altas temperaturas. Os tubos foram acondicionados no termociclador Thermocycler (Eppendorf-MasterCycler Gradient) para promover a lise celular com o seguinte ciclo: 65 °C por 15 minutos; 96 °C por 2 minutos; 65 °C por 4 minutos; 96 °C por 1 minuto; 65 °C por 1 minuto e 96 °C por 30 segundos. Após o término do ciclo, o equipamento mantém a temperatura de 20 °C. Após a finalização do ciclo, se obtém o DNA das células lisadas que podem ser utilizadas diretamente no PCR ou podem ser conservadas a -20 °C para uso futuro.

4.2.13 Técnica de RAPD-PCR (AMPLIFICAÇÃO ALEATÓRIA DO DNA)

Para cada amostra submetida a amplificação de RAPD-PCR, 1 µL do extrato de DNA foi misturado com um “mix” de reagentes em microtubos. Os reagentes utilizados encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do “mix” para RAPD-PCR.

Reagentes	Volume (µL)
Água estéril	19,35
Tampão 10X	2,50
Nucleotídeo (10mM)	0,50
*Primer D11344 (20 µM)	1,25
Enzima Taq DNA Polimerase (5U/ µL)	0,40
Extrato de DNA	1,00

*5' AGT GAA TTC GCG GTC AGA TGC CA3' (Akopyanz et al.; Nucleic Acids Research, 20, 5137-5142 (1992).

Antes de levar os tubos para o termociclador foi adicionado uma gota de óleo mineral em cada tubo.

Para a amplificação, foram efetuados 35 ciclos precedentes a um passo inicial de 94 °C por 2 minutos seguido de um passo final a 72 °C por 2 minutos, seguindo as seguintes condições de amplificação:

- a) Desnaturação 94 °C por 1 minuto;
- b) Anelamento 42 °C por 1 minuto;
- c) Extensão 72 °C por 1,5 minutos.

4.2.14 Análise de eletroforese e geração do perfil eletroforético

Após a reação de amplificação os produtos da RAPD-PCR foram separados mediante eletroforese sobre gel de agarose. O gel de agarose usado na cuba eletrofóretica foi preparado com Agarose Type II-A (Sigma®), em tampão Tris Brometo de Etídio (TBE) 0,5X constituído de 54g de TBE, 27,5 g de ácido Bórico e 20 mL de EDTA 0,5 M a pH 8,0. A concentração final da agarose no gel é igual a 1,5 %, ele foi dissolvido por ebulição em forno micro-ondas. Em seguida foi preparada a cuba eletroforética. Colocou-se os pentes na câmara, vertendo então o gel de agarose. Após a solidificação recobriu-se o gel com o tampão TBE 0,5X e retirou-se os pentes. Verteu-se 8 µL do DNA amplificado e 2 µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, glicerol em água a 30% e xileno cianol 0,25%). Nos dois sulcos das extremidades e no central, foi preenchido com 8 µL de marcador de peso molecular (Marker III + Marker VI, Roche). A câmara eletroforética foi ligada a 110 V por cerca de 3 horas, ao término da corrida o gel foi corado com uma solução colorante *gel-red*. O gel foi fotografado sobre uma película térmica e salvo como Imagem TIFF mediante o programa de Imagem *Image Master VDS* (Amersham).

O perfil eletroforético obtido em formato de foto foi elaborado através do programa Gel Compar versão 4.1, que consiste na comparação dos vários perfis das cepas com aqueles mantidos em um banco de dados do Instituto Bioagro. O programa permitiu agrupar e confrontar os perfis eletroforéticos das cepas analisadas com base num coeficiente, o coeficiente de Pearson, que considera a presença/ausência das bandas de DNA e da sua intensidade. Assim como, o método utilizado de *clustering* é baseado no modelo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*), que permite reagrupar um número grande de perfis eletroforéticos sobre a base de coeficiente de Pearson obtidos.

4.2.15 Identificação dos isolados

Para os diversos *clusters* obtidos da elaboração do RAPD-PCR, foram escolhidos alguns e identificados mediante o PCR Espécie-Específica, ou mediante sequenciamento de DNA.

4.2.16 PCR Espécie-Específica

No caso do *Streptococcus thermophilus* e *S. Macedonicus*, foram realizadas análises PCR Espécie-Específica que permitiram identificar uma região do genoma característico de cada espécie. Neste caso, ao contrário do que acontece no RAPD-PCR, os iniciadores não são aleatórios, mas de sequência conhecida e complementares a cada uma das extremidades do gene a ser amplificado. Foram utilizados os seguintes *primers*:

Para o *Streptococcus thermophilus*: *Primer 1* (ST1): CAC TAT GCT CAG AAT AC e *Primer 2* (ST2): CGA ACA GCA TTG ATG TTA, sob as seguintes condições de amplificação: 30 ciclos de 90 °C/30 segundos + 54 °C/70 segundos + 70 °C/30 segundos (LICK et al., 1996), e para *Streptococcus macedonicus* *Primer 1* (MAC 1): ACT GCG CTG TGG GAA GTC, *Primer 2* (MAC2): CCT TCT CCC GAA GTT ACG sob as seguintes condições de amplificação: 94 °C/3 minutos, 30 ciclos: 94 °C/1 minuto + 58 °C/1 minuto + 72 °C/1 minuto (LOMBARDI et al., 2004). Na Tabela 3 está listada a composição do mix utilizado nessa etapa.

Tabela 3 - Composição do “mix” para PCR- ESPÉCIE-ESPECÍFICA.

Reagentes	Volume (µL)
Água estéril	19,550
Tampão 10X	2,500
Nucleotídeo (10mM)	0,500
<i>Primer 1</i> (20 µM)	0,625
<i>Primer 2</i> (20 µM)	0,625
Enzima Taq DNA Polimerase (5U/ µL)	0,200
Extrato de DNA	1,000

No final da reação do PCR Espécie-Específica foi realizada a eletroforese com o mesmo procedimento descrito no item 4.2.14.

4.2.16 Sequenciamento genético (DNA)

Foi sequenciada a região V1-V3 do DNA-ribossomal 16S (V1F-bis: GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC, V3R: ATT ACC GCG GCT GCT GG) com ciclos de 94 °C/5 minutos, 30 ciclos: 94 °C/30 segundos+ 54 °C/30 segundos+ 72 °C/30 segundos (KLIJN et al.,1991).

As sequências obtidas foram comparadas com o banco de dados de sequencia disponível *on line* “*Ribosomal Database Project*” (<http://rdp.cme.msu.edu/>) ou no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, atribuindo aos diversos isolados a identificação taxonômica quanto a espécie.

A metodologia de obtenção de uma sequência de um fragmento de DNA específico depende das seguintes fases experimentais:

4.2.17 Amplificação do fragmento de DNA via PCR

Essa etapa foi realizada segundo o item 4.2.13.

4.2.18 Purificação do produto de PCR

A purificação do produto de PCR é necessária com o objetivo de eliminar os *primers* e os dNTPs (trifosfatos de desoxinucleotídeos) não utilizados na reação. Foi utilizado o kit ExoSAP-IT (GE Healthcare®), que contém as enzimas exonuclease I + fosfatase alcalina. O processo foi executado em microtubos para PCR misturando 5 µL da reação de PCR com 2 µL da solução do kit ExoSAP-IT®. Os microtubos foram incubados no termociclador com o seguinte ciclo: 37 °C/15 minutos + 80 °C/15 minutos e em seguida 8 °C. O produto purificado pode ser utilizado imediatamente ou armazenada a -20 °C.

4.2.19 Preparação da reação de sequenciamento com um único *primer*

Nesta fase foi preparada a reação de sequenciamento utilizando um único *primer* e uma mistura contendo os dNTPs BigDye®, marcadores fluorescentes. A reação foi preparada com um volume final de 20 µL utilizando os microtubos para PCR conforme listado na Tabela 4.

Tabela 4- Reagentes utilizados para a reação de sequenciamento genético.

Reagentes	Volume (μL)
Água	14,04
5X BigDye Sequenciamento tampão	3,50
Primer	0,16
BigDye Mix v3.1	1,00

Em seguida adicionou-se 1,3 μL do produto purificado (item 4.2.18). A reação de sequenciamento foi realizada de acordo com o seguinte ciclo de reação: 96 °C/1 minuto + 25 ciclos de: 96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos, 60 °C/ 4 minutos, abaixando a temperatura e mantendo a 8 ° C.

O produto da reação pode ser purificado, ou armazenado a -20 °C e purificado posteriormente.

4.2.20 Purificação do produto do sequenciamento

O produto obtido a partir da reação de sequenciamento foi purificado de modo a eliminar os dNTPs (trifosfatos de desoxinucleotídeos) BigDye® não incorporadas na reação. A metodologia utilizada se baseou na purificação por meio do uso de etanol/ EDTA /acetato de sódio, de acordo com as seguintes etapas:

- a) Transferiu-se 20 μL de cada microtubo de PCR para microtubos de 1,5 mL, mantendo-os em papel alumínio para proteger da luz.
- b) Adicionou-se 2 μL de 125 mM EDTA pH 8,0 e 2 μL de Acetato de Sódio 3M/pH 5,6.
- c) Adicionou-se 50 μL de etanol absoluto e agitando os tubos no vórtex.
- d) Deixou-se em temperatura ambiente por 15 minutos.
- e) Centrifugou-se a 13200 rpm x 15 minutos.
- f) Descartou-se o sobrenadante por inversão do tubo, adicionando 100 μL de etanol a 75%.
- g) Centrifugou-se a 13200 rpm x 10 minutos.
- h) Eliminou-se o sobrenadante invertendo o tubo e adicionar 70 μL de etanol a 75%.
- i) Centrifugou-se a 13200 rpm x 10 minutos.
- j) Retirou-se o sobrenadante com uma micropipeta.
- k) Deixou-se secar o sedimento sob uma capela de fluxo laminar por pelo menos 30 minutos.
- l) Centrifugou-se a 13200 rpm x 10 segundos.
- m) Ressuspendeu-se o sedimento em 15 μL de água ultrapura.

4.2.21 Preparação das cepas para sequenciamento

Nesta fase utilizou-se uma placa específica do sequenciador, preenchida com o material obtido após a purificação e submeteu-se ao sequenciador de eletroforese capilar.

Em cada sulco da placa foram adicionados 9 μL de H_2O + 3 μL do sedimento ressuspenso.

Em seguida, a placa foi introduzida no Sequenciador AB3130 seguindo as instruções do equipamento.

4.2.22 Capacidade acidificante das cepas identificadas

Para a avaliação da acidificação das cepas foi utilizada a metodologia descrita por Zanatta e Basso (1992). O teste de acidificação das cepas identificadas foi realizado com o aparelho (MICROS®) que permite a detecção automática do pH durante 16 horas. A análise dos dados, no final do teste, apresentou parâmetros cinéticos, tais como V_m (velocidade máxima, expressa em miliunidades de pH por minuto) e T_M (tempo em minutos).

As cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* que obtiveram melhor desempenho na curva de acidificação foram desenvolvidas em escala num fermentador, e posteriormente liofilizadas para serem utilizadas como fermento láctico.

4.3 PROCESSAMENTO DOS QUEIJOS NOS LATICÍNIOS

O leite utilizado como matéria-prima para a fabricação dos queijos nos laticínios 01 e 02 foi pasteurizado a 72 °C por 20 segundos e amostras do mesmo foram enviadas para o Laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (Curitiba – PR) para a realização de análises físico-químicas e também foram analisados imediatamente através dos equipamentos Ekomilk Analisador Total de Leite CAP LAB® (Laticínio 01) e Milk Analyzer DAIRYSCAN® (Laticínio 02).

Foram desenvolvidos queijos com os fermentos lácticos endógenos em dois laticínios da mesorregião Sudoeste Paranaense, dois dias no laticínio do município de Coronel Vivida-PR e dois dias no laticínio de Renascença-PR. Nestes laticínios, os fermentos desenvolvidos

no Instituto Bioagro, fermento A e fermento B, foram testados para a elaboração do queijo Típico “Santo Giorno”. Os fermentos possuem as mesmas espécies de bactérias lácticas *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, a diferença está na combinação de cepas diferentes, variando-se a capacidade acidificante das mesmas. Os queijos elaborados com os fermentos lácticos endógenos adicionados de Lisozima ou Nitrato de Sódio, cuja função é inibir a microbiota contaminante do gênero *Clostridium* sp. prevenindo o estufamento tardio. Os queijos foram nomeados com siglas de acordo com suas formulações, como pode ser verificado no Quadro 3.

Tipo de formulação	Queijos do Laticínio 1	Queijos do Laticínio 2
Lisozima ¹	PBL1	PBL2
Nitrato de Sódio ²	PAN	PBN
Sem conservantes ³	PA1	PA2

Quadro 3 - Queijos elaborados nos Laticínios identificados de acordo com suas formulações.

1- Leite pasteurizado + lisozima

2- Leite pasteurizado + nitrato de sódio

3- Leite pasteurizado sem conservantes

A- Fermento A

B- Fermento B

4.3.2 Desenvolvimento de protocolo de fabricação do queijo Santo Giorno.

Os experimentos para fabricação do queijo foram realizados de acordo com instruções de um mestre queijeiro italiano, baseado nos conhecimentos técnicos e em ensaios que antecederam o momento de produção, quando foram adotados os procedimentos para o desenvolvimento deste novo produto e estabelecida a variação os ingredientes com o objetivo de avaliar a interação entre os parâmetros e sua influência nas características finais do queijo elaborado, de modo a obter uma formulação adequada às características pretendidas, tais como: queijo de massa compacta, sem a presença e olhaduras.

4.4 ANÁLISES DOS QUEIJOS ELABORADOS

4.4.1 Análises microbiológicas

Foram realizadas análises microbiológicas em duplicata de: *Salmonella* sp., Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus aureus* de acordo com IN 62/2003 (BRASIL, 2003) e SILVA et al. (2010), no laboratório LAQUA-UTFPR-PATO

BRANCO-PR e *Listeria monocytogenes* de acordo com IN 62/2003 (BRASIL, 2003) no laboratório São Rafael-PATO BRANCO -PR, os laudos encontram-se no Apêndice A.

4.4.1.1 *Salmonella* sp.

Foram pesados 25 g de amostra e homogeneizados em 225 mL de água peptonada tamponada a 1% e incubados a 36 °C por 16 a 20 horas. A seguir, foi realizado um enriquecimento seletivo em caldo tetratonato verde brilhante e rappaports vassiliadis, em banho-maria a $41\pm 0,5$ °C por 24 a 30 horas. A partir destes, uma alíquota foi inoculada em placas com ágar BPLS (ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose), placas de ágar XLD (Xilose lisina desoxicolato) e placas de ágar BS (Bismuto sulfito), incubadas a 36 ± 1 °C por 18 a 24 h. O resultado foi expresso como ausência ou presença em 25 g (BRASIL, 2003).

4.4.1.2 Coliformes Totais e Termotolerantes

Primeiramente, foi utilizado o método Agar cristal violeta vermelho neutro bile (VRBA) 2% lactose, com temperatura de incubação de 36 ± 1 °C pelo período de 24 a 48 h e posterior contagem das colônias. O resultado foi expresso em UFC/g (BRASIL, 2003).

4.4.1.3 *Listeria monocytogenes*

A análise de *Listeria monocytogenes* foi realizada utilizando o enriquecimento seletivo em duas etapas, a primeira em caldo UVM, e a segunda em caldo Fraser, esta etapa tem a finalidade de inibir a microbiota acompanhante, permitindo a recuperação de baixos números de células de *Listeria* sp. A próxima etapa realizada foi a seleção e isolamento no ágar Oxford, ágar Palcam e ágar triptose com ácido nalidíxico. No ágar Palcam observou-se não fermentação do manitol e a formação de esculetina pela hidrólise da esculina, reação revelada pela presença de ferro trivalente. No ágar Oxford as colônias de *Listeria* sp. apresentam-se pretas, rodeadas por um halo negro devido à hidrólise da esculina. A confirmação bioquímica da *Listeria* sp. realizou-se por meio da verificação da produção de catalase, observação das características morfológicas e tintoriais, verificação do crescimento típico em meio semi-sólido e, adicionalmente, por meio da investigação da incapacidade de redução de nitrato e verificação da positividade nas reações de Vermelho de Metila e VA Proskauer (VM-VP). A identificação de *Listeria monocytogenes* foi realizada pela diferenciação em relação à produção de *â-hemólise* em ágar sangue de cobaio ou ágar sangue de carneiro, verificação da

capacidade de produzir reação de CAMP positiva com *S. aureus* e verificação da capacidade de fermentação dos carboidratos ramnose, xilose e manitol. O resultado foi expresso como ausência ou presença em 25 g (BRASIL, 2003).

4.4.1.4 Staphylococcus aureus

A análise de Estafilococos coagulase positiva foi desenvolvida utilizando-se Agar Baird-Parker. As diluições foram inoculadas superficialmente nas placas e incubadas invertidas a 36 °C por 30 a 48 horas. Passado o período de incubação foram realizadas as contagens sendo o resultado expresso em UFC/g (BRASIL, 2003).

4.4.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata e consistiram na determinação de Umidade, Atividade de Água (A_w), teor de Gordura, teor de Proteína, Cinzas, Carboidratos, Extrato Seco Total (EST), Gordura no Extrato Seco de acordo com (PEREIRA et al., 2001) e Calorias segundo (TAGLE, 1981). As demais análises foram realizadas de acordo com o que é descrito nas Normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008) e IN 68/2006 (BRASIL, 2006), no laboratório LAQUA da UTFPR de Pato Branco-PR e a A_w realizada instrumentalmente no Laboratório da UTFPR de Medianeira-PR.

4.4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pela perda de massa em condições nas quais, água e substâncias voláteis são removidas. O cálculo foi realizado segundo a equação 1.

$$\% \text{ umidade e voláteis} = 100 \times m / m' \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

m = perda de massa em gramas;

m' = massa da amostra em gramas.

4.4.2.2 Atividade de Água (A_w)

A determinação foi realizada instrumentalmente mediante o uso de um medidor atividade de água da marca AQUALAB 4TE. A amostra cortada em pedaços cilíndricos era colocada no compartimento e fechada. Após aproximadamente 5 minutos o visor do equipamento fornecia o resultado.

4.4.2.3 Gordura

A análise de gordura dos queijos foi realizada em butirômetro de Gerber para leite. Esta análise baseia-se no ataque seletivo da matéria orgânica por meio de ácido sulfúrico, com exceção da gordura que será separada por centrifugação, auxiliada pelo álcool amílico, que modifica a tensão superficial.

O método baseia-se na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico. A separação da gordura ocorre por centrifugação (diferença de densidade) com velocidade de 800 a 1220 rpm. O volume de gordura obtido diretamente, pois o componente mais leve (gordura) se acumula na parte superior do butirômetro, isto é, na haste graduada do mesmo. Em seguida faz-se o cálculo da porcentagem de gordura como pode ser verificado na Equação 2, (IAL, 2008).

$$\text{Lipídios} = \text{VL} \times 11,33 / \text{P} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

VL= valor lido na escala do butirômetro

11,33= equivalente em peso de 11 mL de leite

P= Peso da amostra

4.4.2.4 Proteína

Este método fundamenta-se na determinação de nitrogênio orgânico total considerando que as proteínas alimentares apresentam em média 16% de nitrogênio. O método consiste em digestões ácidas e básicas onde o nitrogênio é transformado em sal de amônia. Posterior ao tempo de digestão, e resfriamento, as amostras são destiladas com NaOH (40 %) e com indicador ácido bórico. Posterior à destilação, as amostras são tituladas com ácido sulfúrico 0,1 M (coloração rosa). O conteúdo de nitrogênio obtido é convertido em proteína por meio de fator de conversão 6,38 (IAL, 2008), conforme a Equação 3 abaixo:

$$\% \text{ de proteína} = (A-B) \times f \times 0,1 \times 0,014 \times 6,38 / P \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

A = volume gasto em mL do titulante para titular a amostra

B = volume gasto em mL do titulante para titular o branco

f = fator de correção do ácido sulfúrico 0,1 N

P = peso da amostra em gramas

4.4.2.5 Cinzas

A determinação do teor de cinzas ou resíduo mineral fixo fundamenta-se na eliminação da matéria orgânica a temperatura de 550 °C. O produto obtido é denominado de resíduo mineral fixo. (BRASIL, 2006). Em seguida a porcentagem de cinzas das amostras foi calculada pela Equação 4:

$$\% \text{ cinzas} = (m_2 - m_1) \times 100 / m_0 \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

m₂ = massa do cadinho com amostra após incineração, em gramas;

m₁ = massa do cadinho vazio, em gramas;

m₀ = massa da amostra, em gramas.

4.4.2.6 Carboidratos

A quantificação dos carboidratos foi determinada através de cálculo por diferença (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) de acordo com a Equação 5.

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\text{Umidade} + \text{Proteínas} + \text{Cinzas} + \text{Lipídios}) \quad (\text{Equação 5})$$

4.4.2.7 Extrato Seco Total (EST)

O teor de extrato seco total foi obtido através da Equação 6 (BRASIL, 2006).

$$\text{Extrato Seco Total (\%)} = 100 - (\%) \text{ Umidade} \quad (\text{Equação 6})$$

4.4.2.8 Gordura no Extrato Seco (GES)

A determinação do teor de gordura no extrato seco foi realizada de modo indireto, por meio da razão entre o teor de gordura e o teor de extrato seco total do queijo, conforme a Equação 7 (PEREIRA et al., 2001).

$$\% \text{ GES} = \% \text{ L} / \% \text{ EST} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

% GES: teor de gordura no extrato seco, em % (m/m);

%L: teor de lipídios da amostra em % (m/m);

%EST: teor de extrato seco total da amostra em % (m/m)

4.4.2.9 Calorias

O valor calórico foi obtido através da Equação 8, pela somatória dos teores de carboidratos e proteínas, multiplicados por quatro, e de Lipídios, multiplicados por nove, de acordo com os coeficientes de Atwater (TAGLE, 1981).

$$\text{Valor calórico (Kcal/100g)} = (\text{Proteína} \times 4) + (\text{Carboidratos} \times 4) + (\text{Lipídios} \times 9) \quad (\text{Equação 8})$$

4.4.3 Inspeção visual

A inspeção visual constou da observação dos queijos pela equipe formada pelo queijeiro italiano, professores e pesquisadores da existência ou não de olhaduras, grânulos ou cristais no interior do queijo, rugosidade superficial, etc. Os queijos desenvolvidos deverão apresentar pequenas olhaduras de aproximadamente 0,1 - 0,2 cm.

4.4.4 Análise sensorial

Realizaram-se análises sensoriais dos queijos com 60 e 180 dias de maturação com 80 provadores não treinados em salas de aula da UTFPR Câmpus Pato Branco-PR, utilizando escala de 5 pontos, com notas variando de Desgostei muito (1), Desgostei (2), Nem desgostei, nem gostei (3), Gostei (4) e Gostei muito (5) (DUTKOSKY, 2007). Visando verificar a aceitação dos queijos formulados, 80 provadores não treinados participaram das análises

sensoriais ocorridas em 18/09/2013 e 07/02/2014, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná Câmpus Pato Branco. A pesquisa foi aplicada após testes microbiológicos que garantiram a segurança alimentar dos julgadores.

Os atributos sensoriais avaliados foram: cor, aparência, cheiro, textura, sabor. O provador recebia a ficha de avaliação, as seis amostras e um copo com água a fim de ingerir entre uma amostra e outra. Ainda, na mesma ficha constava um campo destinado à intenção de compra do provador, com quatro pontos: não compraria, talvez compraria, compraria e com certeza compraria. A frequência de consumo de queijos também foi pesquisada na análise sensorial, sendo que o provador deveria informar se o realizava todos os dias, uma vez por semana, mais de uma vez por semana, uma vez por mês ou não consumia este tipo de alimento. As fichas utilizadas para a análise sensorial encontram-se no Apêndice B. Após a avaliação das notas atribuídas no teste de aceitação foi calculado o Índice de aceitação (IA) que relaciona a nota média do atributo avaliado com a nota mais alta da escala (TEIXEIRA; MEINERT; BARBETTA, 1987), utilizando a Equação 9.

$$IA = \text{Nota média obtida para o produto} / \text{Nota máxima da escala} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

4.4.5 Análise de cor

A análise da cor foi realizada no laboratório da UTFPR de Medianeira PR, mediante o uso de colorímetro, marca Konica Minolta, Modelo Chroma Meter CR onde foram fornecidas as coordenadas L^* , a^* e b^* , onde L^* define luminosidade (0 - 100), a^* mede a intensidade do verde/vermelho e b^* a intensidade azul/amarelo. O equipamento é colocado sobre a amostra e através do visor foi possível obter as coordenadas L^* , a^* e b^* . A medida da cor foi determinada na parte interna das peças de queijo, imediatamente após a retirada da embalagem e corte em metades. Foram realizadas três medições da cor com o aparelho previamente calibrado e obtida a média para cada um dos parâmetros. Posteriormente foi realizada a avaliação da diferença existente entre as cores dos queijos através da Equação 10.

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2} \quad (\text{Equação 10})$$

4.4.6 Análise de textura

O perfil instrumental de textura foi determinado no laboratório da UTFPR de Medianeira PR, determinado mediante o uso de um texturômetro *TAXT Express marca Stable Micro Systems*®. Os parâmetros definidos para esta análise foram: perfil de textura em modo de compressão; velocidade pré-teste: 1,0 mm/s; velocidade de teste: 2,0 mm/s; velocidade de pós-teste: 2,0 mm/s; 45 % de compressão e um período de repouso de 5 segundos entre os dois ciclos; força de gatilho 1,0 N, e taxa de aquisição de dados de 200 pontos por segundo (NORTE, 2010). Para se obter uma boa estimativa de textura dos queijos foram realizadas 8 replicatas realizando posteriormente a média dos resultados. A programação do experimento e a coleta de dados foram realizadas por meio do programa computacional *Texture Expert for Windows 1.20*®. Os parâmetros analisados foram: dureza, adesividade, coesividade, elasticidade, mastigabilidade.

4.4.7 Análise estatística

O conjunto de dados correspondentes às variáveis dependentes (variáveis respostas) foi submetido à análise de homogeneidade de variância pelo teste de Cochran C e análise de normalidade de dados pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis dependentes que apresentaram homocedasticidade entre suas variâncias foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados da caracterização físico-química dos queijos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), ao teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Foram realizadas também neste conjunto de dados, análises estatísticas multivariadas: Análise de componentes principais (ACP) e Análise de Agrupamentos (*Clusters*). Para as análises de Agrupamentos e de ACP, os dados foram previamente normalizados através da função *Standardize* do software utilizado. Também foram realizadas análises de Regressão Logística Multinomial avaliando-se o efeito dos hábitos de consumo na avaliação hedônica dos queijos Santo Giorno e Análise Discriminante relacionando os resultados físico-químicos, cor e textura para determinar o que diferenciava cada queijo. Todas as análises estatísticas foram realizadas *pelo software Statistica*® versão 12.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS NAS AMOSTRAS DE LEITE

Das 20 amostras de leite coletados de laticínios, queijarias e produtores individuais, para o isolamento das cepas de bactérias, 14 amostras desses produtores apresentaram resultados satisfatórios em relação à contagem, as outras amostras que não apresentaram contagens satisfatórias ou que apresentaram o desenvolvimento das bactérias foram descartadas (Tabela 5).

Tabela 5– Resultado da acidez do *Lattoinesto* e contagem de *Streptococcus* sp. e *Lactobacillus* sp. das amostras com resultado satisfatório.

Amostras	Acidez °D*	Contagem de <i>Streptococcus</i> sp. UFC/mL **	Contagem de <i>Lactobacillus</i> sp. UFC/mL**
1	27	1,9x10 ⁸	>1,0x10 ³
2	22	8,4x10 ⁷	4,9x10 ³
3	46	8,9x10 ⁸	3,0x10 ⁶
4	26	3,6x10 ⁷	4,6x10 ³
5	15	4,7x10 ⁷	>1,0x10 ³
6	34	9,8x10 ⁷	9,4x10 ⁴
7	41	3,5x10 ⁸	1,8x10 ⁵
8	33	3,0x10 ⁸	1,7x10 ⁵
9	30	1,7x10 ⁹	B
10	42	2,2x10 ⁸	B
11	29	1,4x10 ⁶	B
12	20	A	2,5x10 ⁶
13	35	A	2,0x10 ⁶
14	27	A	1,6x10 ⁶

*° D= Graus Dornic.

**UFC/mL= Unidades formadoras de colônia por mL.

A= Análise não realizada por já ter obtido um número de isolados suficientes.

B= Não ocorreu crescimento de colônias.

5.2 IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

As colônias de bactérias isoladas e inicialmente consideradas como *Lactobacillus* sp. e *Streptococcus* sp. foram identificadas geneticamente de acordo com a espécie e subespécie no Instituto Bioagro na cidade de Thiene, província de Belluno Itália. A partir dos dendogramas obtidos das análises de RAPD-PCR e PCR-ESPÉCIE ESPECÍFICA as cepas que apresentaram-se mais semelhantes a *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* em relação à forma e coloração dos *clusters* foram posteriormente encaminhadas para a análise da atividade acidificante.

Os resultados encontrados neste trabalho demonstraram que a metodologia utilizada para o isolamento, extração, amplificação, purificação e sequenciamento das bactérias

isoladas do leite foi eficiente. A utilização dos métodos citados permitiu a identificação de bactérias presentes no ambiente e possibilitou a formulação do fermento, como também permitirá o desenvolvimento de trabalhos que visem compreender a contribuição desses microrganismos para a qualidade sensorial dos queijos regionais.

O isolamento de culturas puras de bactérias que vivem na natureza é muito difícil, dada a dependência das espécies umas das outras para o seu crescimento, nomeadamente de nutrientes, nomeadamente, de nutrientes que são liberados no meio como seu metabolismo (BISCAIA et al. 2004).

5.2.1 Identificação de *Streptococcus thermophilus*

Na Figura 4 observa-se o dendograma da elaboração dos perfis de RAPD-PCR de cepas de *Streptococcus* sp. isoladas da empresa/laticínio Vênetto.

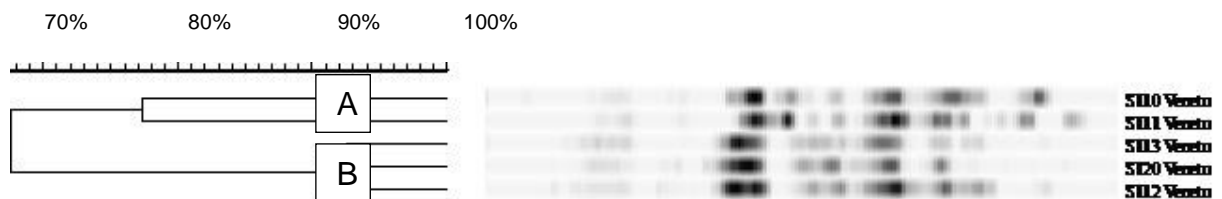


Figura 4- Dendograma derivado da elaboração de perfis de RAPD-PCR de cepas de *Streptococcus* sp. isoladas do Vênetto.

As estirpes 111 (grupo A) e 120 (grupo B) com base em ensaios de PCR específicos não são *Streptococcus thermophilus* ou *Streptococcus macedonicus*. A cepa S120 foi, no entanto, identificada por sequenciamento como *Streptococcus lutetiensis* /*infantarius*.

A Figura 5 apresenta o dendograma derivado do perfil RAPD-PCR das estirpes de *Streptococcus* sp. isolados da empresa/laticínio Farbom.

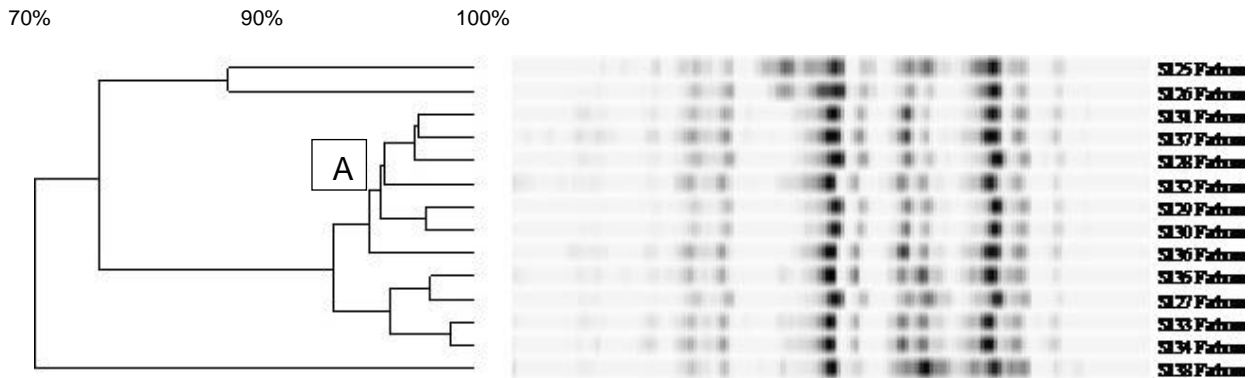


Figura 5- Dendograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR das cepas de *Streptococcus* sp. isoladas pelo Farbom.

As estirpes incluídas no grupo indicado com a letra A são pertencentes à espécie *Streptococcus thermophilus*, pois a estirpe S128 foi identificada como *S. thermophilus* através da PCR Espécie Específica e estes apresentaram o mesmo formato e coloração dos outros *clusters*, pertencendo, portanto, à mesma espécie.

A Figura 6 apresenta o dendograma derivado da elaboração dos perfis de RAPD-PCR de cepas de *Streptococcus* sp. isolados da empresa/laticínio Primo Queijo.

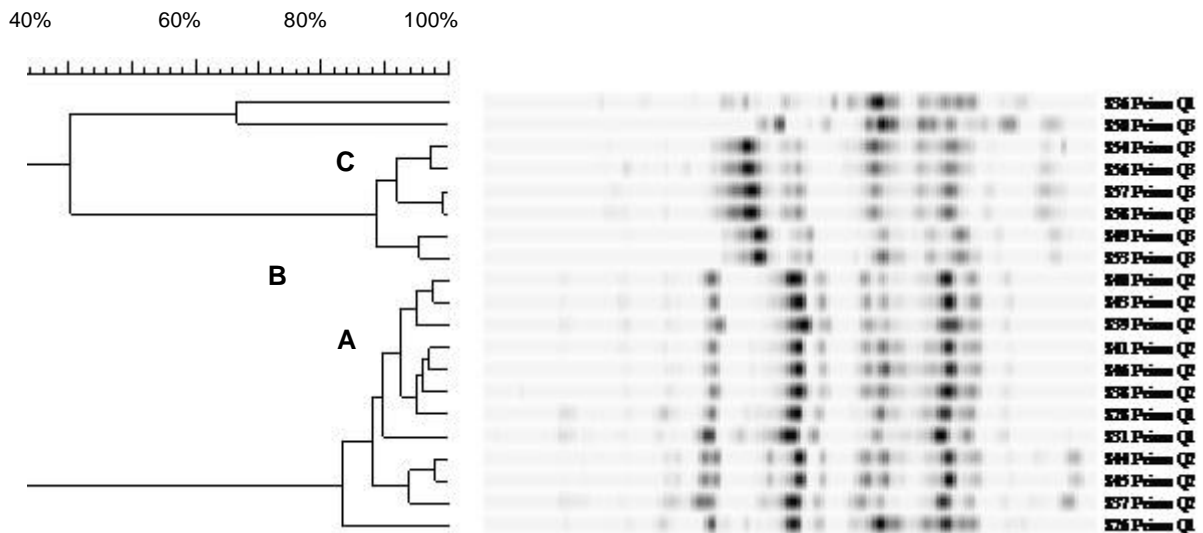


Figura 6 - Dendograma derivado da elaboração de perfis de RAPD-PCR de cepas de *Streptococcus* sp. isolados da empresa/laticínio Primo Queijo.

As cepas incluídas no grupo indicado com a letra A são pertencentes à espécie *Streptococcus thermophilus*, pois são semelhantes à estirpe S46 que foi identificada como *S. thermophilus* através da PCR Espécie Específica. Em relação ao grupo B, supõe-se que pertencem à estirpe de *S. macedonicus*, pois são semelhantes à estirpe S53 que foi confirmada para *S. macedonicus* através da PCR Espécie Específica.

Com base nos resultados da PCR Específica a estirpe S50 do grupo C pertence à *S. macedonicus*, enquanto que, com base nos dados da PCR Espécie Específica, a estirpe S36 do grupo C não pertence a *S. thermophilus*, nem a *S. macedonicus*.

Além de *S. thermophilus*, outros *Streptococcus* lácteos têm sido descritos em pesquisas. O *Streptococcus macedonicus*, originalmente isolado de Kasseri, queijo grego tradicional de origem protegida (DOP) (TSAKALIDOU et al., 1998), tem sido encontrado em muitas variedades de queijos (macio, semi-duro e duro). Esta espécie é comumente encontrada nos países do Sul da Europa como a Grécia (GEORGALAKI et al., 2009), Itália (LOMBARDI et al., 2004; PACINI et al., 2006; APONTE et al., 2008) e França (CALLON et al., 2004). Além disso, o *S. macedonicus* também tem sido encontrado em Pozol, uma bebida mexicana fermentada de milho (DIAZ-RUIZ et al., 2003).

Vários estudos mostraram que o *S. macedonicus* possui propriedades multifuncionais, que podem ser exploradas na indústria alimentícia. Atividade de peptidase (GEORGALAKI et al., 2000; LOMBARDI et al., 2004) e de produção de exopolissacarídeos (VINCENT et al., 2001) são incluídas nas propriedades tecnológicas interessantes de *S. macedonicus*.

A princípio, as bactérias encontradas e identificadas como *S. macedonicus* neste estudo, não serão utilizadas para compor o fermento endógeno, porém as cepas ficarão armazenadas no laboratório do Instituto Bioagro para que futuramente se desenvolvam novas pesquisas incluindo essas cepas.

A Figura 7 apresenta o dendograma derivado dos perfis de RAPD-PCR de estirpes de *Streptococcus* sp. isolados da empresa/laticínio Tirol.



Figura 7 - Dendograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR de cepas de *Streptococcus* sp. isoladas da empresa/laticínio Tirol.

As duas estirpes S63 e S69 não pertencem à espécie *S. thermophilus* nem a espécie *S. macedonicus*.

A Figura 8 mostra o dendograma derivado da elaboração dos perfis RAPD-PCR das estirpes de *Streptococcus* sp. isoladas do leite dos produtores Rudinei e Enio Klein.



Figura 8 - Dendrograma derivado da elaboração de perfis RAPD-PCR das cepas de *Streptococcus* sp. isolados do leite dos produtores Rudinei e Enio Klein.

A estirpe S141 foi identificada por sequenciação genética como *S. lutetiensis/infantarius*.

A Figura 9 apresenta o dendrograma derivado da elaboração dos perfis RAPD-PCR das estirpes de *Streptococcus* sp. isolados da empresa/laticínio Milkipar.

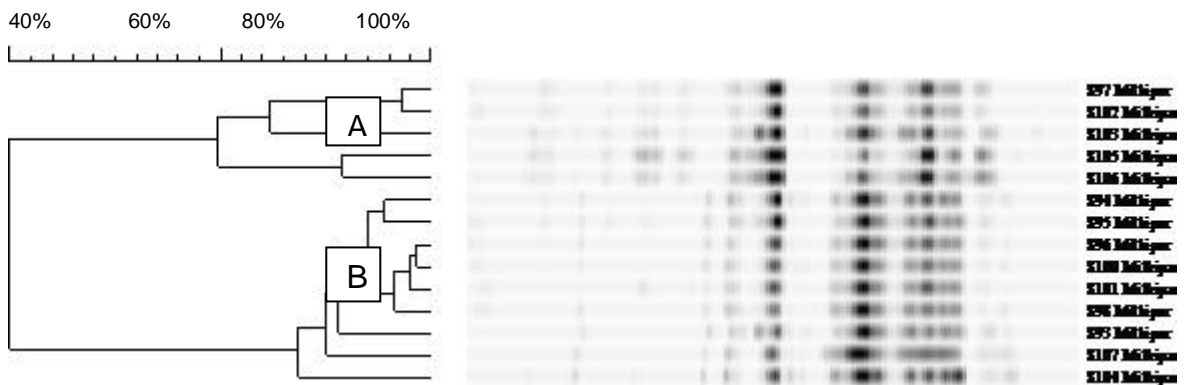


Figura 9 - Dendrograma derivado da elaboração dos perfis RAPD-PCR das cepas de *Streptococcus* sp. isolados pelo Milkipar.

As estirpes incluídas nos grupos A e B correspondem à espécie *S. thermophilus*, pois nos ensaios de PCR Espécie Específica foram confirmadas como *S. thermophilus* as estirpes S102 (grupo A) e S100 (grupo B).

A Tabela 6 traz os resultados das identificações das cepas de *Streptococcus* sp. de acordo com os resultados da PCR Espécie Específica.

Tabela 6 - Cepas de Estreptococos com os resultados dos ensaios de PCR Espécie Específica.

Cepas analisadas (*S)	Resultado de PCR Específica para <i>S. thermophilus</i>	Resultado PCR Específica para <i>S. macedonicus</i>
S36	/	/
S46	+	-
S50	-	+
S53	-	+
S63	/	/
S100	+	-
S102	+	-
S111	/	/
S120	/	/
S128	+	-
S141	/	/

*S = *Streptococcus* sp., + = Confirmado, - = Não confirmado, / = Nenhuma confirmação.

A seguir apresenta-se a Tabela 7 com o resultado da análise de Sequenciamento Genético das cepas de *Streptococcus* sp. que foram identificadas como *Streptococcus lutetiensis* ou *infantarius*, as demais não foram identificadas ou confirmadas.

Tabela 7 - Cepas de *Streptococcus* sp. resultado da análise de Sequenciamento Genético.

Cepas (*S)	Espécie
S120	<i>S. lutetiensis/infantarius</i>
S141	<i>S. lutetiensis/infantarius</i>

*S = *Streptococcus* sp.

A Figura 10 mostra o dendograma das cepas de *Streptococcus* sp. com informações obtidas de todas as investigações moleculares realizadas.

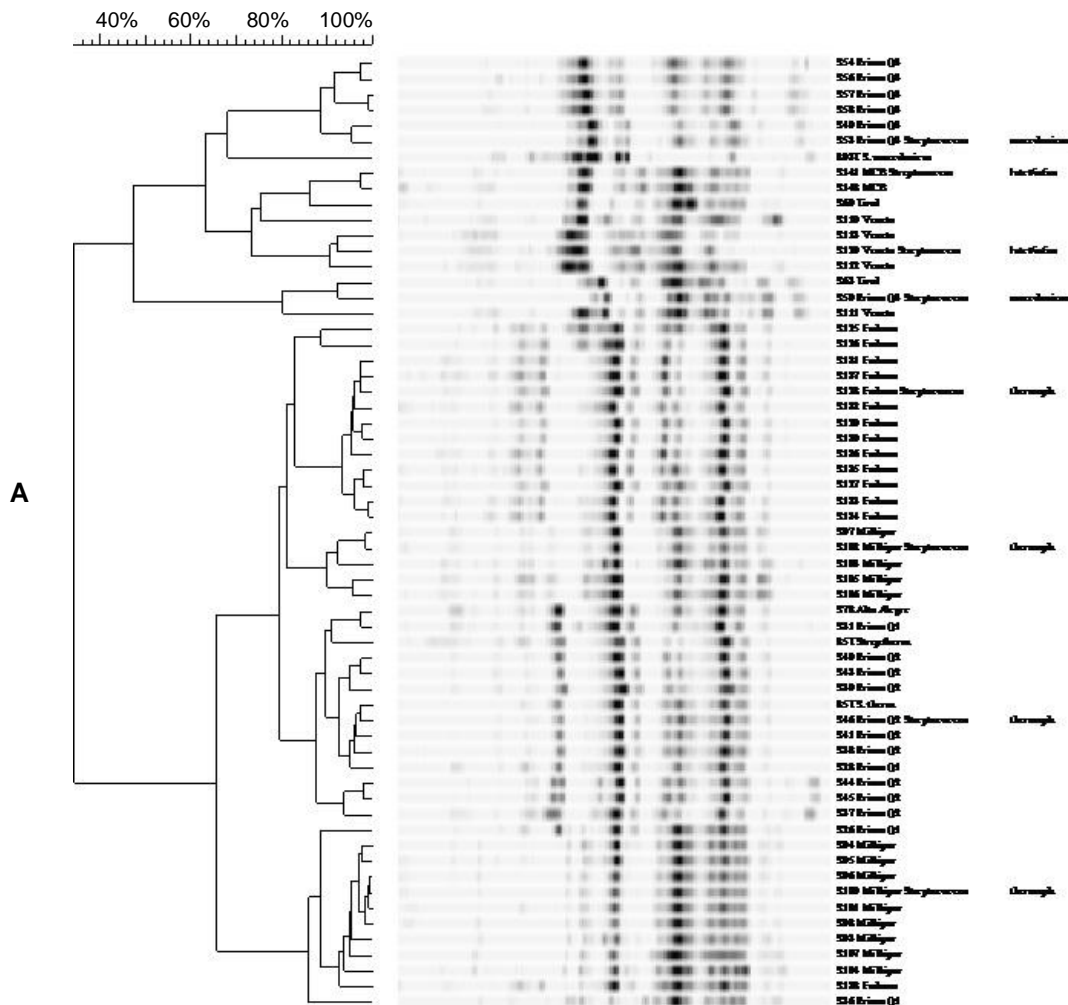


Figura 10 - Dendrograma em relação ao total de *Streptococcus* sp. O grupo indicado com a letra A é composto por estirpes de *S. thermophilus*.

Em estudos sobre a microbiota endógena de queijos coalho produzidos na região do Ceará, Carvalho et al. (2005) isolaram da maioria dos queijos analisados as espécies do

gênero *Enterococcus* e *Streptococcus*, gêneros que são predominantes como bactérias endógenas do leite daquela região.

Em outro estudo, Carvalho (2007), isolou BAL de queijos Coalho artesanais do Ceará com prevalência das espécies de *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei* sp. *paracasei*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus lactis* sp. *lactis*.

5.2.2 Identificação de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*

Através dos perfis derivados de RAPD-PCR e posterior análise de Sequenciamento Genético, verificou-se a presença de espécies de *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. A Tabela 8 mostra o resultado de identificação dos Lactobacilos após Sequenciamento Genético.

Tabela 8- Cepas de Lactobacilos sp. obtidas pelo Sequenciamento Genético.

Cepa*	Espécie
Lb1	<i>L. fermentum</i>
Lb2	<i>L. fermentum</i>
Lb9	<i>L. fermentum</i>
Lb25	<i>L. fermentum</i>
Lb30	<i>L. fermentum</i>
Lb32	<i>L. fermentum</i>
Lb33	<i>L. delbrueckii</i>
Lb58	<i>L. fermentum</i>
Lb62	<i>L. helveticus</i>
Lb66	<i>L. fermentum</i>
Lb77	<i>L. fermentum</i>
Lb118	<i>L. fermentum</i>
Lb120	<i>L. helveticus</i>
Lb134	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Lb139	<i>L. rhamnosus/casei</i>
Lb140	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

*Lb = *Lactobacillus* sp.

Os resultados indicam a prevalência de estirpes de *Lactobacillus fermentum*, uma espécie de Lactobacilos termofílicos caracterizada pelo metabolismo heterofermentativo e, por conseguinte, não é viável para a formulação do fermento endógeno, pois haveria formação de grandes olhaduras, o que não era o objetivo da pesquisa. Há também as estirpes de *Lactobacillus helveticus* e algumas estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*, as quais foram utilizadas para a elaboração do fermento endógeno liofilizado, juntamente com *Streptococcus thermophilus*.

Estudo realizado por Lima et al. (2009) analisou-se amostras de leite, soro fermentado (pingo), coalhada e queijo frescal de fazendas da Serra do Salitre – MG e verificou-se que as espécies *Lactococcus lactis*, *Enterococcus* sp., *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus*

agalactiae foram as espécies isoladas em todas as amostras coletadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Cavalcante et al. (2003) em amostras de leite bovino usado para a fabricação de queijo de coalho da região do Vale do Jaguaribe, no Ceará. Nesse estudo foram encontradas espécies de *Lactobacillus fermentum*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. rhamnosus/casei* e *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus infantarius* e *Streptococcus lutetiensis*, o que aponta para a variação das espécies de acordo com a região, ocasionadas principalmente pela diferença no clima e vegetação e alimentação fornecida aos animais.

5.3 ATIVIDADE ACIDIFICANTE DAS BACTÉRIAS LÁTICAS

A Figura 11 apresenta as curvas de acidificação relacionadas com as cepas de *S. thermophilus* isoladas. As cepas de *Streptococcus thermophilus* que apresentaram atividade acidificante com redução do pH para aproximadamente 5,2 em menor intervalo de tempo no período de incubação de 16 horas, foram escolhidas para a elaboração do fermento endógeno.

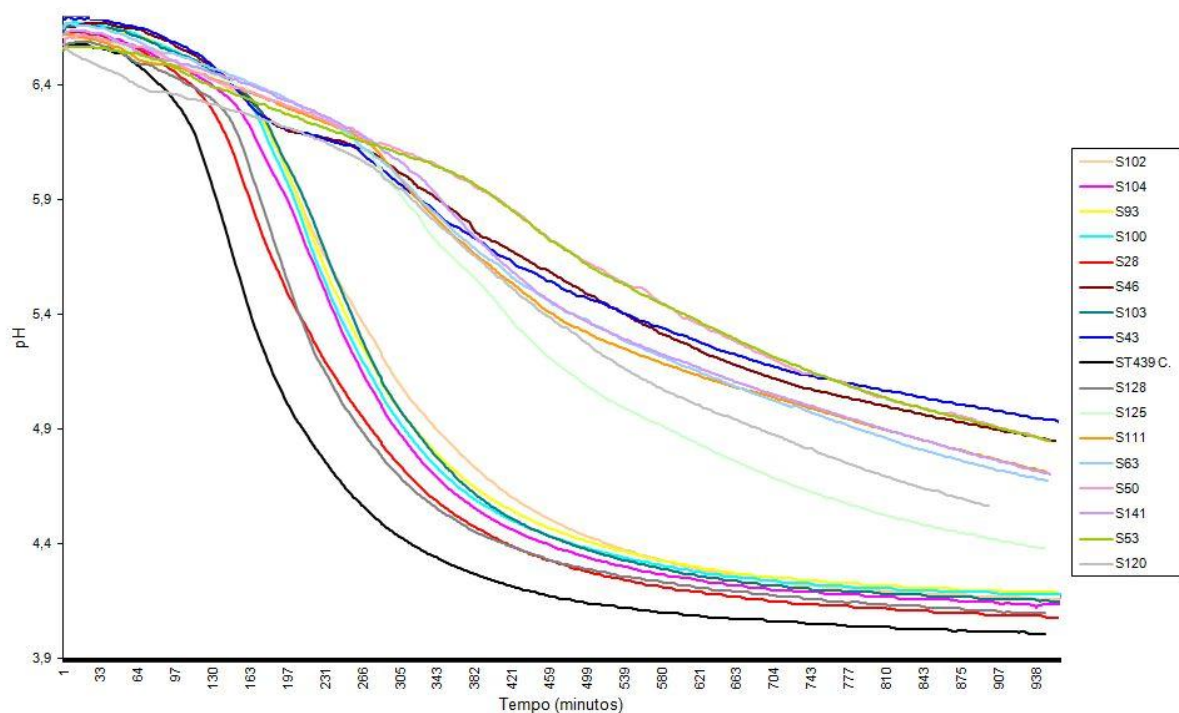


Figura 11 - Curva de acidificação das estirpes de *Streptococcus thermophilus* em leite desnatado reconstituído (LDR) observada através do declínio do pH durante 16 horas de incubação.

A cepa padrão do Instituto Bioagro que foi utilizada está representada pela coloração preta (ST439C). Observou-se que as cepas com um decréscimo rápido de pH para

aproximadamente 5,2 em menor tempo, foram as cepas S28 (vermelha), S104 (rosa), S128 (cinza). Essas cepas foram selecionadas para a formação do fermento láctico endógeno, pois apresentaram maior atividade acificante em relação às outras cepas testadas, sendo mais rápidas na produção de ácido láctico e conseqüentemente mais rápidas na queda do pH. A Tabela 9 apresenta o tempo de coagulação dos leites LDR com as cepas que foram submetidas ao teste de acidificação.

Tabela 9 - Tempo de coagulação das cepas de *S. thermophilus* em leite desnatado reconstituído.

Cepa*	Tempo (minutos)
S28	160
S103	180
S100	180
S102	255
S104	270
S43	310
S46	310
S36	**
S125	150
S111	150
S120	150
S63	150
S141	150
S50	180
S128	180
S53	240
***ST439C.	210

*S = *Streptococcus thermophilus*

** = Não coagulou.

***ST439C = Cepa Padrão de *Streptococcus thermophilus*

A Figura 12 apresenta as curvas de acidificação das bactérias *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. As cepas que obtiveram as melhores curvas de decaimento do pH foram selecionadas para a formulação do fermento endógeno.

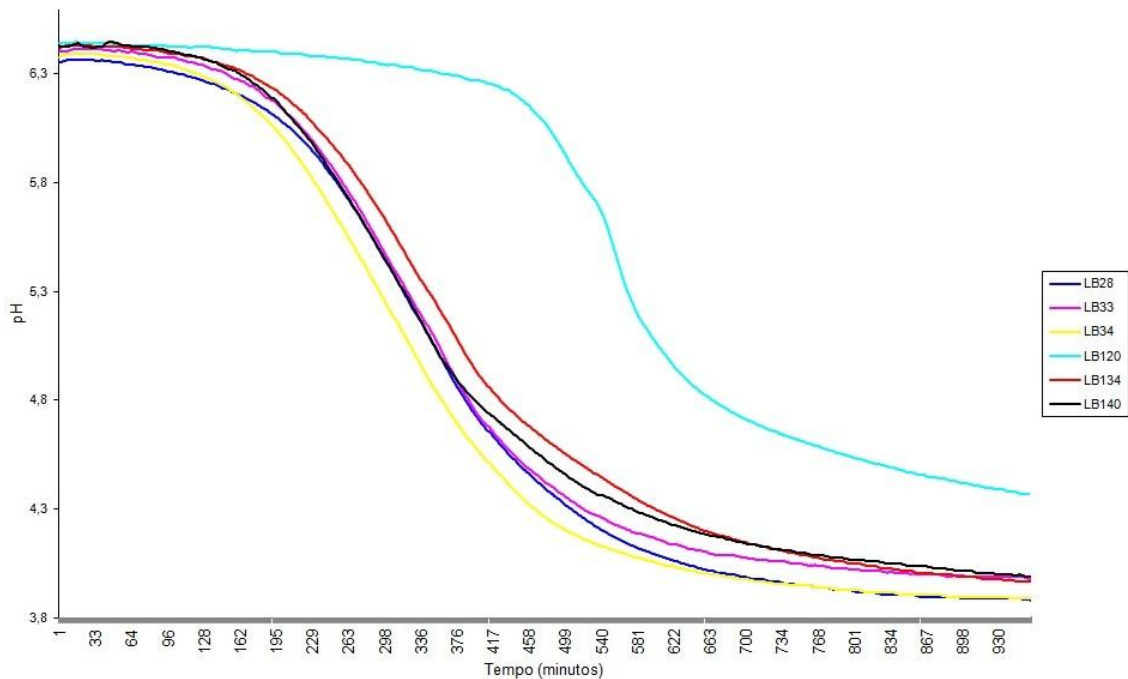


Figura 12 - Curva de acidificação das estirpes de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* em leite desnatado reconstituído (LDR) observada através do declínio do pH durante 16 horas de incubação.

As cepas que apresentaram melhor desempenho em relação à acidificação/tempo foram as cepas LB34, LB28 e LB33, porém devido essas cepas não terem um bom comportamento frente à liofilização, as cepas de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*. escolhidas para compor o fermento láctico foram LB134 (Vermelha) e LB140 (Preta) que também apresentaram uma tendência de acidificação rápida e apresentaram um comportamento favorável ao processo de liofilização. A Tabela 10 apresenta o resultado do tempo de coagulação das cepas de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* em relação ao tempo.

Tabela 10- Tempo de coagulação das cepas de *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* em leite desnatado reconstituído.

Cepa (*LB)	Tempo (minutos)
LB28	100
LB33	100
LB34	118
LB120	130
LB134	100
LB140	335

*LB = *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus*

No fim desta etapa do estudo, com base nos resultados da identificação/tipagem e a partir dos melhores resultados da curva de acidificação, selecionaram-se as cepas para a composição dos fermentos: Fermento A - *S. thermophilus* (ST28) e (ST128), *L. delbrueckii*

sp. *bulgaricus* (LB134) e Fermento B - *S. thermophilus* (ST98) e (ST104), *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* (LB134).

5.4 ANÁLISES DOS LEITES PASTEURIZADOS NOS LATICÍNIOS

A seguir as Tabelas 11 e 12 apresentam os resultados das análises dos leites pasteurizados utilizados na fabricação dos queijos nos laticínios 01 e 02.

Tabela 11- Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado do laticínio 01.

ANÁLISES	02/07/13	02/07/13	04/07/13	04/07/13
Gordura %	3,28	3,26	2,98	3,41
Proteína %	3,26	3,27	2,74	3,27
Sólidos Totais %	11,78	11,77	10,18	11,99
ESD %	8,50	8,51	7,20	8,58

ESD= Extrato seco desengordurado

Tabela 12 - Resultados das análises físico-químicas do leite pasteurizado do laticínio 02.

ANÁLISES	09/07/13	09/07/13	11/07/13	11/07/13
Gordura %	3,39	A*	3,39	3,08
Proteína %	3,08	A*	3,15	3,05
Sólidos Totais %	11,80	A*	11,83	11,35
ESD %	8,41	A*	8,44	8,27

ESD= Extrato seco desengordurado, A*= Laboratório não forneceu os resultados.

Os resultados obtidos da análise de leite dos laticínios 01 e 02 mostram que a porcentagem de gordura utilizada para a elaboração dos queijos ficou entre 2,98 a 3,41%, valores que atendem aos padrões preconizados para a elaboração da maioria dos queijos nos laticínios, de 3,0 a 3,5 %. A composição do leite para a fabricação de queijos é muito importante para a uniformidade do produto final e pode ser padronizada pela utilização de centrífugas desnatadeiras e padronizadoras ou pela mistura de leite integral com leite desnatado ou creme na proporção necessária para obtenção de uma relação caseína/gordura desejada (PAULA; CARVALHO; FURTADO, 2009).

Os resultados de ESD dos leites nos dois laticínios ficaram entre 7,2 a 8,58% e os valores encontrados para proteínas variaram de 2,74 a 3,27% entre os dois laticínios, sendo esses dois extremos encontrados no leite do laticínio 01. Barros et al. (2011), em seus estudos sobre leite pasteurizado observaram uma média de valores mais elevados para ESD e proteínas no leite pasteurizado, obtendo 8,92 a 8,93% de extrato seco desengordurado e 3,25 a 3,26% de proteínas.

Os teores de sólidos totais variaram de 10,18% a 11,99%, sendo que essa variação aconteceu no laticínio 01 e no laticínio 02. Entre os elementos que compõe os sólidos do leite, a proteína, e mais especificamente a porcentagem de caseína em relação ao teor de proteína total, é o mais importante do ponto de vista econômico, afetando o rendimento principalmente

em aplicações que visem a concentrar esse componente, como a fabricação de queijos (VIOTTO; CUNHA, 2006).

5.5 PROTOCOLO DE DESENVOLVIMENTO DO QUEIJO

Buscou-se através de treinamentos, pesquisas, testes e análises, a transferência de tecnologia estabelecida numa parceria com o mestre queijeiro italiano, que planejou e conduziu atividades necessárias ao processo de produção de um queijo com caráter inovador, para a indústria de laticínios da região sudoeste do Paraná, buscando o desenvolvimento de um produto de alta qualidade nutricional e sensorial, além de estabelecer as regras produção e padronização (protocolo de fabricação) desse derivado lácteo, cujas etapas serão detalhadamente descritas a seguir.

5.5.1 Processo Produtivo

Os queijos elaborados nos laticínios 01 e 02, denominados com as iniciais de sua formulação, utilizando-se os fermentos identificados A e B e os conservantes utilizados foram Nitrato de Sódio e Lisozima, além dos queijos elaborados sem conservantes. O fluxograma do processamento dos queijos é apresentado na Figura 13.

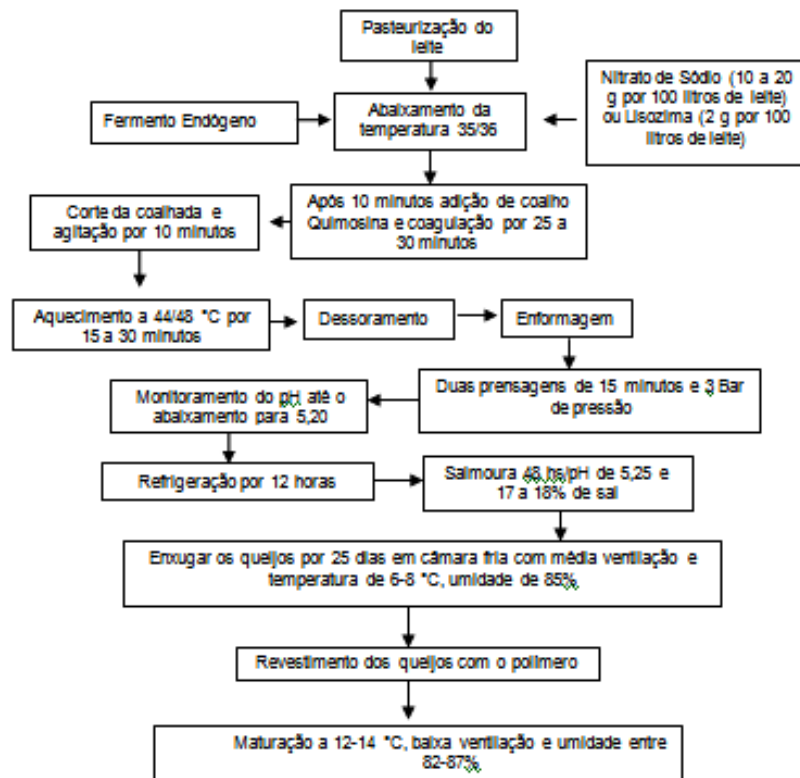


Figura 13 - Fluxograma de produção dos queijos elaborados com Fermento Lático Endógeno A ou B com ou sem conservante.

Para a elaboração dos queijos o leite com gordura padronizada entre 3,0 a 3,5% foi pasteurizado a 73 °C durante 20 segundos e em seguida resfriado a 35/36 °C. Posteriormente ocorreu o uso direto (Direct vat set) do Fermento Lático Endógeno A ou B (1 envelope para cada 2000L de leite) e um dos conservantes: Nitrato de Sódio: (1000g/5000 litros de leite) ou Lisozima (100g/5000 L de leite). Após 10 minutos fez-se a adição do coalho Quimosina (coalho bovino) permanecendo em coagulação de 25 a 30 minutos. Decorrido o tempo necessário da coagulação realizou-se o corte da coalhada até a dimensão de um grão de milho (Imagem 1), e agitação da coalhada por 10 minutos.



Imagem 1 - Corte da coalhada.

Em seguida realizou-se o aquecimento indireto da coalhada pela parede dupla do tanque a 44 °C por 15 a 30 minutos sob agitação, realizando em seguida o dessoramento da massa, no laticínio 01 o dessoramento ocorreu em tanque drenoprensa, no laticínio 02 o dessoramento ocorreu de forma mais artesanal, no próprio tanque onde o queijo foi coagulado (Imagem 2).



Imagem 2 - Dessoramento da coalhada.

A enformagem foi realizada em formas com microfuros para a eliminação do soro. As formas continham 10 cm de altura e 25 cm de diâmetro para que os queijos no final do processo de maturação atingissem um peso de aproximadamente 5 Kg (Imagem 3).



Imagem 3 - Enformagem dos queijos.

Foi realizada a 1ª Prensagem por 15 minutos com uma pressão de 3 Bar e em seguida a 2ª Prensagem por 15 minutos com a mesma pressão (Imagem 4).



Imagem 4 - Prensagem dos queijos.

Foram realizadas viragens nos queijos a cada meia hora com medições de pH até 5,20 ou próximo. Com o pH em 5,20 os queijos foram colocados na refrigeração por 12 horas.

Após esse período os queijos foram colocados na salmoura (Imagem 5) durante 2 dias, com pH de 5,25 e 17 a 18% de sal.



Imagem 5 - Queijos na salmoura.

Após a salga os queijos foram colocados para enxugar por 25 dias (Imagem 6) em câmaras com controle de umidade (85%-87% UR), associada ao sistema de média ventilação e refrigeração com temperaturas de 6 a 8 °C. Fazendo-se a viragem das peças a cada 02 dias.



Imagem 6 - Queijos na câmara fria.

Após os 25 dias os queijos foram revestidos com o polímero de revestimento Acetato de Polivinila (Imagem 7) com o objetivo de tornar o produto mais atrativo e impedir a

proliferação de bolores na casca. Os queijos foram invertidos/virados pelo menos uma vez por semana e maturados entre 12 a 14 °C onde permaneceram por até 1 ano.



Imagem 7 - Queijos revestidos com Polímero.

5.6 CARACTERÍSTICAS DOS FERMENTOS ENDÓGENOS NA FABRICAÇÃO DO QUEIJO “SANTO GIORNO”

Foram produzidos queijos com as duas combinações de fermento A e B e verificou-se que a atividade acidificante e, portanto, de fermentação das duas combinações de fermento agiram de forma proveitosa, ou seja, houve a redução do pH com velocidade adequada ao processo de fabricação (Figuras 14 e 15).

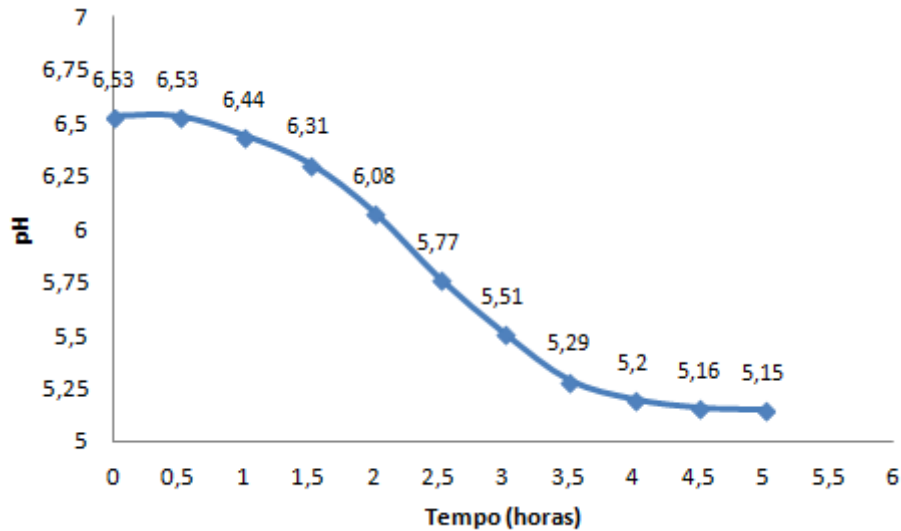


Figura 14 - Curva dos valores médios de pH durante a acidificação do Fermento A referentes a 6 testes realizados nos laticínios 01 e 02.

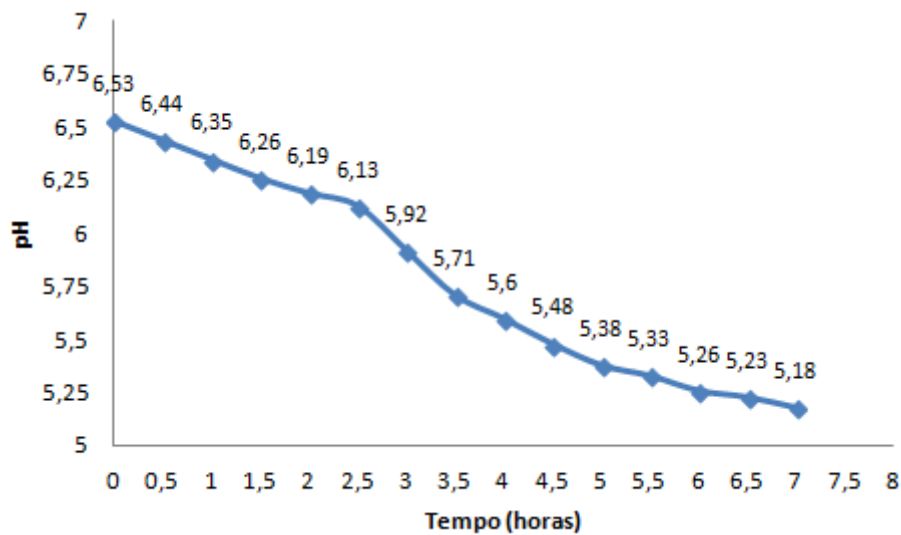


Figura 15 - Curva dos valores médios de pH durante a acidificação do Fermento B referentes a 6 testes realizados nos laticínios 01 e 02.

O fermento A mostrou-se mais rápido que o fermento B, como verificado nas Figuras 14 e 15). Ambas as formulações de fermentos promoveram o abaixamento do pH da massa dos queijos a um valor de pH 5,20 em um tempo máximo de 7 horas.

O aspecto positivo que os fermentos demonstraram na acidificação indica que os dois fermentos podem ser usados para produzir o queijo “Santo Giorno”. Tendo em vista que os bacteriófagos, presentes em todas as áreas de laticínios, possam atacar a célula das bactérias lácticas dos fermentos e torná-los inativos, recomenda-se a utilização alternada semanal dos fermentos A e B (rotação fágica), evitará este problema.

5.7 CARACTERÍSTICAS DO QUEIJO TÍPICO “SANTO GIORNO”

5.7.1 Parâmetros Sensoriais Visíveis

Os queijos com 30 dias de maturação apresentaram-se com cor amarela característica, odor agradável de queijos, sabor agradável e suave e em alguns queijos foi observado sabor adocicado. O queijo PBL1 apresentou um sabor levemente amargo, diferenciando-se dos demais, a textura em todas as amostras era elástica e macia. O visual interno dos queijos apresentava-se com pequenas olhaduras distribuídas uniformemente e existia a presença de algumas maiores em determinados queijos, possivelmente decorrentes de uma prensagem irregular ou falta de viragens, pois estas estavam concentradas nas extremidades dos queijos. O visual externo dos queijos apresentava casca lisa. Nos queijos do laticínio 01 existiam algumas imperfeições decorrentes da presença de bolores. A espessura da casca foi em média de 0,4 cm. A altura de 9,6 cm e o diâmetro de 24 cm.

Aos 60 dias de maturação os queijos apresentaram coloração amarelo palha, o odor era agradável característico de queijos. O sabor era agradável e suave, com um toque adocicado ao final da deglutição. A textura apresentava-se elástica e percebia-se um aumento dos lipídios pela textura aparentar mais amanteigada. O visual interno dos queijos apresentava muitas micro-olhaduras de aproximadamente 0,1 cm de diâmetro. O visual externo definia-se pela presença de casca lisa, porém os queijos do laticínio 01 possuíam algumas imperfeições, aberturas de onde foram retirados bolores. A espessura da casca aumentou, passando para uma média de 0,5 cm, altura de 11,5 cm e diâmetro de 23,5 cm.

Ao término do período de 180 dias/seis meses de maturação, os queijos estavam com uma coloração mais amarelada, odor láctico, sabor mais acentuado e adocicado ao final da deglutição. A textura dos queijos era elástica, porém mais firme que a observada nos outros períodos. A textura amanteigada se acentuou nesse período, havendo também a presença de Cristais de Lactato de Cálcio/Paracaseinato de Cálcio. O visual interno dos queijos se modificou em relação às olhaduras, os queijos apresentaram algumas olhaduras maiores que as observadas nos períodos de maturação anteriores, em média 0,2 a 0,3 cm. O queijo PBN foi o que teve a maior diferença em relação aos demais, pois as olhaduras chegaram a ter até 0,9 cm, o que pode ser considerada como característica de um processo de estufamento tardio possivelmente ocorrido pela presença da espécie de bactéria *Clostridium tyrobutyricum*. Além das olhaduras irregulares, o queijo PBN também se mostrou com um sabor amargo e picante. O visual externo dos queijos era de casca lisa, porém os queijos do laticínio 01

possuíam várias imperfeições em consequência da retirada de bolores na casca. O queijo PBN do laticínio 02 possuía casca lisa, porém percebeu-se um aumento na parte central do queijo, indicativo de estufamento tardio. A espessura da casca variou de 0,6 a 0,8 cm. A altura ficou entre 7 a 12,5 cm, esta última foi medida no queijo PBN. O diâmetro dos queijos esteve entre 21 a 22,5 cm.

5.7.2 Análises físico-químicas

A composição físico-química dos queijos dependem da composição do leite utilizado em sua produção, que por sua vez, é influenciada por diversos fatores que alteram a proporção destes constituintes, como a raça, estágio de lactação ou alimentação do animal ou estação do ano (CARROLL et al., 2006). Na Tabela 13 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas dos queijos desenvolvidos com fermento endógeno nos períodos de 30, 60 e 180 dias de maturação.

Tabela 13- Resultados das análises físico-químicas dos queijos desenvolvidos com fermento endógeno nos períodos de 30, 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Maturação (em dias)	Proteínas (g/100g)	Lípidios (g/100g)	Aw*	Umidade (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Carboidratos** (g/100g)	EST* (g/100g)	GES* (g/100g)	Calorias (kcal/100g)
Laticínio 01										
PBL1	30	23,95 ^{ab} ±0,20	28,64 ^{ab} ±0,61	0,9592 ^{ba} ±0,01	41,30 ^{ba} ±0,45	4,62 ^{abA} ±0,24	1,48 ^{dA} ±1,04	58,70 ^{ac} ±0,45	48,80 ^{aA} ±1,38	359,52 ^{cdC} ±1,59
	60	24,71 ^{aAB} ±0,37	29,55 ^{abB} ±0,35	0,9514 ^{bb} ±0,01	38,77 ^{bb} ±0,39	4,78 ^{aA} ±0,27	2,19 ^{ba} ±0,73	61,23 ^{cb} ±0,39	48,25 ^{aA} ±0,85	373,56 ^{bb} ±1,60
	180	30,57 ^{aA} ±0,19	30,68 ^{abA} ±0,84	0,9380 ^{ac} ±0,01	36,52 ^{bc} ±0,31	4,95 ^{aA} ±0,18	2,96 ^{ba} ±0,83	63,48 ^{dA} ±0,30	48,33 ^{abA} ±0,42	387,53 ^{ba} ±0,83
PAN	30	22,15 ^{bb} ±0,19	25,06 ^{bb} ±0,56	0,9635 ^{aA} ±0,05	41,06 ^{ba} ±0,23	4,88 ^{aA} ±0,08	6,85 ^{ba} ±0,59	58,95 ^{ac} ±0,23	42,52 ^{cb} ±0,83	341,58 ^{cb} ±3,49
	60	23,28 ^{ba} ±0,45	27,82 ^{cdA} ±0,59	0,9424 ^{dB} ±0,01	37,37 ^{cb} ±0,02	5,00 ^{aA} ±0,22	6,53 ^{aA} ±0,99	62,63 ^{bb} ±0,01	44,42 ^{cAB} ±0,94	369,00 ^{bb} ±2,43
	180	23,61 ^{ca} ±0,38	29,28 ^{abA} ±0,69	0,9342 ^{ac} ±0,01	35,42 ^{dC} ±0,26	5,18 ^{aA} ±0,28	6,50 ^{aA} ±0,65	64,58 ^{ba} ±0,26	45,34 ^{ca} ±1,06	384,02 ^{ba} ±3,52
PA1	30	22,95 ^{abB} ±0,14	23,94 ^{bb} ±0,22	0,9568 ^{dA} ±0,01	40,71 ^{ba} ±0,24	2,99 ^{bb} ±0,06	9,40 ^{aA} ±0,34	59,29 ^{ac} ±0,24	40,37 ^{cb} ±0,52	344,89 ^{cdC} ±0,27
	60	23,21 ^{baB} ±0,25	30,88 ^{aA} ±0,83	0,9369 ^{eb} ±0,05	35,37 ^{db} ±0,61	4,50 ^{abA} ±0,14	6,04 ^{ab} ±1,22	64,63 ^{ab} ±0,60	47,79 ^{abA} ±1,57	394,96 ^{ab} ±3,69
	180	23,52 ^{ca} ±0,07	31,18 ^{aA} ±0,18	0,9313 ^{ac} ±0,05	33,63 ^{ec} ±0,24	4,79 ^{aA} ±0,24	6,87 ^{ab} ±0,47	66,37 ^{aA} ±0,24	46,98 ^{ba} ±0,43	402,25 ^{aA} ±1,51
Laticínio 02										
PBL2	30	20,57 ^{cc} ±0,63	28,08 ^{aA} ±0,66	0,9584 ^{ca} ±0,01	42,44 ^{aA} ±0,39	3,94 ^{cdB} ±0,04	4,96 ^{bcA} ±0,87	57,55 ^{bc} ±0,38	48,78 ^{aA} ±0,87	354,85 ^{abB} ±4,77
	60	21,88 ^{cb} ±0,33	28,89 ^{bcA} ±0,33	0,9547 ^{ab} ±0,05	37,69 ^{cb} ±0,15	4,67 ^{aAB} ±0,22	6,86 ^{aA} ±0,55	62,30 ^{bb} ±0,15	46,37 ^{abcB} ±0,62	375,00 ^{ba} ±2,01
	180	24,33 ^{bcA} ±0,12	29,09 ^{ba} ±0,28	0,9284 ^{ac} ±0,05	35,79 ^{bc} ±0,26	4,86 ^{aA} ±0,50	5,92 ^{aA} ±0,98	64,21 ^{ba} ±0,25	45,30 ^{cb} ±0,52	382,88 ^{bcA} ±3,02
PBN	30	22,74 ^{abB} ±0,87	28,14 ^{ab} ±0,19	0,9542 ^{ca} ±0,05	41,29 ^{ba} ±0,16	3,73 ^{dC} ±0,05	4,10 ^{cAB} ±0,91	58,71 ^{ac} ±0,16	47,92 ^{aA} ±0,41	360,63 ^{ac} ±0,85
	60	23,06 ^{bb} ±0,50	29,02 ^{bcAB} ±0,74	0,9442 ^{cb} ±0,02	39,16 ^{bb} ±0,41	4,10 ^{bb} ±0,04	4,66 ^{aA} ±0,41	60,83 ^{cb} ±0,41	47,69 ^{abA} ±1,26	372,04 ^{bb} ±4,24
	180	26,23 ^{bA} ±0,55	30,00 ^{abA} ±0,08	0,9307 ^{ac} ±0,01	36,35 ^{bcC} ±0,08	4,58 ^{aA} ±0,04	2,84 ^{bb} ±0,54	63,65 ^{cdA} ±0,08	47,13 ^{ba} ±0,12	386,30 ^{ba} ±0,63
PA2	30	22,07 ^{bb} ±0,49	26,58 ^{bb} ±0,43	0,9531 ^{fa} ±0,01	41,26 ^{ba} ±0,18	4,35 ^{bcB} ±0,29	5,73 ^{bcA} ±0,50	58,73 ^{ac} ±0,18	45,26 ^{bb} ±0,71	350,46 ^{bcB} ±2,36
	60	22,78 ^{bcB} ±0,55	27,16 ^{db} ±0,15	0,9366 ^{ca} ±0,01	40,28 ^{ab} ±0,23	4,85 ^{aA} ±0,17	4,93 ^{aA} ±0,62	59,72 ^{db} ±0,23	45,47 ^{bcB} ±0,08	355,31 ^{cb} ±1,46
	180	30,57 ^{aA} ±0,35	31,57 ^{abA} ±0,35	0,9346 ^{aA} ±0,01	38,63 ^{ac} ±0,16	5,19 ^{aA} ±0,01	1,80 ^{bb} ±0,44	61,37 ^{ca} ±0,15	49,80 ^{aA} ±0,43	377,58 ^{ca} ±2,38

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrito de Sódio; PA1- Queijo com fermento A; PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrito de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

*Aw- Atividade de água; EST- Extrto seco total; ESD- Extrato seco desengordurado

Médias das diferentes amostras de queijo seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em relação ao mesmo tempo de maturação pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna significa que a mesma amostra de queijo não difere estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

**Carboidratos obtidos por diferença.

De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco e com o conteúdo de umidade, segundo a Portaria N° 146 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), os queijos se classificam, em Gordos e de Média Umidade (Tabelas 16 e 17), com exceções de algumas amostras que apresentaram variações durante o armazenamento: PAN e PA1 (Semigordo) aos 30 dias; PAN (Semigordo) e PA1 (Baixa Umidade) aos 60 dias; e as amostras PAN, PA1 e PBL2 (Baixa umidade) aos 180 dias de maturação.

A legislação brasileira não estabelece padrões para os parâmetros físico-químicos avaliados nesta pesquisa, uma vez que, se trata de um novo produto, cuja padronização no processo de produção está em desenvolvimento.

De modo geral ao longo do período de maturação houve um aumento significativo nas concentrações de proteínas, lipídios, cinzas, EST, GES e calorias e redução dos teores de umidade, carboidratos e A_w em todos os queijos formulados. Estas alterações se devem a redução da umidade durante o processo de cura, com conseqüente decréscimo dos valores de A_w . Também se pode observar a redução dos teores de carboidratos, onde a lactose é metabolizada em ácido láctico e outros produtos pelas bactérias do fermento e enzimas produtoras do sabor característico do queijo em questão. Variações deste comportamento podem ser associadas à heterogeneidade entre peças de queijo de um mesmo lote de processamento, podendo ser consideradas pequenas e inerentes ao processo industrial e forma de armazenamento, visto que a formulação empregada durante a fabricação basicamente não possui variação da composição, apenas diferem quanto aos fermentos (A e B), conservantes (Lisozima e Nitrato), tempo de maturação (30, 60 e 180 dias) e replicatas em laticínios diferentes (01 e 02), e, portanto as diferenças estatísticas observadas não se devem a estas variáveis.

O teor de proteínas das amostras analisadas variaram de 20,57 a 23,95 (30 dias), 21,88 a 24,71 (60 dias), 23,52 a 30,57 (180 dias), Barros et al. (2011) encontraram valores entre 28,78% a 30,68 %, semelhantes aos encontrados nessa pesquisa. Os resultados obtidos em Ribeiro et al. (2012), mostraram que o teor de proteínas apresentou diferenças de até 22% entre os queijos analisados, ficando entre 9,62% a 36,06%. Sendo o valor mais baixo devido a fraudes com produtos amiláceos. Os queijos desenvolvidos com o fermento endógeno apresentaram apenas 7,05% como a maior diferença entre as proteínas dos queijos PBL1 e PA1 de 180 dias de maturação. A menor diferença encontrada foi de 0,09% entre os queijos PAN e PA1 de 180 dias. No estudo de Justus et al. (2011) foi verificada uma grande variação

nas proteínas dos queijos Parmesão pesquisados, com uma média de 34,54% a 53,71%, valores considerados superiores aos encontrados para os queijos “Santo Giorno”.

Os teores de lipídeos (g/100 g) entre as amostras estudadas variaram de 20,57 a 23,95 (30 dias), 24,71 a 21,88 (60 dias), e 30,57 a 23,52 (180 dias). Resultados semelhantes foram obtidos por Barros et al. (2011) para queijos parmesão de 180 dias (27,1% a 28,4%). Os resultados obtidos em Ribeiro et al. (2012), para amostras de nove marcas queijo parmesão adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Ponta Grossa variaram de 4,75% a 50,00%.

Os resultados de umidade (g/100 g) dos queijos pesquisados variaram de 40,71 a 42,44 (30 dias), 35,37 a 40,28 (60 dias) e 33,63 a 38,63 (180 dias). Segundo Ribeiro et al. (2012) no que diz respeito à umidade, encontraram-se valores entre 15,80% a 32,17%, resultado bem inferior aos encontrados nesse estudo. A pesquisa realizada por Barros et al. (2011) obteve como resultados 30,21% a 31,28%, resultados menores aos encontrados para essa pesquisa e para atividade de água, valores entre 0,975 a 0,979, enquanto que nos queijos analisados a média encontrada foi menor, 0,9531 a 0,9635 (30 dias), 0,9366 a 0,9547 (60 dias) e 0,9284 a 0,9380 (180 dias).

Os teores de cinzas (g/100 g) verificados na pesquisa foram Barros et al. (2011) o teor de cinzas entre 4,18% a 4,43%, resultados semelhantes aos verificados nesse trabalho 2,99 a 4,88 (30 dias), 4,10 a 5,00 (60 dias) e 4,58 a 5,19 (180 dias). Enquanto que para Ribeiro et al. (2012) os valores ficaram entre 5,74% a 8,64%.

O teor de gordura no extrato seco (g/100 g) verificada por Barros et al. (2011) ficou com médias entre 38,83% a 41,32%, resultados menores aos encontradas para os queijos analisados, 40,37 a 48,80 (30 dias), 44,42 a 48,25 (60 dias) e 45,30 a 49,80 (180 dias) visto que estes foram classificados como queijos gordos, enquanto que os queijos Parmesão são definidos como queijos semigordos. Ribeiro et al. (2012) os valores de GES ficaram entre 7,00% a 59,38%.

De acordo com a Tabela Brasileira de composição de Alimentos (TACO) (2011) a composição centesimal dos queijos Parmesão se constitui de acordo com os seguintes resultados: Umidade de 21,2 g/100 g, calorias 453 kcal, proteínas 35,6 g/100g, lipídios 33,5 g/100 g, carboidratos 1,7 g/100 g e cinzas 8 g/100 g. Ao se comparar com a composição dos queijos “Santo Giorno” analisados, percebe-se um percentual menor das proteínas, lipídios, cinzas e calorias e um percentual maior para a umidade e carboidratos. É necessário salientar que os queijos elaborados não se classificam como Parmesão, optou-se por comparar com o Parmesão, pois este é o que mais se assemelha ao produto elaborado no estudo por possuir um

tempo de maturação de até dois anos, ser elaborado com as bactérias *Lactobacillus helveticus* ou *Streptococcus thermophilus* e *L. bulgaricus*, enquanto que o queijo Regional “Santo Giorno” possui como bactérias atuantes o *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* possuindo também um período de maturação prolongado.

5.7.3 Análise de Componentes Principais (ACP)

Os dados físico-químicos referentes às amostras de 30 dias de maturação foram submetidas à Análise de Componentes Principais, cujas informações relacionadas com as diferentes formulações de queijo estão apresentados nos gráficos de *scores* (Figura 16) e a avaliação das variáveis, umidade, Aw, cinzas, lipídios, proteínas, carboidratos, EST, GES e calorias podem ser observados no gráfico de pesos (Figura 17), evidenciando as características de cada formulação a fim de verificar quais variáveis levaram a semelhanças ou distinções entre os queijos.

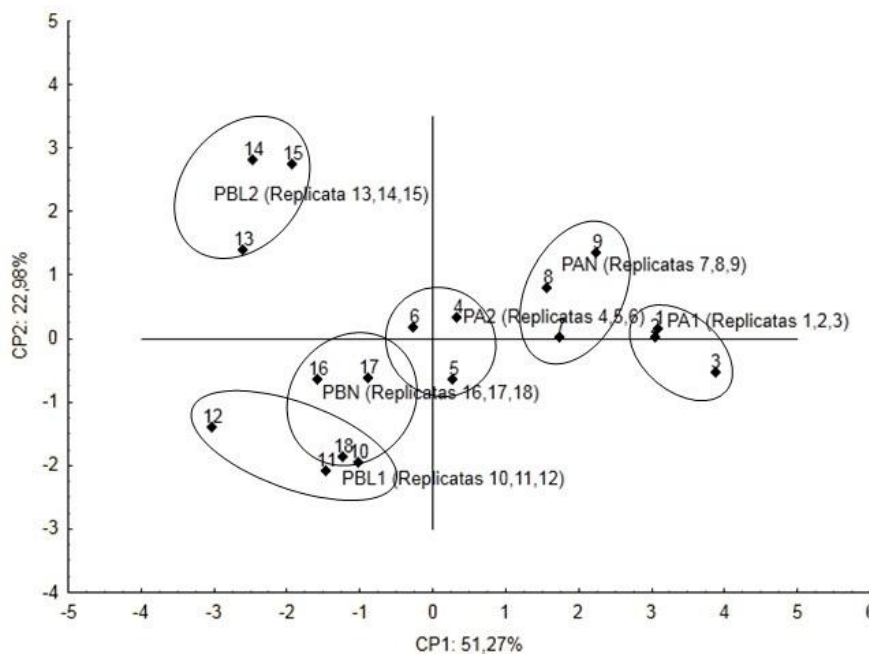


Figura 16– Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 30 dias.

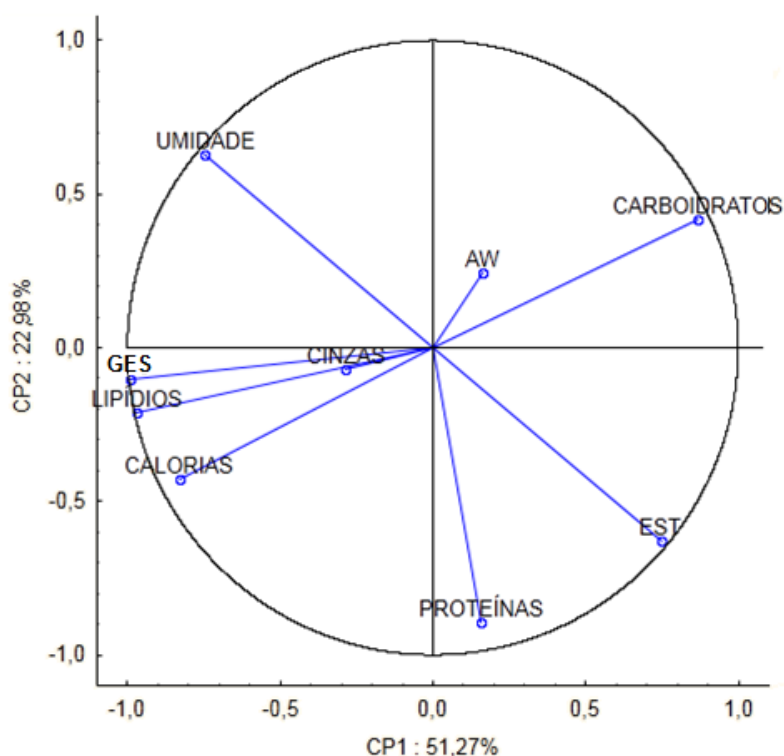


Figura 17- Círculo de Correlação dos queijos com 30 dias.

Nos eixos dos gráficos estão apresentados os dois componentes principais (PCs) mais importantes, que explicam 74,25% da variabilidade dos dados para o período de armazenamento de 30 dias.

A partir dos dados obtidos nas análises das amostras sem conservante, com Lisozima e com Nitrato dos dois laticínios, foi possível agrupar as informações relacionadas com as formulações dos queijos (Figura 16). O posicionamento das amostras no gráfico de escores que pode ser interpretado a partir do gráfico de pesos, está relacionado com as análises físico-químicas caracterizadas no estudo. Pode-se considerar que as amostras PBN e PBL1 são similares entre si em relação às variáveis lipídios, GES e calorías; as replicatas da amostra PBL2 se diferenciam das demais pela umidade, as amostras PAN, PA1 e PA2 por estarem mais próximas são semelhantes em relação ao teor de carboidratos.

As variações mais importantes para determinar o posicionamento vertical das amostras no gráfico de escores são aquelas que apresentam maiores pesos para PC2: umidade, GES, lipídios e atividade de água, enquanto que o PC1 é melhor explicado pelos carboidratos. Os teores destes elementos para as amostras PBN e PBL1 tendem a ser menores que aqueles verificados para as demais amostras.

Por meio da PCA, de forma comparativa, pode-se deduzir que a maioria das amostras apresentam pequenas diferenças, apontando para necessidade de melhoria de padronização do

queijo formulado. A Aw, cinzas e proteínas foram os descritores que tiveram menor poder explicativo e o teor de proteínas tiveram uma diminuição no poder explicativo ao longo do tempo de maturação.

Com a análise de grupamentos hierárquicos (HCA) buscou-se unir as amostras em classes, baseando-se na similaridade dos participantes de uma mesma classe e nas diferenças entre os membros. O dendograma representado na Figura 18 ilustra o arranjo dos conjuntos formados.

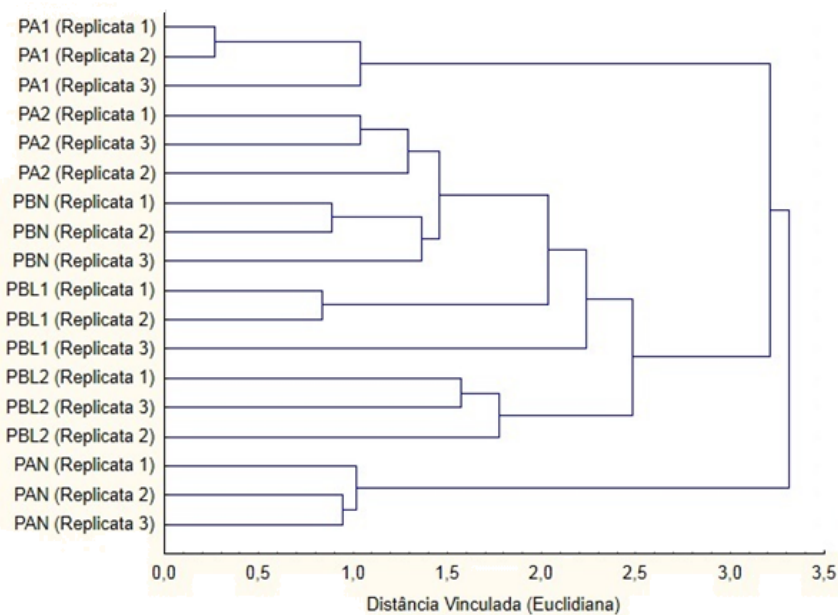


Figura 18 - Dendograma de dissimilaridade para os queijos de 30 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.

Com o dendograma é possível visualizar a formação dos grupos de amostras que não ficaram evidentes pela PCA. Observou-se que as amostras possuem muita heterogeneidade, pois há a formação de vários clusteres. Verifica-se a formação de aglomerados distintos, sendo que a amostra PA1 é a considerada mais homogênea entre si, pois obteve menor distância vinculada entre as replicatas 1 e 2. Porém, constata-se que há heterogeneidade dentro e entre os grupos.

No gráfico ACP (Figura 19), os dados referentes a composição físico-química dos queijos com 60 dias de maturação, são representados por vetores, os quais caracterizam as amostras que se localizam próximas a estes. As amostras estão circuladas de acordo com suas respectivas replicatas.

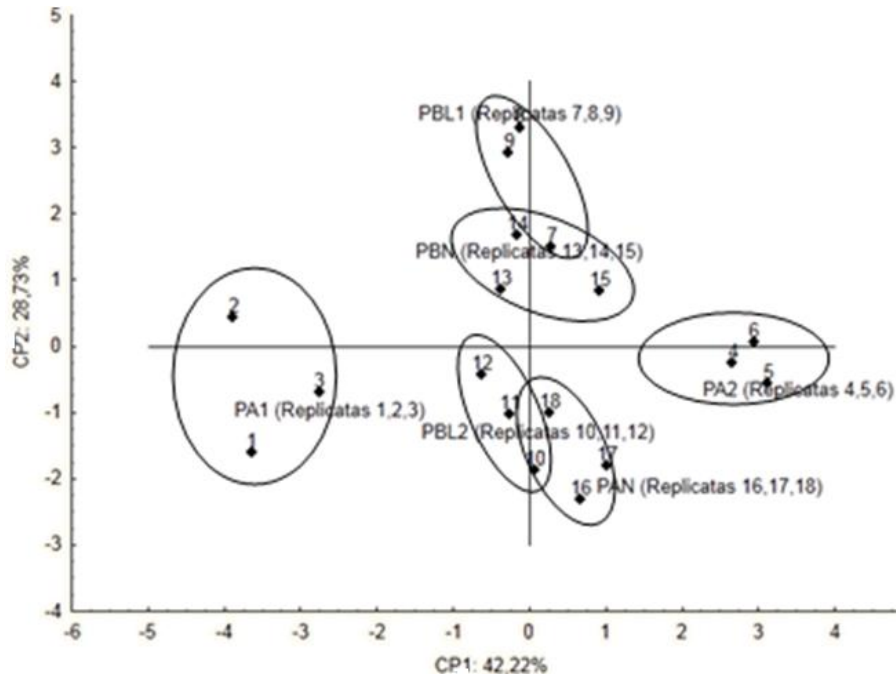


Figura 19 – Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 60 dias.

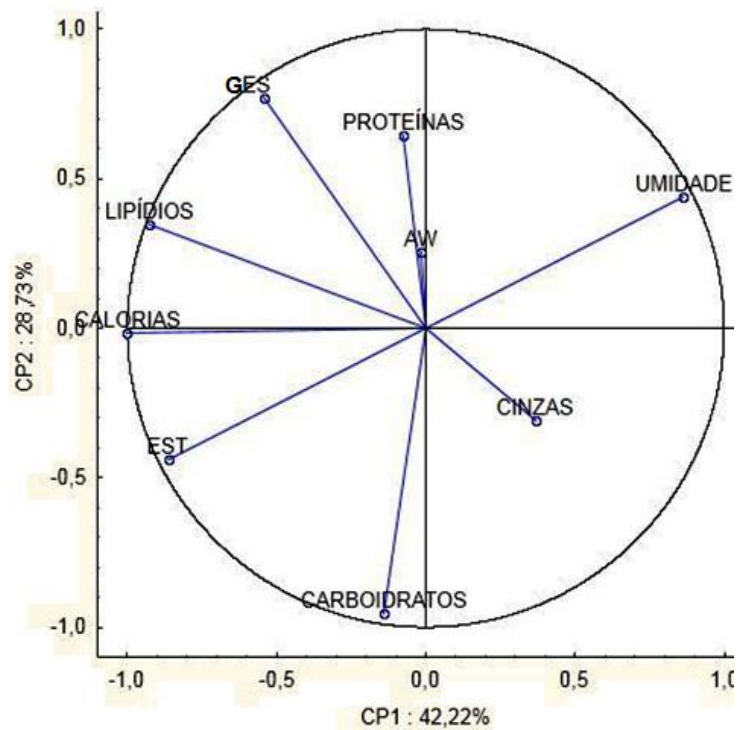


Figura 20 – Círculo de Correlação dos queijos com 60 dias.

Quanto maior a decomposição dos vetores nos eixos componentes, maior sua importância para diferenciar as amostras, sendo que as componentes CP1 e CP2 explicam

70,95% da variação entre as amostras. A tendência de diferenciação das amostras destaca o PBL1 e PBN para maior similaridade de, proteínas, GES, a umidade e os lipídios relacionam-se melhor com os resultados da CP2. Os queijos PA1 e PBL2 apresentam maior similaridade em relação aos carboidratos e calorias, enquanto que PA2 e PAN são semelhantes quanto ao teor de cinzas. O dendograma (Figura 21) apresenta-nos os agrupamentos formados a partir das dissimilaridades entre as amostras. Percebe-se a formação de vários grupos distintos com a amostra PBL1 caracterizada como mais homogênea devido a sua menor distância vinculada.

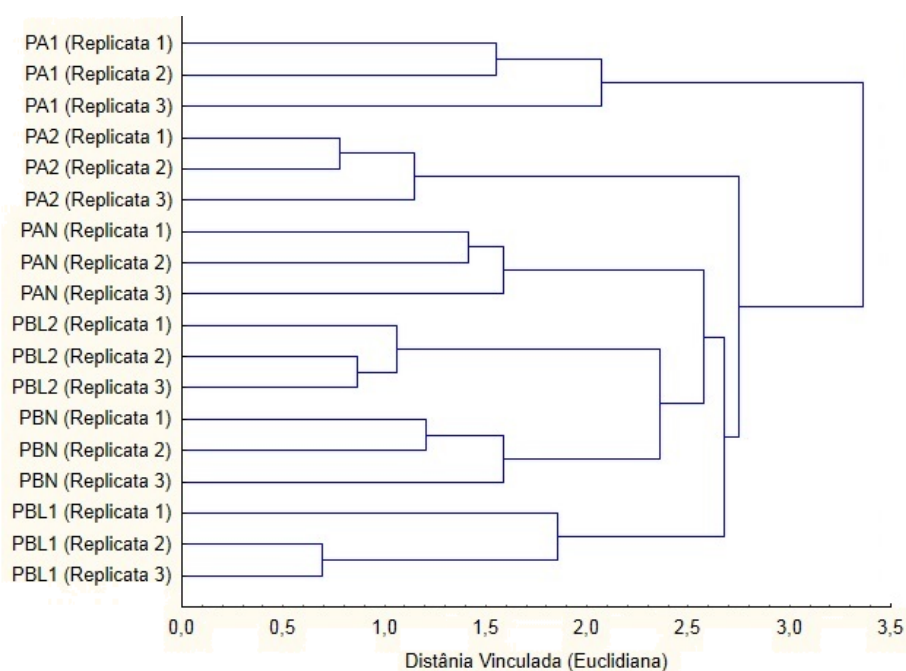


Figura 21 - Dendrograma de dissimilaridade para os queijos de 60 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.

Observando-se os gráficos (Figuras 19 e 20), a CP2 separa as amostras em relação as análises de Aw, umidade, GES, proteínas e lipídeos, enquanto que a componente principal (CP1), separa as formulações pelo grupo de amostras PA2, PAN, PBL2 e PA1 devido as análises de cinzas, carboidratos, EST e calorias, sendo que este PC explica 71,29% da variabilidade das respostas. Já o PC2 separa as formulações PBL1 e PBN no lado superior do gráfico.

Os Gráficos (Figuras 22 e 23) destacam as semelhanças e diferenças encontradas na composição dos queijos com 180 dias.

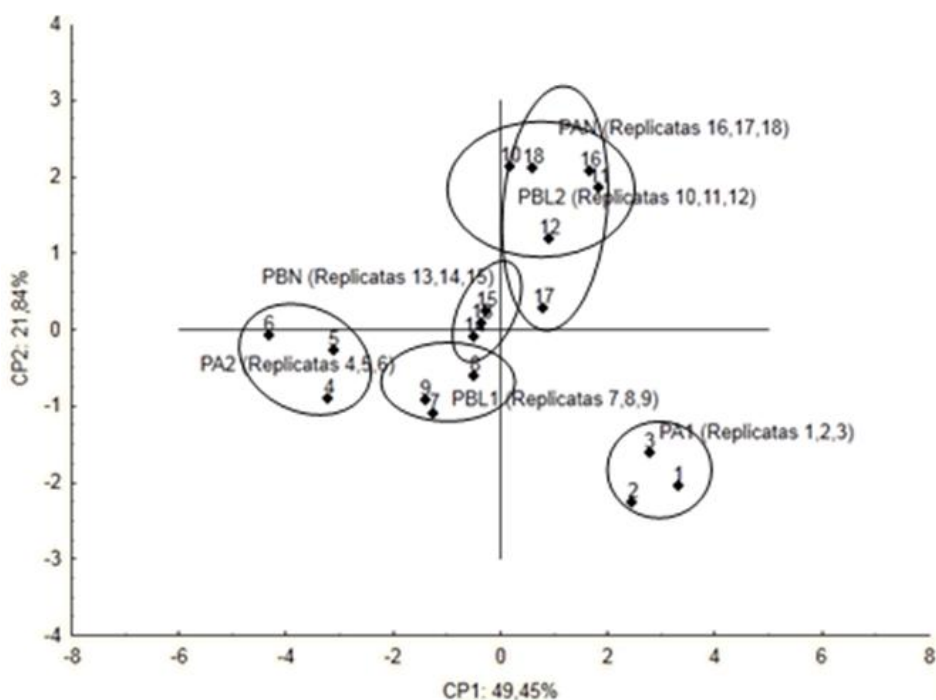


Figura 22 - Projeção dos casos no plano fatorial 1,2 dos queijos com 180 dias.

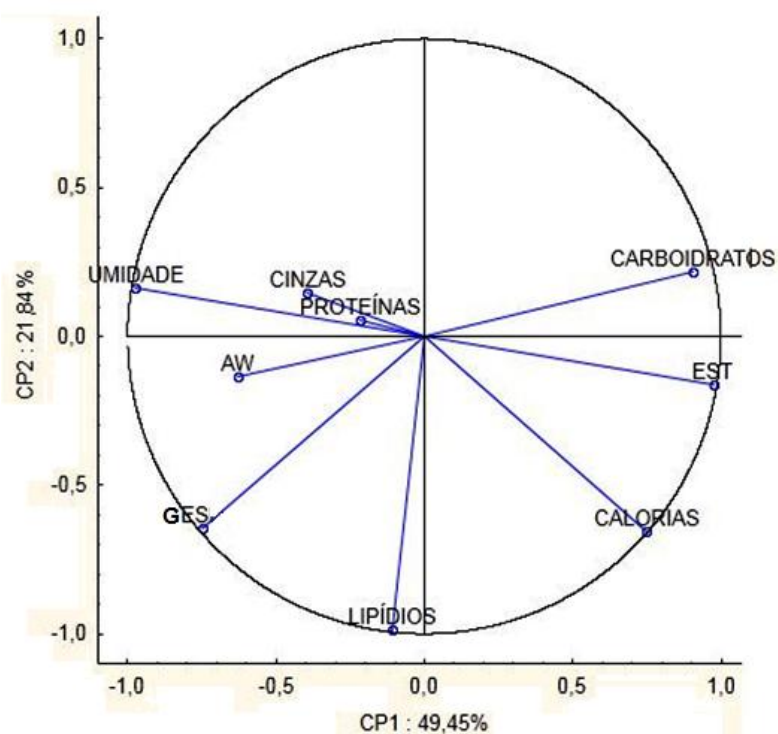


Figura 23 – Círculo de Correlação dos queijos com 180 dias.

Aos 180 dias o teor de proteínas não foi uma variável com alto poder de explicação, seu poder explicativo foi diminuindo ao longo do tempo. Os queijos PAN e PBL2 encontram-se no mesmo quadrante, como também acontece com PA2 e PBL1. PA1 e PBN estão isolados em quadrantes diferentes.

Os descritores que diferem o queijo PA1 dos demais são calorias e EST. O queijo PBN se difere dos demais com os descritores umidade, cinzas e proteínas. Já os queijos PAN e PBL2 se diferem dos outros grupos pela concentração de carboidratos, enquanto que PA2 e PBL1 se diferem dos demais pelos descritores GES, lipídios, umidade e Aw. No dendograma (Figura 24) também é possível observar a formação de grupos heterogêneos, destacando-se a amostra PBN como a que possui maior homogeneidade.

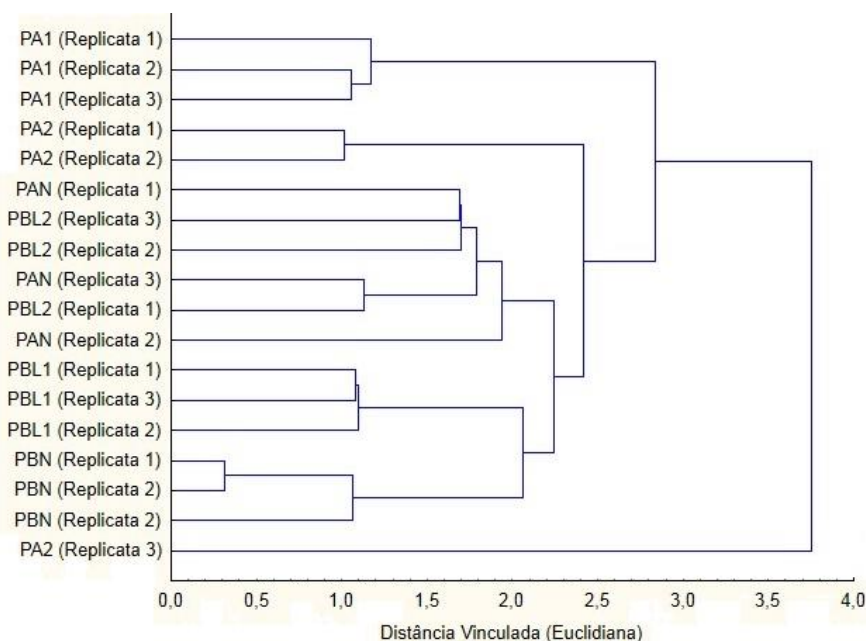


Figura 24 - Dendrograma de dissimilaridade para os queijos de 180 dias por meio do método de agrupamento do vizinho mais próximo.

5.7.4 Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas dos queijos nos remonta para conclusões positivas, com 30 e 60 dias de maturação os queijos obtiveram o resultado de $<1,0 \times 10^1$ UFC/g na Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes, ausência da bactéria *Salmonella* sp., com isso pode-se concluir que os queijos de 30 e 60 dias não apresentaram condições favoráveis para o desenvolvimento de possíveis patógenos, visto também que, os queijos foram elaborados com leite pasteurizado, o que proporciona maior inocuidade aos produtos.

A contagem de microrganismos do grupo coliforme, sobretudo os de origem fecal, indica as condições de higiene em que os queijos foram produzidos, uma vez que, tais microrganismos, comumente encontrados no leite cru, são geralmente destruídos pela pasteurização. Normalmente, a presença de coliformes fecais em alimentos esta relacionada com contaminação fecal de animais e do homem, embora a ocorrência de *Escherichia coli*

seja mais adequada para tais conclusões. A presença de indicadores de contaminação fecal provavelmente revela condições inadequadas de higiene durante a fabricação dos queijos, ficando claro que os mesmos podem estar sendo expostos a contaminação por microrganismos indesejáveis, inclusive patogênicos.

No que diz respeito a presença de *Listeria monocytogenes*, a presença dessa bactéria foi confirmada no queijo PBL1 com 30 dias de maturação, esta ocorrência pode ser uma contaminação pós-processo, através da manipulação ou o uso de utensílios não higienizados adequadamente.

Porém observou-se ausência de *L. monocytogenes* no queijo PBL1 com 60 dias de maturação, isso pode ter relação com as modificações químicas e físicas decorrentes da maturação dos queijos, o que reduziu a viabilidade da bactéria no queijo. A presença desse patógeno em 25 g de amostra classifica esse produto como impróprio para o consumo conforme legislação brasileira (BRASIL, 2001) a qual preconiza ausência de *L. monocytogenes* para queijos de média, alta e muito alta umidade.

Enfatiza-se, portanto, a importância do cumprimento das normas relativas as Boas Práticas de Fabricação, a fim de se obter produtos lácteos de qualidade, incluindo o controle sanitário do rebanho, a obtenção higiênica do leite, a conservação adequada do leite ordenhado, o controle higiênico-sanitário dos operadores, a utilização de leite pasteurizado e a limpeza e desinfecção adequada dos equipamentos e utensílios utilizados no processamento.

Em relação à Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva os resultados de $<1,0 \times 10^1$ UFC/g nos queijos com 30 e 60 dias de maturação mostra uma adequada manipulação durante e após o processamento dos queijos, não permitindo que a bactéria se desenvolvesse, servindo como indício da utilização das boas práticas de fabricação nos laticínios.

No estudo realizado por Abrahão (2008), sobre a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em queijos comercializados no estado do Paraná, observou-se a existência de uma correlação do grau e tipo de contaminação com os diferentes tipos de queijos. Os queijos classificados como mussarela em geral apresentaram baixa contaminação, o que pode estar relacionado ao tipo de processo tecnológico empregado na sua obtenção. Neste tipo de queijo não foi detectado *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas. Três amostras apresentaram estafilococos coagulase positiva superior a 10^3 UFC/g e apenas uma amostra apresentou NMP de coliformes a 45 °C superior a 1100/g de amostra. Para os queijos classificados como prato e requeijão, apenas uma amostra de queijo prato estava contaminada com *L. monocytogenes*. Não foi detectada a

presença de *Salmonella* spp. nestes tipos de queijos. A contagem de estafilocos coagulase positiva foi abaixo de 100 UFC/g do produto. De acordo com o mesmo autor, nos queijos classificados como frescos de massa crua, em duas amostras detectou-se a presença de *L. monocytogenes* (queijo Minas Frescal magro e ricota fresca) e em nenhuma das 36 amostras analisadas foi isolada *Salmonella* spp. Quatro amostras apresentaram contagens de estafilococos coagulase positiva superiores a 100 UFC/g do produto tendo sido observado nestas amostras valores que variaram de 200 a maiores que 300.000 UFC/g de produto. Um total de 6 amostras apresentou um grau de contaminação de risco potencial de coliformes a 45°C, tendo variado de 1.100 a 11.000 NMP/g de produto, sendo 4 amostras de queijo Minas Frescal e 2 amostras de ricota. Duas amostras de queijo Minas Frescal apresentaram um elevado grau de contaminação em relação a coliformes a 45 °C, superior a 11.000 NMP/g de amostra o que pode caracterizar risco eminente de contaminação por patogênicos o que os tornam impróprios para o consumo.

Deve-se observar a importância do cumprimento das normas relativas às Boas Práticas de Fabricação, a fim de se obter produtos lácteos de qualidade superior, incluindo o controle sanitário do rebanho, a obtenção higiênica do leite, a conservação adequada do leite ordenhado, o controle higiênico-sanitário dos operadores, a utilização de leite pasteurizado e a limpeza e desinfecção adequada dos equipamentos e utensílios utilizados no processamento. Fazendo-se isso pode-se garantir que os produtos atendam os padrões de qualidade microbiológica, visando proteger a saúde do consumidor, tendo em vista a severidade dos riscos resultantes da infecção que este microrganismo pode ocasionar na população de risco.

5.7.5 Perfil de textura dos queijos

A textura tem sido relatada como um atributo tão importante quanto a qualidade nutricional que afeta diretamente a aceitabilidade do produto. A Análise do Perfil de Textura (TPA), também conhecida como teste das duas mordidas (*two bite*), realizado especialmente através da simulação dos movimentos de mastigação oral humana, onde as amostras são comprimidas duas vezes, apresentando uma curva característica (Figura 25).

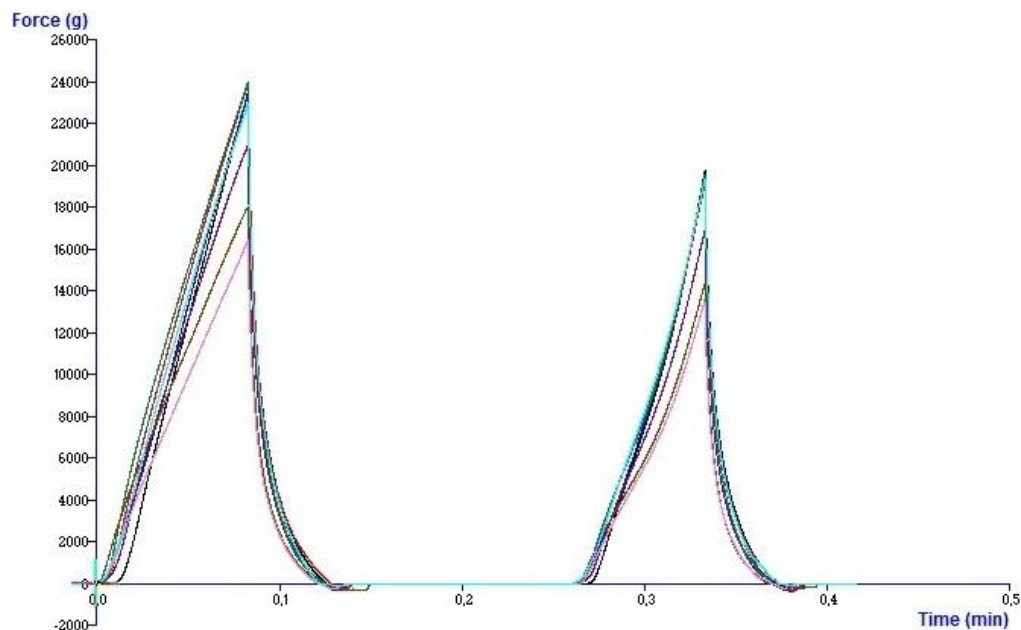


Figura 25 - TPA - Curva característica das replicatas da amostra de queijo PA1 (60 Dias).

O comportamento obtido para a análise do perfil de textura do queijo apresenta forma côncava na parte inicial da curva relativa ao primeiro ciclo de compressão (forma sigmóide), apontando de maneira geral para a maciez do queijo. Este comportamento foi semelhante ao encontrado por Silva (2013), cujas discussões dos resultados se basearam nos trabalhos de Mohsenin (1986) e Bourne (2002), ao mencionar que a parte inicial da curva para tecidos biológicos macios é geralmente côncava na direção do eixo da força; e que este é o mesmo tipo de curva normalmente encontrada para outros tipos de queijos, *marshmallows* e vegetais mais macios, respectivamente.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores médios para os atributos da análise instrumental do perfil de textura obtidos dos queijos avaliados com 30, 60 e 180 dias de fabricação armazenadas sob refrigeração.

Tabela 14 - Resultados do perfil de textura dos queijos com 30, 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Dias maturação	Dureza (g)	Elasticidade (adm)	Mastigabilidade (adm)	Adesividade (g/s)	Coesividade (adm)	Resistibilidade (adm)
Laticínio 01							
PBL1	30	20702,96 ^{ab}	0,83 ^{bA}	9462,01 ^{bA}	-205,51 ^{abA}	0,55 ^{dB}	0,16 ^{cA}
	60	11106,62 ^{cC}	0,86 ^{bA}	5918,01 ^{cB}	-315,42 ^{cB}	0,63 ^{aA}	0,17 ^{bA}
	180	23214,04 ^{abA}	0,82 ^{cA}	6732,79 ^{bB}	-145,97 ^{bc}	0,36 ^{bc}	0,08 ^{cB}
PAN	30	15486,25 ^{abA}	0,88 ^{aA}	8460,78 ^{bA}	-194,02 ^{abA}	0,61 ^{bcA}	0,19 ^{abA}
	60	18800,63 ^{bA}	0,87 ^{abA}	10084,45 ^{abA}	-212,23 ^{abcA}	0,63 ^{abA}	0,18 ^{abA}
	180	18377,19 ^{bA}	0,86 ^{abA}	6883,42 ^{ab}	-132,81 ^{bA}	0,44 ^{ab}	0,11 ^{abA}
PA1	30	17679,37 ^{abB}	0,89 ^{aA}	9006,41 ^{abA}	-255,99 ^{bA}	0,58 ^{cdA}	0,16 ^{cA}
	60	17305,82 ^{ab}	0,83 ^{cB}	7787,57 ^{bcA}	-253,56 ^{bcA}	0,55 ^{cAB}	0,15 ^{cA}
	180	19239,79 ^{bA}	0,88 ^{aA}	8183,25 ^{aA}	-92,20 ^{bB}	0,47 ^{ab}	0,13 ^{aA}
Laticínio 02							
PBL2	30	15130,81 ^{bB}	0,88 ^{abB}	8344,48 ^{bA}	-183,88 ^{aA}	0,63 ^{bA}	0,18 ^{bcA}
	60	15634,01 ^{bcB}	0,91 ^{aA}	9120,54 ^{bA}	-195,01 ^{abA}	0,64 ^{aA}	0,20 ^{abA}
	180	25339,62 ^{aA}	0,85 ^{cB}	7261,11 ^{aA}	-90,46 ^{bB}	0,33 ^{bb}	0,08 ^{cB}
PBN	30	14706,71 ^{bc}	0,89 ^{aA}	8143,89 ^{bb}	-205,45 ^{aA}	0,64 ^{abA}	0,19 ^{bA}
	60	23675,95 ^{ab}	0,89 ^{abA}	11249,05 ^{abA}	-192,07 ^{abA}	0,54 ^{bcB}	0,16 ^{bcA}
	180	27025,97 ^{aA}	0,86 ^{abA}	8090,47 ^{ab}	-25,04 ^{ab}	0,37 ^{cb}	0,10 ^{bcB}
PA 2	30	19264,61 ^{ab}	0,88 ^{aA}	11412,92 ^{aA}	-133,38 ^{aA}	0,67 ^{aA}	0,21 ^{aA}
	60	20601,17 ^{aAB}	0,89 ^{abA}	11366,30 ^{aA}	-136,79 ^{aA}	0,63 ^{abB}	0,21 ^{aA}
	180	27401,00 ^{aA}	0,87 ^{bb}	5116,76 ^{bb}	-107,25 ^{bA}	0,20 ^{cC}	0,04 ^{dB}

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrato de Sódio; PA1- Queijo com fermento A; PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrato de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

*Médias das diferentes amostras de queijo seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna significa que a mesma amostra de queijo não difere estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

g- Grama força; adm- adimensional; g/s- grama por segundo.

Os resultados fornecidos pelo teste de comparação de médias indicaram que as amostras testadas diferem significativamente ao nível de 95% de confiança em todos os parâmetros analisados. Para o parâmetro mastigabilidade ocorreram menos diferenças significativas entre os queijos nos períodos de 30 e 180 dias de maturação, onde apenas o queijo PA2 se mostrou diferente dos demais. A elasticidade do queijo PA2 também foi a única que diferiu dos outros queijos analisados. Para os outros parâmetros analisados na TPA ocorreram diferenças significativas nos três períodos de maturação.

Ao analisar as amostras de queijos, levando em consideração o tempo de maturação, não foram observadas diferenças significativas para PA1 nos parâmetros mastigabilidade e resistibilidade. O mesmo ocorreu para a mastigabilidade da amostra PBL2, adesividade de

PA2, elasticidade de PBL1 e PBN, enquanto que a amostra PAN não diferiu significativamente quanto aos parâmetros dureza, elasticidade, adesividade e resistibilidade.

Observa-se que o tempo de maturação afetou a maioria dos parâmetros e que a interação entre os tratamentos com conservante comercial (Nitrato de Sódio) e Lisozima, assim como o período de maturação afetaram significativamente os parâmetros, sugerindo que estes alteraram algum aspecto estrutural interno dos queijos ao longo do tempo.

A proteólise em queijos é a principal responsável pelas propriedades de textura, como a dureza, elasticidade, coesão, adesividade e outras propriedades emulsionantes (FOX et al., 2000). A intensidade de degradação das proteínas e as quantidades dos compostos resultantes são muito diferentes para os diferentes queijos, dependendo do tipo e quantidade de coalho, da cultura bacteriana utilizada, do teor de humidade, do pH, da porcentagem de sal e da temperatura de armazenamento (CULBERTSON et al., 2006 *apud* MOREIRA, 2011).

A dureza, que é definida como a força requerida para comprimir o queijo entre os dentes molares ou entre a língua e o palato, dando um ponto de deformação ou penetração (FOX et al., 2000), teve um aumento quando comparados os valores de 30 dias com os de 180 dias, sendo significativamente diferentes os valores encontrados para os queijos PA2, PBL1, PBL2 e PBN. Todos os queijos apresentaram resultados maiores, porém o queijo que apresentou uma diferença considerável foi o queijo PBN, que passou de 14706,71g para 27025,97g, uma diferença de 12319,26g, enquanto que o queijo que demonstrou ter uma dureza menor foi o PA1, pois este teve um aumento de 1560,42g, passando de 17679,37g para 19239,79g ao final dos seis meses de maturação. O aumento na dureza durante a maturação está relacionada com a diminuição da umidade que atua como um plastificante na matriz da proteína, tornando-a menos elástica (FOX et al., 2000).

Observando os resultados da dureza na Tabela 14, pode-se concluir que o queijo mais duro é o PBN, porém a análise estatística indica que a dureza desse queijo é considerada igual a dos queijos PA2, PBL1 e PBL2. Ainda pela observação dos resultados na Tabela 19, o queijo que pode ser considerado o mais macio, ou mole é o PA1, que se mostrou estatisticamente semelhante aos queijos PA1 e PBL1. De acordo com Alvarenga (2000), a dureza de um queijo está associada ao teor de gordura que age como um lubrificante, reduzindo a tensão necessária para romper a matriz proteica (BRYANT et al., 1995). O queijo é um material sólido, macio, constituído por uma rede composta principalmente de proteína, água e lipídios (WALSTRA, 2003), dessa forma, as propriedades mecânicas do queijo estão relacionadas com a composição da rede, estrutura, e as interações entre as moléculas no interior da rede (LUCY et al., 2003).

Jaster et al. (2014) avaliaram a textura de queijos Parmesão e obtiveram para o parâmetro dureza uma média de 2522,81 a 11471,69 g; Silva (2013) observou o comportamento mecânico do queijo de Coalho e obteve valores entre 9664,00 g e 12000,20 g; enquanto Andrade et al. (2007), ao analisarem o queijo Coalho, verificaram que os resultados estavam na faixa de 2067,00 g a 5966,54 g. O queijo de coalho é um queijo consumido com até 10 dias de fabricação, ou seja, por não possuir um tempo de maturação, possui uma consistência macia ou mole, devido a sua umidade relativamente alta, o que resulta em valores de dureza bem abaixo dos observados nos queijos maturados. Em outros estudos pode-se observar comportamentos semelhantes como o de Norte (2010), pesquisando sobre a textura de queijos Minas Frescal, determinou valores entre 1625,45 e 9852,64 g. A dureza encontrada por (BURITI et al., 2008) foi de 573,08 g a 1043,18 g para os queijos frescos cremosos de muita alta umidade.

Na maturação do queijo Castelmagno, queijo Italiano maturado, Bertolino et al. (2011) observaram um aumento da dureza, passando de 2366,79 g (23,20 N) (Newton) aos 30 dias de maturação para 4400,14 g (43,15 N) aos 150 dias, valores menores aos encontrados nesse estudo por se tratar de um queijo macio, resultado da proteólise secundária, que se produz durante a fase de cura sob o efeito da microbiota de superfície .

De acordo com Tunick et al. (1997), a proteólise está correlacionada com o decréscimo dos valores dos parâmetros de textura, entre eles a dureza e a elasticidade, porém nesse estudo, verificou-se um aumento da dureza, tal fato pode ser explicado pelo aumento da sinerese e conseqüente diminuição da umidade desses queijos.

A elasticidade, definida como a medida da distância recuperada pelo queijo após uma deformação num período de tempo até que ocorra a segunda deformação (BERTOLINO et al., 2011); apresentou diminuição nos valores ao analisar-se os queijos com seis meses de maturação, apenas o queijo PA2 teve diferença significativa nesse parâmetro. Os resultados obtidos neste trabalho foram entre 0,82 a 0,88 De acordo com Law (2001), os peptídeos, produtos da ação do coagulante, agem nas primeiras semanas de maturação, e são essenciais para suavizar a textura borrachenta e elástica do queijo. Jaster et al. (2014) obteve uma média de 0,60 a 0,86 para esse parâmetro em queijo Parmesão. Na pesquisa de Silva (2013), com queijo coalho, foram encontrados resultados de 0,86 a 0,88. Andrade et al. (2007) encontraram 0,79 a 0,89 de elasticidade para o queijo Coalho. Em Norte (2010), os queijos Minas Frescal apresentaram elasticidade de 0,84 a 0,91.

Segundo Valle et al. (2004), em pesquisa realizada com o queijo mussarela, a elasticidade média foi de 0,71, valor um pouco menor quando comparado com os encontrados

neste trabalho. O queijo fresco cremoso estudado por Buriti et al. (2008), teve como resultado para a elasticidade valores entre 0,89 a 0,90, também muito semelhantes aos observados nesta pesquisa.

A mastigabilidade é força e energia, respectivamente, requeridas para mastigar um queijo até sua homogeneidade para engolir (BERTOLINO et al., 2011), e apresentou valores menores aos 180 dias de maturação quando comparados aos iniciais, mas com diferença significativa apenas nos queijos PA2, PBL1 e PAN. O queijo PA2 apresentou a maior diminuição dos resultados observados, passou de 11412,92 para 5116,76 resultando, portanto em um queijo mais macio, que necessita de menos energia na mastigação para ser deglutido. O resultado do parâmetro mastigabilidade apresentado para o queijo mussarela, descrito em Valle et al. (2004), foi de 845,70, valor abaixo dos encontrados para os queijos analisados. Para o queijo Coalho, a pesquisa realizada por Andrade et al. (2007), encontrou valores entre 1042,16 a 3366,13. Norte (2010) verificou para o queijo Minas Frescal uma mastigabilidade entre 751,82 a 5900,98. Na pesquisa de Jaster et al. (2014), a mastigabilidade dos queijos Parmesão ficou entre 1400,15 a 6336,98, resultados abaixo dos encontrados para os queijos “Santo Giorno”. Estas diferenças podem estar correlacionadas com o tipo de queijo, composição físico-química, método de fabricação e tempo de maturação.

Em relação ao parâmetro adesividade, definido como o trabalho necessário para superar a força de atração entre o queijo e a superfície do *probe* utilizado (TUNICK, 2000), verificou-se um aumento nos valores com o passar dos períodos de maturação. A maior diferença pode ser verificada no queijo PBN, que passou de um valor de -205,45 para -25,04 g/s. A simulação do *probe* como se fosse uma mordida, mostrou que quanto mais maturado o queijo, mais facilmente ele se solta do *probe*, ou seja, não adere ao palato durante a mastigação. No estudo de Valle et al. (2004), com queijo mussarela, a média de valores encontrados foi de -183,20 g/s, estando próximos aos dos queijos elaborados. Jaster et al. (2014) encontraram valores de adesividade entre -0,59 a -6,24 g/s, resultados que podem ser considerados baixos quando compara-se com a pesquisa descrita anteriormente e com os queijos “Santo Giorno”. Buriti et al. (2008) observaram que a adesividade de um queijo fresco cremoso foi de -1584,66 g/s à -2276,04 g/s, o que evidencia uma grande adesão do queijo fresco cremoso ao *probe*, e conseqüentemente aos dentes do consumidor, considerando que este se classifica como um queijo de muita alta umidade.

A coesividade em queijos, definida como a medida da força das ligações entre as proteínas (TUNICK, 2000), apresentou diminuição nos resultados ao longo do período de armazenamento e comprovada com o teste de significância, ou seja, as forças das ligações das

proteínas diminuíram com o passar do tempo, ou seja, o queijo pode ser mais facilmente deformado, antes da ruptura. Todos os queijos analisados tiveram diferença significativa nos períodos de armazenamento. O queijo que teve uma maior diminuição da coesividade foi o PA2 que passou de 0,67 para 0,20. As características de textura dos queijos são afetadas pela proteólise, pois essa promove alterações estruturais devido à quebra da rede proteica responsável pela integridade da matriz. A coesividade de queijos Parmesão pesquisada por Jaster et al. (2014) apresentou resultados médios de 0,35 a 0,80. Em Silva (2013), foram encontrados valores para o queijo Coalho de 0,62 a 0,69, enquanto que para os queijos analisados nesse trabalho os resultados variaram de 0,20 a 0,47 ao término dos 180 dias de maturação. Andrade et al. (2007) também observaram o comportamento instrumental da textura em queijos Coalho e obtiveram valores de 0,49 a 0,67. Pode-se dizer que as forças das ligações das proteínas dos queijos maturados é menor quando comparado com as do queijo coalho, que trata-se de um queijo fresco. O queijo mussarela, estudado por Valle et al. (2004), apresentou como resultado uma média de 0,53, um valor intermediário aos relatados anteriormente, este queijo trata-se de um queijo de massa filada, sem maturação. Buriti et al. (2008) verificou valores de 0,47 a 0,52 para o queijo fresco cremoso, enquanto que Norte (2010) encontrou resultados de 0,60 a 0,68, mesmo se tratando de queijos Minas Frescal.

A resistibilidade, que demonstra a capacidade do queijo voltar a sua posição normal após uma primeira compressão (CHEVANAN et al., 2006), apresentou valores menores aos 180 dias de maturação quando comparado com as análises iniciais de 30 dias. Sendo, porém considerada como diferença significativa os resultados dos queijos PA2, PBL1, PBL2 e PBN. O queijo PA2 foi o que apresentou maior diminuição, passou de 0,21 inicialmente para 0,04. O queijo que demonstrou a menor diferença entre os períodos foi o PA1, que inicialmente estava com uma resistibilidade de 0,16 e passou para 0,13. Norte (2010) observou resultados de 0,28 a 0,41 para queijos Minas Frescal, valores maiores quando comparados com os analisados nos queijos maturados com o fermento endógeno. Os queijos Parmesão analisados por Jaster et al. (2014) resultaram numa média de 0,17 a 0,44, resultados diferentes aos encontrados nesta pesquisa cujo valor máximo encontrado foi de 0,21.

A textura do queijo modifica-se durante a maturação, devido à diminuição da A_w , redistribuição de sal e alterações do pH e pela produção de ácido láctico. A extensão da proteólise, a percentagem de água, proteína, gordura e sal afetam a textura, permitindo obter diferenças entre os diversos tipos de queijo (FOX et al., 2000).

De modo geral, verifica-se que os queijos elaborados quando comparados a queijos frescos apresentaram maior dureza, mastigabilidade, elasticidade, isto porque, durante o

período de maturação ocorrem alterações nos teores de proteína, gordura e umidade do produto.

5.7.6 Análise de cor

A Tabela 15 apresenta os resultados obtidos da análise instrumental de cor dos queijos “Santo Giorno” elaborados com fermento endógeno.

Tabela 15 - Resultados da análise de cor dos queijos com 30, 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Maturação (em dias)	Coordenada L*	Coordenada a*	Coordenada b*
Laticínio 01				
PBL1	30	78,28 ^{bC} ±0,51	-7,30 ^{abAB} ±0,11	36,98 ^{abA} ±0,67
	60	82,62 ^{aA} ±0,30	-7,05 ^{aB} ±0,24	36,05 ^{aA} ±0,14
	180	79,75 ^{aB} ±0,56	-7,64 ^{aA} ±0,11	36,81 ^{aA} ±0,29
PAN	30	82,00 ^{aA} ±1,44	-6,96 ^{abB} ±0,11	35,19 ^{bA} ±1,36
	60	78,44 ^{cB} ±0,59	-7,22 ^{aA} ±0,05	36,32 ^{aA} ±0,31
	180	77,76 ^{aB} ±0,60	-7,68 ^{aA} ±0,25	37,20 ^{aA} ±0,41
PA1	30	82,09 ^{aA} ±0,36	-6,94 ^{abB} ±0,10	35,06 ^{abA} ±0,05
	60	78,42 ^{cAB} ±0,52	-7,24 ^{aAA} ±0,20	36,80 ^{aA} ±0,84
	180	73,51 ^{bB} ±3,62	-7,65 ^{aA} ±0,24	36,46 ^{aA} ±1,13
Laticínio 02				
PBL2	30	83,81 ^{aA} ±0,64	-7,09 ^{bB} ±0,05	33,01 ^{bA} ±0,46
	60	82,77 ^{aA} ±0,64	-7,41 ^{aB} ±0,05	34,06 ^{bA} ±0,96
	180	79,69 ^{aB} ±0,69	-7,82 ^{aA} ±0,21	34,10 ^{bA} ±0,55
PBN	30	83,52 ^{aA} ±0,50	-7,10 ^{abB} ±0,04	33,70 ^{bB} ±0,61
	60	82,22 ^{aA} ±0,50	-7,08 ^{aB} ±0,04	34,26 ^{bAB} ±0,61
	180	73,94 ^{bB} ±1,70	-7,74 ^{aA} ±0,08	35,60 ^{abA} ±1,07
PA2	30	81,70 ^{abA} ±1,13	-7,09 ^{abB} ±0,12	33,15 ^{bA} ±0,47
	60	80,84 ^{bA} ±0,59	-7,45 ^{aA} ±0,13	33,70 ^{bA} ±0,39
	180	77,4 ^{aA} ±3,84	-7,40 ^{aA} ±0,06	34,93 ^{abA} ±1,17

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrato de Sódio; PA1- Queijo com fermento A; PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrato de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

*Médias das diferentes amostras de queijo seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna significa que a mesma amostra de queijo não difere estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

Em geral, as amostras apresentaram alta luminosidade (L*), com predominância da componente amarela (b*), e amostras dentro do espectro verde (a*), com pequenas variações entre si. Observa-se que no início da maturação os queijos apresentam maior umidade, por consequência maior luminosidade, uma vez que, ainda não houve formação de casca e nem perda de umidade, o que ocorre com o tempo maior de maturação. Van Dender (1989) citado

por Bernardi et al. (2007), relata que a presença do pigmento biliverdina associado à α -caseína do leite, que precipita juntamente com as demais proteínas, pelo abaixamento do pH e calor, produz um precipitado esverdeado. Tal pigmento é reduzido de forma reversível à bilirrubina, de cor amarela, durante a estocagem.

Tem sido sugerido que a luminosidade (L^*), tanto interna quanto externamente, diminui com a maturação (ÁLVAREZ et al., 2007). Esse escurecimento dos queijos acontece pela ação das riboflavinas e carotenóides, principais pigmentos responsáveis pela coloração dos queijos. Os carotenóides apresentam característica lipossolúvel, determinando a coloração amarelada dos queijos em função da concentração de lipídios no produto (NOZIÈRI et al., 2006).

Além da obtenção das coordenadas L^* , a^* e b^* foram calculados os valores de ΔE entre as amostras. O ΔE é a diferença de cor total, sendo que um valor de ΔE menor que 2 representa uma diferença imperceptível e um ΔE com valores acima de 10 demonstra que as cores são diferentes. As Tabelas 16, 17 e 18 apresentam os resultados para o ΔE nos três períodos de maturação.

Tabela 16- Valores de ΔE das amostras de queijo de 30 dias.

	PBL1	PAN	PA1	PBL2	PBN	PA2
PBL1						
PAN	4,13					
PA1	4,28	0,16				
PBL2	6,81	2,84	2,68			
PBN	6,18	2,14	1,98	0,75		
PA2	5,12	2,06	1,96	2,13	1,92	

Pode-se verificar que avariação das cores entre amostras resultou em diferenças imperceptíveis, ou seja, as amostras apresentaram valores menores de 10. As amostras que apresentaram o valor de ΔE mais alto foram PBL1/PBL2 com um valor de 6,81.

Tabela 17- Valores de ΔE das amostras de queijo de 60 dias.

	PBL1	PAN	PA1	PBL2	PBN	PA2
PBL1						
PAN	4,19					
PA1	4,26	0,47				
PBL2	2,02	4,90	5,14			
PBN	1,83	4,31	4,56	0,68		
PA2	2,98	3,57	3,93	1,98	1,54	

Os queijos de 60 dias apresentaram também valores de ΔE abaixo de 10, conferindo-lhes uma diferença não significativa para a cor de todos os queijos. O valor mais elevado de ΔE foi 5,14 entre os queijos PA1/PBL2.

Tabela 18- Valores de ΔE das amostras de queijo de 180 dias.

	PBL1	PAN	PA1	PBL2	PBN	PA2
PBL1						
PAN	0,81					
PA1	6,25	5,59				
PBL2	2,71	3,17	6,62			
PBN	5,93	5,35	0,97	5,94		
PA2	3,00	2,84	4,22	2,44	3,56	

As cores dos queijos com 180 dias não tiveram valores de ΔE expressivos, resultando portanto em uma diferença insignificante. O valor mais elevado de ΔE foi encontrado para os queijos PA1/PBL2 (6,62).

De acordo com os dados da Tabela 15, o parâmetro L^* (Luminosidade, que indica a capacidade de um objeto em refletir ou transmitir luz, variando numa escala de zero a 100), apresentou de modo geral um decréscimo de valores comparando-se os tempos de 30, 60 e 180 dias de maturação, exceto para a amostra PBL1 que apresentou um aumento do período de 30 para 60 dias. (Figura 26). A média dos valores de L^* dos queijos ficaram entre $73,51 \pm 3,62$ a $83,81 \pm 0,64$.

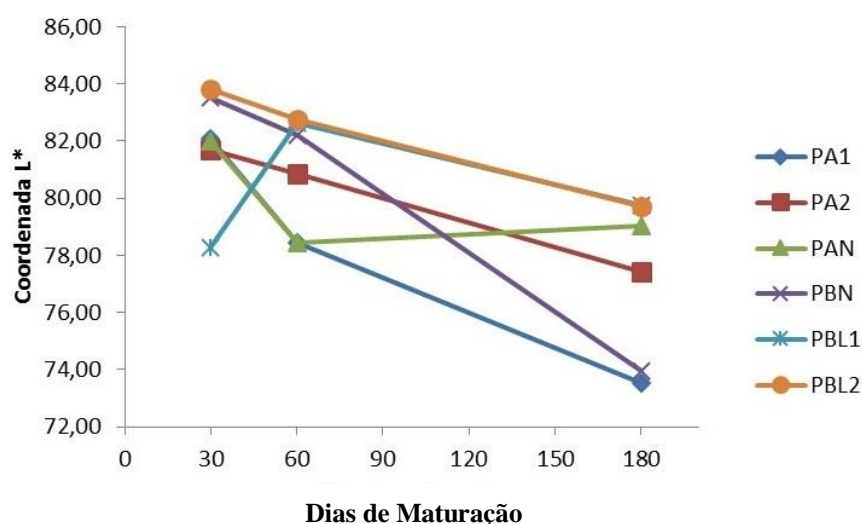


Figura 26 - Coordenada Luminosidade (L^*) dos queijos nos três períodos de maturação.

Os queijos que apresentaram uma maior queda nos valor (L^*) foram os queijos PA1 e PBN, ou seja, estes apresentaram um maior escurecimento, fazendo com que o valor da

coordenada L^* apresentasse leitura mais baixa. O queijo PBL1 apresentou com 60 dias de maturação uma elevação em relação a esse parâmetro e posteriormente um decréscimo no período de 180 dias de maturação, ficando praticamente equiparado com o valor de PBL2. Os queijos PBL2 e PA2 foram os que tiveram menor redução no valor da coordenada L^* até os 180 dias de maturação, apresentando portanto uma coloração mais clara que os demais. O PAN teve um comportamento diferenciado, dos 30 aos 60 dias diminuiu a luminosidade, porém dos 60 para 180 dias o valor aumentou.

As diferenças encontradas em relação à luminosidade podem ser explicadas pelo fato de que em cada período de maturação, as análises foram realizadas com queijos diferentes, escolhidos aleatoriamente, mas do mesmo lote, porém estes podem apresentar diferenças em consequência do local e condições em que foram mantidos na câmara de maturação.

De acordo com os testes de Tukey (Tabela 15), a Luminosidade (L^*) difere estatisticamente entre o queijo PBL2 de 30 dias com os demais queijos do mesmo período de maturação. Os queijos PA1, PAN, PA2 com 60 dias de maturação diferem estatisticamente dos demais com o mesmo tempo de maturação. Os queijos com 180 dias não apresentam diferença estatística.

Em relação à análise estatística do mesmo queijo nos diferentes períodos de maturação, observou-se que o queijo PBL1 foi o único que apresentou diferença significativa ao nível de 95% ao longo do armazenamento e o queijo PA2 não teve diferença significativa em nenhum período.

Os queijos PAN e PA1 com 60 e 180 dias, mostraram-se diferentes dos 30 dias, enquanto que PBN e PBL2 mostraram-se com diferença estatística significativa dos 180 dias com 30 e 60 dias de maturação.

Os queijos Minas Frescal analisados por Norte (2010) tiveram como resultado para o parâmetro L^* valores entre 87,83 a 90,28, a^* variando de -0,59 a 0,38 e b^* entre 11,31 a 13,61, valores que quando comparados com os da Tabela 15, mostram que os queijos analisados apresentaram uma coloração mais escura, pois os valores de L^* estiveram entre 73,94 a 79,69, o que significa que os queijos, em decorrência do tempo de maturação de 180 dias, tiveram uma perda da luminosidade tendendo para uma coloração mais escura (amarela). Por serem queijos maturados, os queijos elaborados apresentaram ao final dos 180 dias, valores de a^* de -7,82 a -7,40, valores do parâmetro b^* entre 34,10 a 37,20.

Freire (2009) ao estudar o queijo Minas Frescal obteve valores médios de L^* de 93,11 a 93,92, para o a^* valores entre 14,44 a 14,99 e b^* de -0,99 a -1,72. No estudo de Borba (2013) sobre a Ricota cremosa, a média dos parâmetros de cor obtidos foram 93,84 para L^* , -

2,81 ± 0,25 para *a e 10,93 ± 0,35 para *b. Ao se comparar os resultados de *a e *b com os do queijo Minas Frescal, conclui-se que os queijos com fermento endógeno estão numa faixa de cores acima das dos queijos Minas e Ricota, com tendência para a cor amarela.

Em Jaster et al. (2014) a cor da superfície de doze queijos tipo Parmesão também foi determinada considerando os parâmetros L*, a* e b* e tendo os resultados expressos em índice de brancura (WI), onde o branco corresponde a 100, os resultados médios obtidos foram de 55,52 ± 0,64 a 66,97 ± 0,54 de brancura, valores menores quando comparam-se com os valores de *L encontrados para os queijos analisados. Em Furtado (2008), em pesquisa realizada em queijos Reino, verificou-se um valor médio de L* entre 67,21 a 74,37, valores considerados bem menores dos encontrados para os queijos “Santo Giorno”, visto que o queijo Reino também é um queijo maturado, porém com a adição de corantes.

O parâmetro a* que representa as cores vermelha (+) a verde (-) dos queijos “Santo Giorno” pode ser observado na Figura 27.

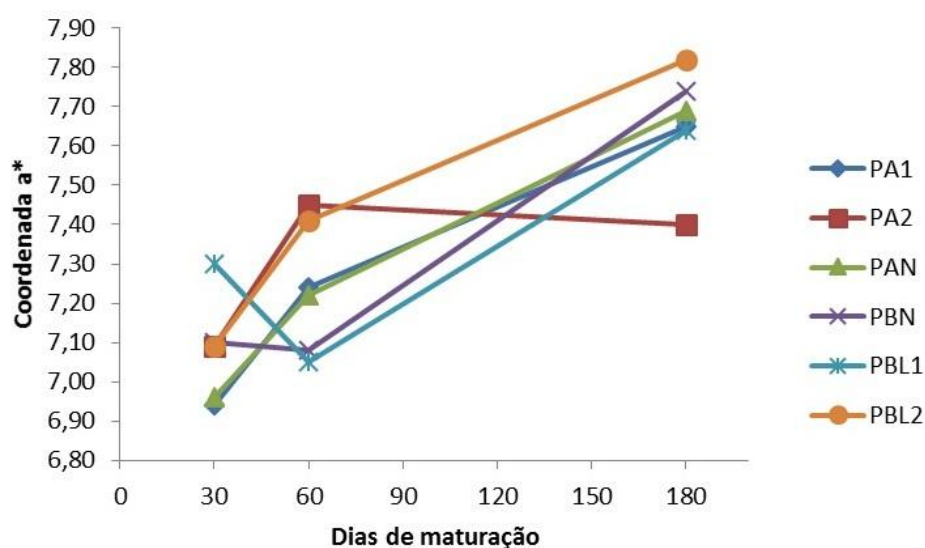


Figura 27 - Coordenada das cores vermelha (+) a verde (-) (a*) dos queijos nos três períodos de maturação.

Os queijos PBL2, PA1, PAN, apresentaram o mesmo comportamento, crescendo em seus valores de a* linearmente até os 180 dias de maturação. Os queijos PBL1, PBN e PA2 tiveram diferenças no que diz respeito aos demais, o PA2 aumentou o valor de a* dos 30 para 60 dias, porém apresentou um declive dos 60 para os 180 dias. Os queijos PBL1 e PBN decaíram dos 30 para os 60 dias, passando a aumentar até os 180 dias. Essas variações podem ser decorrentes da variação entre um queijo e outro, pois para as análises dos 30, 60 e 180 dias

de maturação escolheu-se aleatoriamente os queijos, podendo estes, apresentar diferenças quanto à coloração devido ao lugar onde estavam maturando, se estavam expostos em um local de maior ou menor incidência de umidade, temperatura, iluminação ou ventilação.

Pelo teste de Tukey, com nível de significância de 95% pode-se observar na Tabela 19 que o queijo PBL2 30 dias difere estatisticamente do queijo PA1 30 dias não havendo diferença significativa entre os demais queijos. Os queijos com 60 e 180 dias de maturação não apresentaram diferença significativa entre si.

Quando comparados os resultados de a^* para os mesmos queijos, verificando o tempo de maturação, percebeu-se que, os queijos PBN 180, PBL2 180 e PAN 180 diferiram significativamente dos queijos de 30 e 60 dias de maturação. O queijo PBL1 60 difere do PBL1 180 dias e o PA1 30 difere significativamente do PA1 180 dias. O queijo PA2 mostrou-se estatisticamente diferente em relação à coordenada a^* com os queijos PA2 60 e 180 dias.

A Figura 28 traz as alterações ocorridas nos queijos em relação ao parâmetro (b^*).

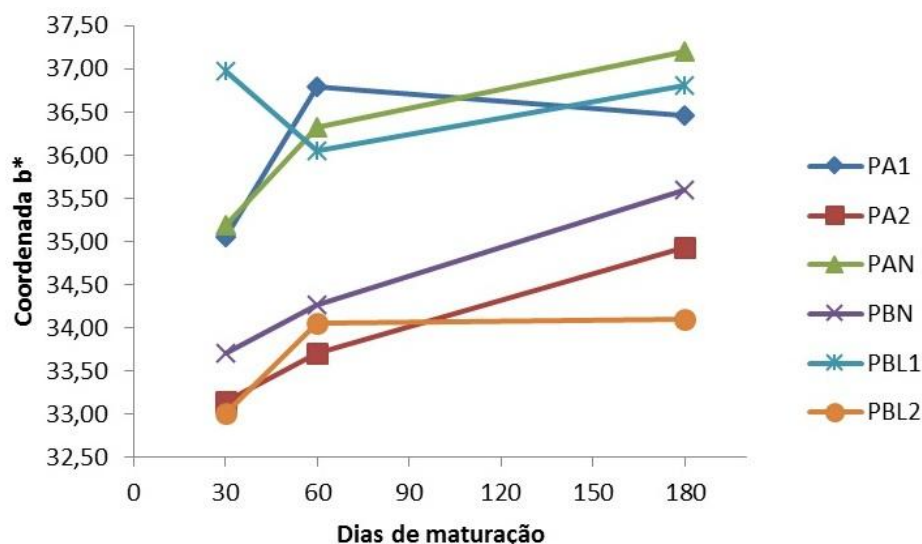


Figura 28 - Coordenada das cores azul (-) a amarelo (+) (b^*) dos queijos nos três períodos de maturação.

Foi possível verificar que a coordenada b^* elevou-se no decorrer dos períodos de maturação para os queijos PBL2, PA2, PBN e PAN. Os queijos PA1 e PBL1 apresentaram um comportamento diferenciado. O queijo PBL1 teve um decréscimo no valor de b^* dos 30 para os 60 dias de maturação, voltando a aumentar dos 60 para 180 dias. O queijo PA1 apresentou o valor de b^* aumentado de 30 para 60 dias, caindo dos 60 para 180 dias de maturação. Cabe ressaltar o fato da diferença nos valores de b^* observados entre os queijos elaborados e maturados nos dois laticínios. Os queijos PBL1, PA1 e PAN, elaborados e maturados no laticínio 01 apresentaram-se com valores de b^* mais elevados quando comparados com PBL2, PA2 e PBN elaborados e maturados no laticínio 02. Este fato pode

ter sido influenciado pelas diferenças existentes nas câmaras de maturação, visto que, haviam diferenças na temperatura, umidade e ventilação. A exposição à luz induz a degradação de lipídios, proteínas e vitaminas, causando a mudança de cor (NOLLET; TOLDRÁ, 2010).

Pelo teste de diferença significativa, o valor da coordenada b^* apresentou diferença significativa entre os queijos PAN, PBN e PA2 frente o queijo PBL2, ambos de 30 dias. Com relação aos queijos de 60 dias, observou-se diferença significativa de b^* entre o queijo PA2 e PA1, PAN, PBL1. Para os queijos de 180 dias de maturação, o teste de Tukey indicou diferença significativa entre o queijo PBL2 e PA1, PAN, PBL1.

Ao verificar se existia diferença significativa para a coordenada de cor b^* entre os mesmos queijos, mas nos períodos de maturação, concluiu-se que, apenas o queijo PBN apresentou diferença.

5.7.7 Análise sensorial

A análise sensorial é um método científico para medir as respostas humanas aos estímulos externos. Os testes são realizados através de procedimentos específicos que foram estabelecidos com base em observações científicas do comportamento humano. Os resultados podem ser objetivos ou subjetivos, dependendo da finalidade específica e procedimento sensorial selecionado (FOEGEDING; DRAK, 2007).

Inicialmente foi avaliada a frequência de consumo de queijos como uma forma de expressar hábitos alimentares e fatores que estão associados à importância nutricional e econômica (Figura 29).

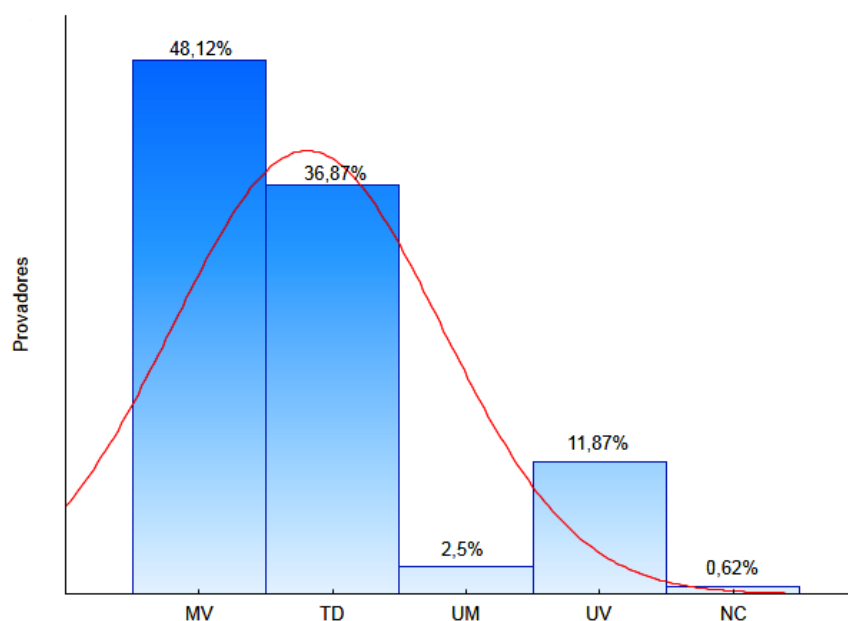


Figura 29– Frequência de consumo de queijos dos provadores nas análises sensoriais. MV- Mais de uma vez por semana; TD- Todos os dias; UM- Uma vez por mês; UV- Uma vez por semana; NC- Não consome.

Em relação à frequência de consumo de queijos (Figura 29) pode-se observar que os provadores são consumidores assíduos de queijo, pois, 36,87% disseram consumir Todos os dias (TD), 48,12% Mais de uma vez por semana (MV), e 11,87% Uma vez por semana (UV)..

O consumo de queijos pela população brasileira vem aumentando nos últimos anos devido ao aumento do poder aquisitivo. O país atualmente é o sexto maior produtor no mundo e consome 4 kg de queijo *per capita* no ano (SEBRAE, 2014). Segundo os dados divulgados pela Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), em 2011 o país produziu 867 mil toneladas, aumentando a produção em 9,4% com relação a 2010.

Fatores econômicos e demográficos podem ser apontados como indicativos do perfil dos consumidores de queijos. O consumo de produtos regionais, como também a ascensão social, tem gerado consequências importantes no perfil dos consumidores, ao agregar na sua cesta de consumo uma gama maior de produtos, como os alimentos industrializados.

Apesar do aumento no consumo de queijos, percebe-se que a apreciação dos queijos finos, ainda depende de muitos fatores significativos. Para Resende (2000), o crescimento da cadeia dos queijos finos no país tem ocorrido de forma bem mais lenta que a dos queijos comuns, pois, além de demandarem condições de produção e maturação muito específicas, possuem preços bem mais elevados, sendo seu público-alvo principalmente as classes A e B.

Nonnenmacher (2009) salienta que o espaço existente para o crescimento do mercado de queijos no Brasil, mais especificamente o de queijos finos, é grande, mas para explorá-lo adequadamente, exige-se que se conheçam melhor as suas principais características.

Os diferentes grupos de provadores nos períodos de maturação (60 e 180 dias), composto por 80 pessoas pertencentes à comunidade universitária da UTFPR (professores, funcionários e alunos), são apresentados nas Figuras 30 e 31.

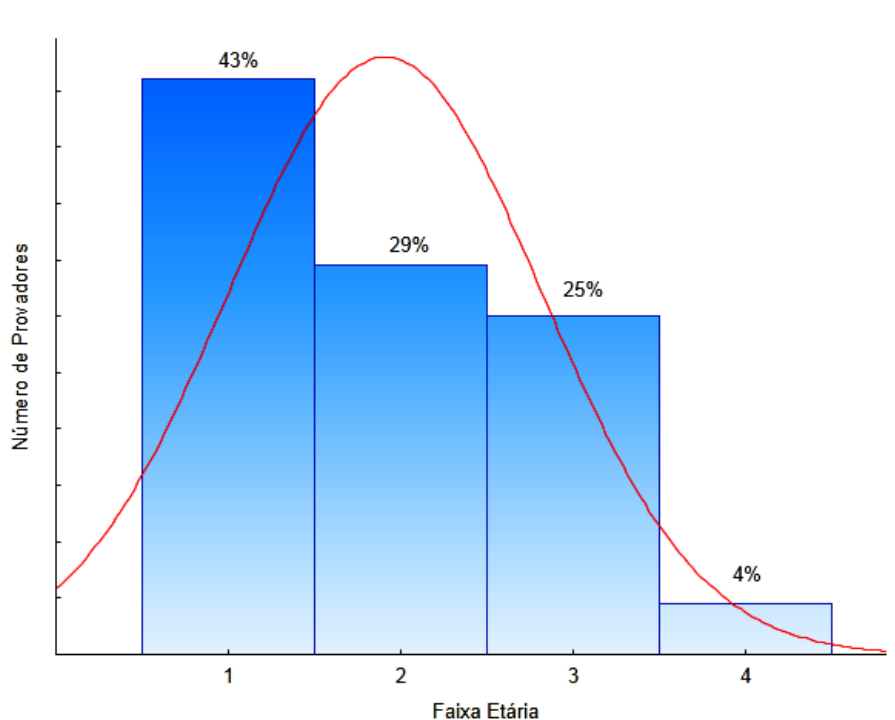


Figura 30- Faixa etária dos provadores na análise sensorial dos queijos com 60 dias de maturação. **Faixa 1-** Menores de 25 anos, **Faixa 2-** de 25 a 35 anos, **Faixa 3-** 36 a 50 anos, **Faixa 4-** Maiores de 50 anos.

Na análise sensorial dos queijos com 60 dias de maturação, a maioria dos participantes possuiu idade inferior a 25 anos (43%), correspondendo a um grupo da população mais jovem. No grupo que abrange a faixa dos 26 aos 50 anos foram inqueridos 54%. Quanto a variável sexo, dos 80 provadores, 43% eram do gênero masculino e 57% do feminino.

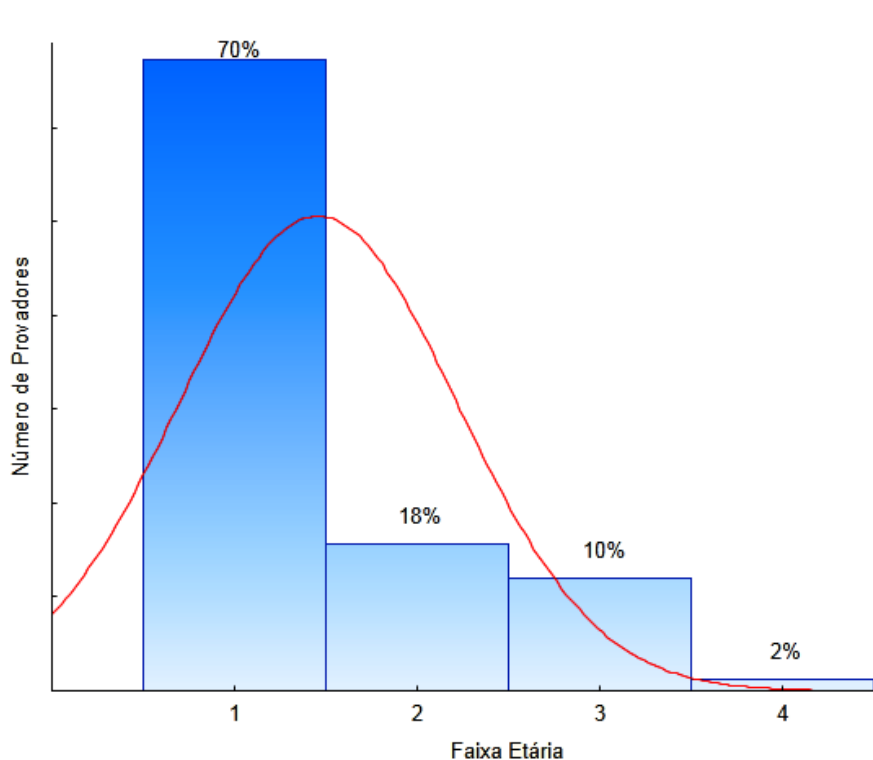


Figura 31- Faixa etária dos provadores na análise sensorial dos queijos com 180 dias de maturação. **Faixa 1-** Menores de 25 anos, **Faixa 2-** de 25 a 35 anos, **Faixa 3-** 36 a 50 anos, **Faixa 4-** Maiores de 50 anos.

Na análise sensorial dos queijos com 180 dias de maturação, a maioria dos participantes estava na faixa etária de menor de 25 anos (70%), dos 80 provadores, 62% eram do gênero masculino e 38% do feminino.

A sociedade brasileira conta atualmente com 165,5 milhões de consumidores na área urbana com 91,5 milhões destes pertencentes à faixa etária dos 20 aos 49 anos, compondo a faixa dos economicamente ativos, e outros 43,2 milhões estão com 50 anos ou mais (ECOMMERCEBRASIL, 2013).

Na Tabela 19 são apresentadas as médias e os desvios padrão dos cinco atributos avaliados (aparência, cor, cheiro, textura e sabor) no teste de aceitação dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.

Tabela 19- Médias e desvio-padrão dos atributos avaliados no teste de aceitação sensorial dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Maturação (em dias)	Aparência	Cor	Cheiro	Textura	Sabor
Laticínio 01						
PBL1	60	4,46 ^{aA} ±0,72	4,36 ^{aA} ±0,83	4,00 ^{aA} ±0,85	4,37 ^{aA} ±0,78	4,01 ^{aA} ±0,81
	180	3,75 ^{bB} ±0,83	4,13 ^{aA} ±0,82	3,95 ^{abA} ±0,76	4,05 ^{abA} ±0,84	3,87 ^{abB} ±0,94
PAN	60	4,31 ^{aA} ±0,85	4,40 ^{aA} ±0,75	3,97 ^{aA} ±0,89	4,28 ^{aA} ±0,79	4,21 ^{abA} ±0,97
	180	4,12 ^{abA} ±0,76	4,12 ^{aA} ±0,73	4,05 ^{aA} ±0,82	4,05 ^{abA} ±0,84	4,17 ^{abA} ±0,85
PA1	60	4,17 ^{aA} ±0,92	4,30 ^{aA} ±0,90	3,80 ^{aA} ±1,02	4,16 ^{aA} ±0,87	3,68 ^{bA} ±1,14
	180	3,96 ^{abB} ±0,78	4,10 ^{aA} ±0,72	4,10 ^{aA} ±0,66	4,16 ^{aA} ±0,84	4,27 ^{ab} ±0,74
Laticínio 02						
PBL2	60	4,42 ^{aA} ±0,77	4,32 ^{aA} ±0,91	3,98 ^{aA} ±0,97	4,25 ^{aA} ±0,92	4,13 ^{abA} ±1,02
	180	4,21 ^{aA} ±0,66	4,31 ^{aA} ±0,68	4,01 ^{abA} ±0,81	3,95 ^{abA} ±0,84	3,70 ^{bB} ±1,15
PBN	60	4,42 ^{aA} ±0,72	4,41 ^{aA} ±0,75	4,18 ^{aA} ±0,76	4,32 ^{aA} ±0,85	4,08 ^{abA} ±0,93
	180	4,13 ^{aA} ±0,88	4,32 ^{aA} ±0,82	3,67 ^{bB} ±1,04	3,82 ^{abB} ±0,91	3,21 ^{dB} ±1,31
PA2	60	4,27 ^{aA} ±0,81	4,36 ^{aA} ±0,79	3,97 ^{aA} ±0,88	4,15 ^{aA} ±0,90	3,98 ^{abA} ±1,03
	180	3,83 ^{abB} ±1,01	4,05 ^{aA} ±0,88	3,93 ^{abA} ±0,83	3,71 ^{bB} ±1,05	3,72 ^{bcA} ±1,06

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrato de Sódio; PA1- Queijo com fermento A; PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrato de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

*Médias das diferentes amostras de queijo seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna significa que a mesma amostra de queijo não difere estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

Escala de cinco pontos- 1 (desgostei muito), 2 (desgostei), 3 (nem desgostei, nem gostei), 4 (gostei) e 5 (gostei muito)

Para a análise sensorial dos queijos com 60 dias, verificou-se que não houve diferença significativa para os atributos aparência, cor, cheiro e textura. Apenas o atributo sabor mostrou diferença entre os queijos PBL1 e PA1, PA2. O atributo aparência ficou com médias de nota entre 4,17±0,92 a 4,46±0,72. A cor obteve notas entre 4,30±0,90 a 4,41±0,75. O cheiro apresentou notas médias de 3,80±1,02 a 4,18±0,76. O atributo textura apresentou notas de 4,15±0,90 a 4,37±0,78. De acordo com as notas atribuídas pelos provadores, os queijos com 60 dias de maturação com as notas mais elevadas para o quesito sabor são PAN (laticínio 01) e PBL2 (laticínio 02). Em relação ao atributo aparência os queijos escolhidos foram PBL1 (laticínio 01), PBL2 e PBN (laticínio 02). Os queijos que de acordo com os julgadores, apresentou uma coloração mais atrativa foram os queijos PAN (laticínio 01) e PBN (laticínio 02). Para o atributo textura, as melhores notas foram dadas para os queijos PBL1 (laticínio 01) e PBN (laticínio 02).

Em relação ao período de maturação de 180 dias, a maior nota para ao atributo aparência ocorreu para o queijo PBL2 (laticínio 02) seguido do queijo PBN (laticínio 02). Sendo também as notas mais altas do atributo cor, PBN seguido do PBL2. O queijo que teve a nota abaixo dos demais para esse atributo foi o queijo PA2 (laticínio 02).

Tratando-se do aspecto cheiro, as notas mais elevadas foram para os queijos PA1 (laticínio 01) e PAN (laticínio 01). A menor nota atribuída para esse atributo foi de 3,67±1,04

para o queijo PBN (laticínio 02). De acordo com as médias de notas, os queijos que apresentaram notas mais altas para textura foram PA1, PBL1 e PAN, ambos elaborados e maturados no laticínio 01.

Considerando o atributo sabor, como um dos atributos mais importantes em queijos, as notas mais elevadas foram observadas para os queijos PA1 e PAN (laticínio 01). A menor nota observada foi para o queijo PBN (laticínio 02).

De maneira geral, nos queijos de 180 dias existem diferenças significativas para o atributo aparência entre o queijo PBL1 com PBL2 e PBN. Em relação ao cheiro, PBN com PAN e PA1. Sobre a textura observa-se diferença entre PA1 e PA2 e quando observado o atributo sabor, observou-se diferença significativa do queijo PBN com todos os outros.

Ao verificar se ocorreram variações em relação ao tempo de maturação, levando em consideração a mesma amostra, percebeu-se a existência de diferença significativa ($P < 0,05$) para a maioria dos atributos avaliados, não havendo diferença significativa apenas para o atributo cor.

Os índices de aceitabilidade (IA %) dos queijos com 60 dias e 180 dias de maturação são apresentados na Tabela 20, assim como o atributo avaliado.

Tabela 20- Índice de Aceitabilidade (IA %) dos atributos avaliados nos queijos com 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Maturação (em dias)	Aparência	Cor	Cheiro	Textura	Sabor
Laticínio 01						
PBL1	60	89,20	87,20	80,00	87,40	80,20
	180	75,00	82,60	79,00	81,00	77,40
PAN	60	86,20	88,00	79,40	85,60	84,20
	180	82,40	82,40	81,00	81,00	83,40
PA1	60	83,40	86,00	76,00	83,20	73,60
	180	79,20	82,00	82,00	83,20	85,40
Laticínio 02						
PBL2	60	88,40	86,40	79,60	85,00	82,60
	180	84,20	86,20	80,20	79,00	74,00
PBN	60	88,40	88,20	83,60	86,40	81,60
	180	82,60	86,40	73,40	76,40	64,20
PA2	60	85,40	87,20	79,40	83,00	79,60
	180	76,60	81,00	78,60	74,20	74,40

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrato de Sódio; PA1- Queijo com fermento A
PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrato de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

Na Tabela 20, os queijos com 60 dias de maturação apresentaram Índice de aceitabilidade acima de 70% para todos os atributos avaliados, indicando que os queijos foram bem aceitos pelos provadores. O IA mais elevado foi 89,20 em relação ao atributo aparência do queijo PAN. O menor IA foi 76,00, observado para o cheiro do queijo PA1.

O IA mais baixo dos queijos com 180 dias foi de 64,20 para o atributo sabor do queijo PBN, pois ocorreu uma alteração de sabor, o que pode ser confirmado com a média das notas atribuídas para esse quesito, o que repercutiu também no IA do produto. Percebeu-se em geral, uma diminuição no IA dos queijos dos 60 dias para os 180 dias, este fato pode ter sido influenciado pela idade dos provadores da análise sensorial de 180 dias, que se constituíram por 70% abaixo de 25 anos, estando esse público fora da classe dos economicamente ativos, o que repercute no menor acesso à queijos maturados e finos que representam um custo mais elevado.

A Tabela 21 apresenta a média das notas obtidas quanto a intenção de compra dos queijos com 60 e 180 dias de maturação, sendo 1 (não compraria), 2 (talvez compraria), 3 (compraria) e 4 (certamente compraria).

Tabela 21- Intenção de compra dos queijos com 60 e 180 dias de maturação.

Queijos	Maturação (em dias)	Intenção de Compra
Laticínio 01		
PBL1	60	3,37 ^{aA} ±0,67
	180	2,60 ^{abB} ±0,89
PAN	60	3,37 ^{aA} ±0,66
	180	2,85 ^{abB} ±0,92
PA1	60	3,40 ^{aA} ±0,66
	180	2,96 ^{abB} ±0,81
Laticínio 02		
PBL2	60	3,37 ^{aA} ±0,66
	180	2,38 ^{bB} ±0,99
PBN	60	3,37 ^{aA} ±0,66
	180	2,08 ^{cB} ±1,11
PA2	60	3,37 ^{aA} ±0,68
	180	2,46 ^{abB} ±1,01

PBL1- Queijo com fermento B e Lisozima; PAN- Queijo com fermento A e Nitrato de Sódio; PA1- Queijo com fermento A
PBL2- Queijo com Fermento B e Lisozima; PBN- Queijo com Fermento B e Nitrato de Sódio; PA2- Queijo com Fermento A

*Médias das diferentes amostras de queijo seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo Teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

*Médias seguidas por letras maiúsculas iguais na mesma coluna significa que a mesma amostra de queijo não difere estatisticamente entre si em relação ao tempo de maturação pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%.

A intenção de compra para os queijos com 60 dias de maturação apresentou médias entre 3,37 a 3,40, tendendo para a opção de Compraria (3) a Com Certeza Compraria (4). Verificando os dados com o teste de Tukey ao nível de 95% de significância, não foram verificadas diferenças significativas entre os queijos.

A intenção de compra para os queijos com 180 dias de maturação apresentou média de 2,08±1,11 a 2,96±0,81, que de acordo com o código, significam: Talvez Compraria (2) a Compraria (3). O queijo PA1 foi o que se sobressaiu perante os demais, e o queijo que apresentou a menor intenção de compra foi o PBN. Pelo teste de Tukey ao nível de 95% de

significância, foi avaliado que o queijo PBN teve diferença em relação aos demais queijos. Os queijos PA1 (laticínio 01) e PBL2 (laticínio 02) também se mostraram diferentes. Já os demais não apresentaram diferença estatística significativa.

Quando observada a Intenção de Compra em relação ao tempo de maturação de 60 e 180 dias, verificou-se que ocorreram diferenças significativas entre todos os queijos. Este fato provavelmente se deve ao fato da população consumidora possuir hábitos de consumo de queijos tradicionais não maturados, embora o consumo de queijo pela população estudada seja elevado como foi visto anteriormente. Outro aspecto que deve-se levar em consideração é a classe econômica e a idade dos provadores, onde a maioria dos provadores se enquadrou na faixa de idade de menores de 25 anos na análise sensorial com 180 dias.

No Brasil, os queijos finos apresentam-se como uma novidade que alcança somente pessoas com idade mais avançada ou com maior poder aquisitivo, que têm a oportunidade de conhecer esse tipo de produto geralmente em viagens internacionais. A cultura nacional ainda valoriza excessivamente queijos convencionais como os queijos Prato, Minas Frescal e falta o hábito de consumo de produtos com aroma e sabor mais acentuados (ANUALPEC, 2012).

Em Lima et al. (2010) análises sensoriais realizadas em queijos Camembert com três tempos de maturação (1ª maturação - 14 dias), (2ª maturação - 31 dias) e (3ª maturação - 46 dias) com 300 provadores não treinados apontou que 48% dos provadores atribuiu, de acordo com a escala hedônica de 9 pontos, nota 8 para o queijo, que significa "gostei muito" na referida escala. No trigésimo primeiro dia de maturação do queijo, o teste de aceitação foi realizado, sendo que a maioria 60% atribuiu nota 8 "gostei muito" ao sabor do produto. Já nos quesitos gostei extremamente e gostei moderadamente ao se comparar o primeiro e o segundo tempos de maturação, observa-se uma migração de provadores para o quesito gostei muito no segundo tempo. Tal resultado mostrou que o processo de maturação durante 31 dias pode ter proporcionado alterações no quesito *flavour*. Além disso, o sabor característico provocado pela fermentação pode ter diminuído, originando características sensoriais mais agradáveis ao paladar dos provadores permitindo que o sabor do queijo Camembert se sobressaísse. Esses resultados não corroboram com o estudo em questão, pois a aceitação sensorial apresentou queda com o passar dos 180 dias de maturação.

Em Andreatta (2006), foi realizada a avaliação sensorial do queijo Mussarela com 2, 9, 16, 23 e 30 dias foram avaliados por provadores não treinados, e os atributos avaliados foram: textura, sabor, aroma, aparência e nota final de aceitação do produto. O aroma, sabor, textura e aceitação global não foram influenciados ($P > 0,05$) pelo tipo de leite utilizado na fabricação e pelo tempo de armazenamento do queijo. Apenas a aparência diferiu estatisticamente entre

os queijos com diferentes CCS. Já na análise sensorial dos queijos “Santo Giorno” aos 60 dias percebeu-se diferença significativa quanto ao quesito sabor e aos 180 dias percebeu-se diferença significativa nos quesitos aparência, cheiro, textura e principalmente sabor.

As fichas de avaliação sensorial dos queijos “Santo Giorno” também continham opções de possíveis características para os queijos nos quesitos cheiro, textura e sabor. Mesmo não se tratando de uma equipe de provadores treinados, buscou-se avaliar a percepção afetiva dos possíveis consumidores nesses atributos.

A seguir apresentam-se as Figuras 32, 33 e 34 com as porcentagens das características encontradas pelos provadores.

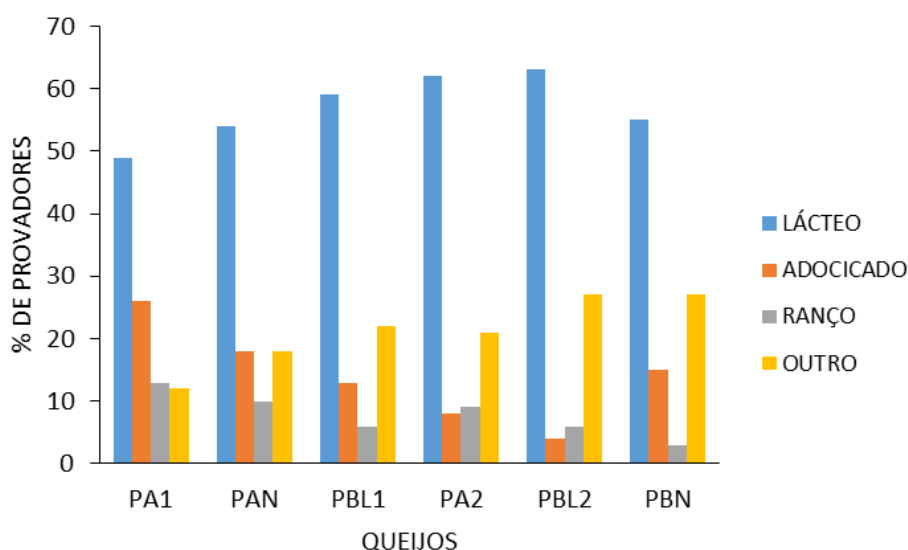


Figura 32 - Características do cheiro nos queijos com 60 dias de maturação.

Ao observar a Figura 32, percebe-se que a característica de cheiro lácteo se sobressaiu em todas as amostras de queijos, destacando-se mais no queijo PBL2. O cheiro adoçado foi verificado em maior porcentagem no queijo PA1 e a menor foi encontrada para o PBL2; 17% dos provadores marcaram a opção outro. A característica de ranço foi percebida por menor número de provadores, e o queijo que apresentou a menor porcentagem foi o PBN. A opção “outro” foi marcada por 27% dos provadores dos queijos PBL2 e PBN, dentre as características descritas, foi citada “sem cheiro” com 18 e 20% respectivamente.

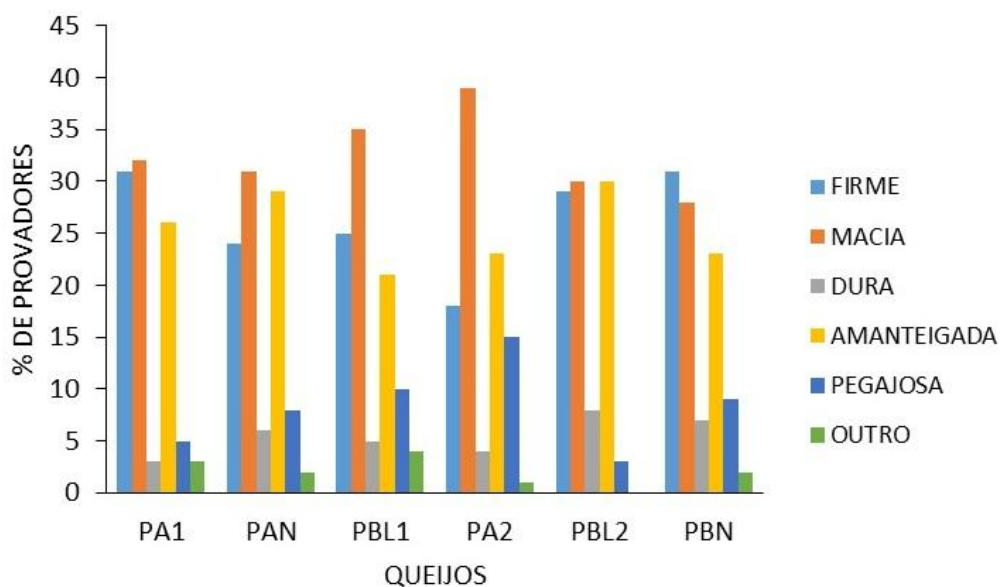


Figura 33 - Características da textura nos queijos com 60 dias de maturação.

Como observado na Figura 33, as características de textura que mais se destacaram foram macia, firme e amanteigada. Ocorrendo no queijo PBL2 uma porcentagem muito semelhante para essas três características. No queijo PA2 destacou-se a característica de maciez, enquanto que no queijo PBN a firmeza se destacou. As características de dureza e pegajosidade tiveram uma porcentagem baixa, apenas o PA2 apresentou uma porcentagem de 15% nesse quesito. Cerca de 4% dos provadores marcaram a opção outro para a característica de textura.

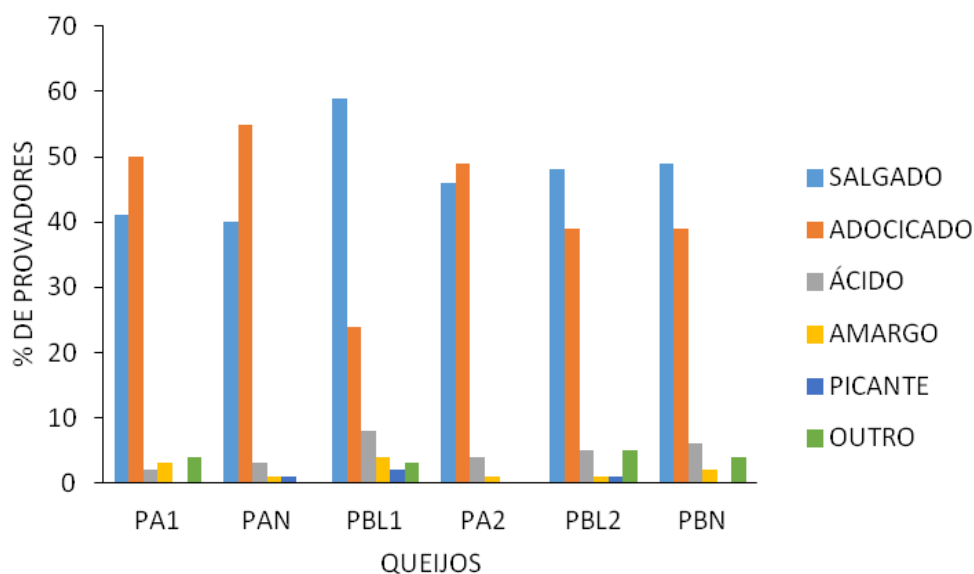


Figura 34 - Características do sabor nos queijos com 60 dias de maturação.

Os sabores salgado e adocicado foram as características que sobressaíram. O queijo PBL1 apresentou o maior índice de percepção para salgado (59%), enquanto que PAN apresentou maior porcentagem de indicação para adocicado (55%). As demais características tiveram índices baixos, variando de 8 a 0%. A opção “outro” teve 5% de marcações para o queijo PBL2 e 4% para o PBN, com a presença de 3 e 2% da palavra “falta sal” respectivamente.

Aos 180 dias de maturação (Figura 35), observou-se que a característica de cheiro lácteo apresentou-se com alta porcentagem na maioria dos queijos, apenas o queijo PBN teve como característica principal o cheiro de ranço. O cheiro de adocicado foi percebido com maior porcentagem no queijo PBL2 e em menor incidência no queijo PBN. Para a opção “outro”, foi verificada uma porcentagem de 27% para o queijo PBN, sendo 19% descrito como “forte”.

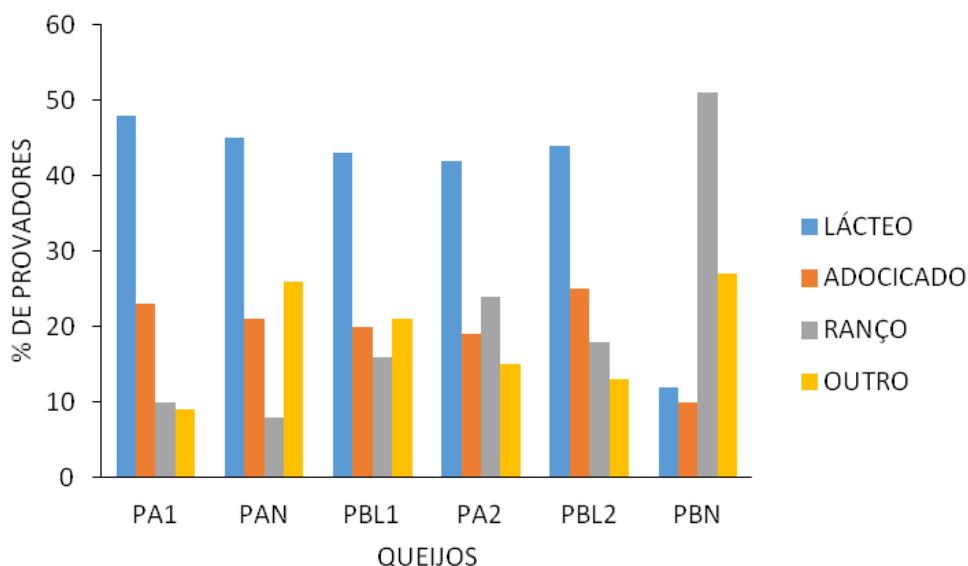


Figura 35 - Características do cheiro nos queijos de 180 dias de maturação.

Como pode ser verificado na Figura 36, as características principais de textura foram macia e amanteigada. Os queijos PBL1 e PA2 tiveram a mesma porcentagem para a textura amanteigada (38%). O queijo PBL2 apresentou a maior porcentagem para textura macia (30%). A textura dura se destacou no queijo PBN com 28% das indicações. O queijo PAN apresentou a porcentagem igualada para as características de macia e firme. A textura considerada pegajosa teve maior incidência no queijo PA2 e a opção “outro” teve maior porcentagem (5%) no queijo PBN, com 4% das descrições como “quebradiço”.

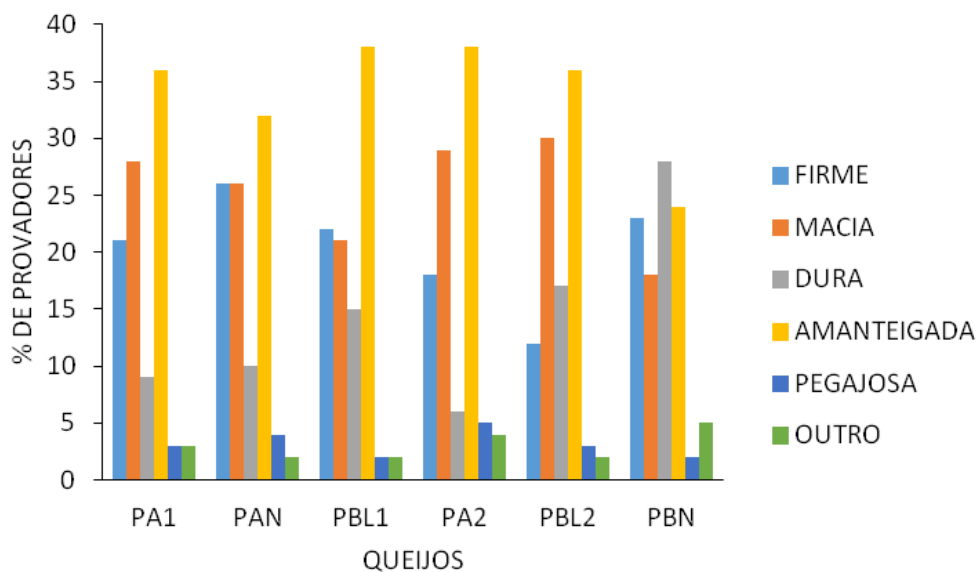


Figura 36 - Características da textura nos queijos com 180 dias de maturação.

O sabor dos queijos com 180 dias de maturação (Figura 37), assinalado pela maioria dos provadores foi salgado, sendo o queijo PA2 o que apresentou maior índice (37%). Já o queijo PBN diferiu dos demais, apresentando 36% de indicações para sabor amargo, 18% para salgado, 21% para picante. O queijo PA1 se sobressaiu no sabor ácido com 24%. O sabor adocicado foi observado com maior incidência nos queijos PA1 e PBL1 com 18% cada um. A opção “outro” foi marcada por 8% dos provadores no queijo PBL2, sendo 6% de “presença de cristais”.

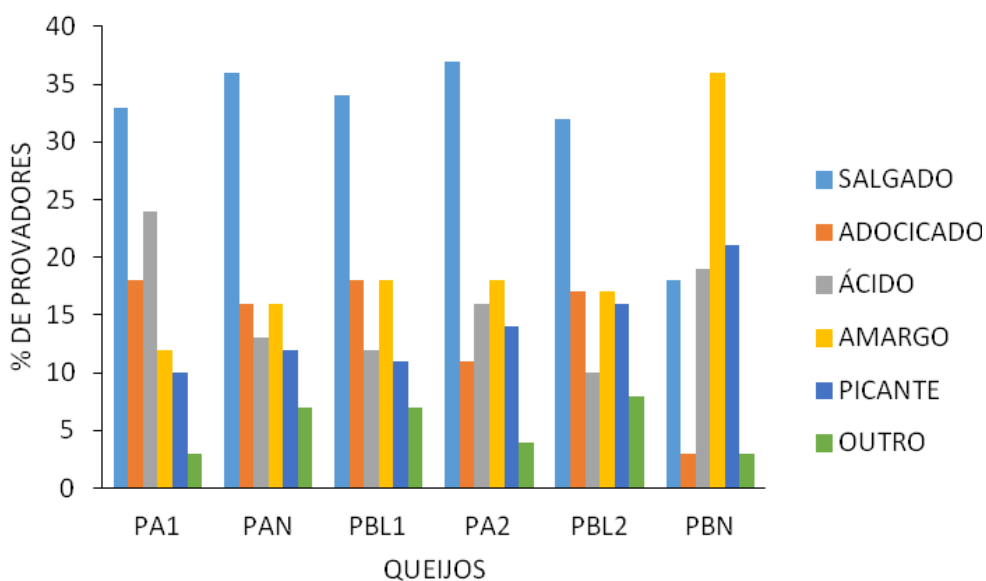


Figura 37 - Características do sabor nos queijos com 180 dias de maturação.

5.7.8 Efeito dos determinantes individuais na avaliação hedônica do atributo sabor do queijo “Santo Giorno”

O mercado consumidor e a introdução de novos produtos vêm sendo o foco de diversos trabalhos, e a inter-relação de fatores sido relatadas como determinantes na aceitação de novos alimentos. Trabalhos reportam que a escolha de alimentos pode ser explicada por variações demográficas como idade, sexo, raça, profissão e educação (MITTERER-DALTOÉ et al., 2012).

A seguir serão apresentados os efeitos das variáveis idade, sexo (Tabela 22), intenção de compra do queijo “Santo Giorno” e hábito do consumo de queijo (Tabela 23) na aceitação do novo queijo elaborado através de análise estatística multivariada regressão logística multinominal.

A técnica de análise multivariada é comumente aplicada a dados sensoriais e de consumo para identificar as características do produto e do consumidor que se relacionam intimamente com a aceitação do produto (SYMONEAUX et al., 2012). A relação entre as características do produto e do consumidor na aceitação é válida no desenvolvimento de estratégias para a introdução de novos produtos no mercado. A Regressão logística multivariada é um modelo adequado quando a dependente variável ser qualitativa. As variáveis independentes podem ser contínua discreta, categórica, dicotômica, ou uma junção de todas (GONZÁLEZ et al., 2011). O significado de cada um dos coeficientes é a estatística Wald. Se o coeficiente logístico é estatisticamente significativo, sua interpretação está relacionada com os termos de seu impacto e a variável dependente. A regressão logística não depende da suposição multivariada e a presença de homogeneidade da variância e covariância. Ela é uma técnica robusta, o que torna a sua aplicação adequada em muitas situações (HAIR et al., 2009).

Tabela 22- Influência sociodemográfica na aceitação do queijo Santo Giorno.

Efeitos	Wald	P
Idade	7,76	0,02
Sexo	0,28	0,86

P - Significância

Tabela 23 - Influência das atitudes dos provadores no índice de aceitação do queijo Santo Giorno.

Efeitos	Wald	P
Intenção de compra	0,31	0,85
Tipo de queijo	1,76	0,41
Intenção de compra X tipo de queijo	3,23	0,51

P - Significância

Analisando-se os dados apresentados nas tabelas verifica-se a significância estatística do coeficiente de cada variável independente. A julgar pelo altos valores de P destaca-se a idade como principal variável para avaliar a aceitação de queijo Santo Giorno. Com base nesse resultado e observando-se os resultados da Tabela 24, verifica-se claramente uma relação direta entre o aumento da idade e o de aceitação, demonstrando-se que esse tipo de produto pode ser direcionado a um público mais velho, seja por possuírem um nível de apreciação mais apurado, ou por estarem na faixa etária dos economicamente ativos. Segundo Rezende (2000), o crescimento do consumo de queijos maturados cresce no Brasil de uma forma mais lenta que os queijos tradicionais, pois estes possuem um preço mais elevado, sendo, portanto seu público-alvo as pessoas das classes A e B. De acordo com Solomon (2002), os fatores que influenciam no consumo de queijos são família, classe social ou rendimento e idade. Já Schiffman et al. (2000) apontam outras variáveis influentes na aceitação e intenção de compra de produtos: nacionalidade, religião, região geográfica, raça, idade, sexo, ocupação profissional e classe social.

Tabela 24 – Fatores relacionados à aceitação do queijo Santo Giorno.

IA Sabor (%)	Intenção de compra	Sexo	Idade	Tipo de queijo	n
60	2,10	1,47	1,42	1,93	59
80	2,05	1,42	1,77	2,10	61
100	2,32	1,40	1,90	2,02	40

I.A.- Índice de Aceitabilidade

Intenção de compra - 1 (não compraria), 2 (talvez compraria), 3 (compraria) e 4 (certamente compraria).

Sexo - 1 (Feminino), 2 (Masculino)

Idade - 1- (Menores de 25 anos), 2-(de 25 a 35 anos), 3- (36 a 50 anos), 4- (Maiores de 50 anos).

Tipo de queijo - 1 (Frescos), 2 (Convencionais), 3 (Finos).

n - Número de provadores

5.7.9 Análise Discriminante dos diferentes tipos de queijos Santo Giorno.

A análise multivariada discriminante (método stepwise) foi aplicado aos atributos físico-químicos, parâmetros de cor e texturais para diferenciar os queijos. O principal objetivo da análise discriminante é compreender as diferenças entre os grupos e prever a probabilidade de pertencer a uma determinada classe ou grupo com base em diversas variáveis dependentes (ARVANITOYANNIS; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2003). Lambda

Wilks, é a estatística usada para indicar a significância estatística do poder de discriminação de cada variável, em que valor = 1 (sem poder discriminatório) e valor = 0 (poder discriminatório perfeito). O Lambda Wilks` parcial é a contribuição da respectiva variável para a discriminação entre os grupos (MANLY, 2008).

Os resultados apresentados na Tabela 25 indicam que as variáveis que melhor discriminam os diferentes tipos de queijos são carboidratos, o parâmetro b* de cor, cinzas, calorias, dureza e GES (Gordura no Extrato Seco). Fato este corroborado pelos resultados da análise canônica na Tabela 26. A análise canônica é um procedimento que cria novas variáveis que compõem todas as informações úteis sobre a discriminação que está disponível nas variáveis originais (ARVANITTOYANNIS; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2003).

As Tabelas 25 e 26 apresentam os resultados da análise discriminante canônica das variáveis avaliadas através dos autovalores, autovetores, R^2 canônico e Lambda Wilk.

Os valores estatísticos de Lambda Wilk, o Lambda Wilk é a estatística usada para indicar a significância estatística do poder de discriminação de cada variável, em que valor = 1 (sem poder discriminatório) e valor = 0 (poder discriminatório perfeito). O Lambda Wilk parcial é a contribuição da respectiva variável para a discriminação entre os grupos (MANLY, 2008).

Tabela 25- Resultados das variáveis significativas na discriminação dos queijos Santo Giorno.

Variável	Lambda Parcial	F	P
Carboidratos	0,40	12,38	0,00
b*	0,32	18,07	0,00
Cinzas	0,26	24,47	0,00
Calorias	0,55	6,88	0,00
Dureza	0,59	5,85	0,00
GES	0,75	2,83	0,02

P – Significância

Na tabela 25, observa-se que as variáveis melhores discriminantes dos queijos foram carboidratos (0,40), b* (0,32), cinzas (0,26), calorias (0,55), dureza (0,59) e GES (0,75), fato este corroborado pelos resultados da análise canônica na Tabela 26. A análise canônica é um procedimento que cria novas variáveis que compõem todas as informações úteis sobre a discriminação que está disponível nas variáveis originais (ARVANITTOYANNIS; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, 2003).

Tabela 26- Funções obtidas pela análise canônica.

Fator	Autovalor	R ² Canônico	Lambda Wilks'	X ²	P
0	4,95	0,91	0,008	225,07	0,00
1	3,26	0,87	0,049	141,21	0,00
2	2,97	0,86	0,211	73,03	0,00
3	0,17	0,38	0,839	8,22	0,22
4	0,01	0,11	0,987	0,61	0,73

Autovetores		
Variável	Função 1	Função 2
Carboidratos	0,24	-1,67
b*	-1,17	-0,05
Cinzas	-0,92	-0,40
Calorias	0,87	0,21
Dureza	0,83	-0,24
GES	0,58	-0,80

X² – Quiquadrado

P – Significância

Observou-se pela análise desses resultados que 91% da variação total foi explicada pela função 1, que apresenta como principais componentes b* (-1,17) e calorias (0,87).

5.7.10 Relação entre análises de cor, perfil de textura instrumental e análise sensorial

Os resultados da análise sensorial que apresentaram maior ou menor classificação foram relacionados aos resultados obtidos instrumentalmente, com o objetivo de verificar sensibilidade para avaliar diferentes atributos de provadores não treinados (potenciais consumidores).

A análise sensorial de “cor característica” dos queijos com 60 dias identificou a amostra PBN com maior pontuação. Na determinação instrumental, este queijo apresentou os seguintes parâmetros: L* 82,22 ± 0,50; a* -7,08 ± 0,04; e b* 34,26 ± 0,61, o que indica a aceitabilidade de um queijo com alta luminosidade; o valor de a* negativo, que representa a intensidade leve da cor verde, e que variou significativamente entre as amostras. O valor de b* positivo, que representa a intensidade de cor amarela, também variou, sendo de intensidade intermediária de amarelo em relação às demais amostras.

Em relação à textura, a análise sensorial de 60 dias, apresentou o queijo PBL1 com a melhor média de notas e na instrumental de TPA ele foi considerado o queijo com menor dureza (11106,62 g), elasticidade de 0,86, mastigabilidade de 5918,01, adesividade de -315,42 g/s, coesividade de 0,63 e resistibilidade de 0,17.

Aos 180 dias de maturação a análise sensorial estabeleceu o queijo PBN com a melhor cor e o queijo PBL2 considerado o melhor para o quesito aparência. A análise instrumental de cor do PBN apresentou L^* ($73,94 \pm 1,70$), a^* ($-7,74 \pm 0,08$) e b^* ($35,60 \pm 1,07$), demonstrando a aceitação do queijo com uma luminosidade menor, a^* negativo com leve tonalidade de verde e b^* positivo com tendência a tonalidade amarela. A amostra PBL2 que teve uma pontuação mais elevada na aparência e instrumentalmente apresentou L^* ($79,69 \pm 0,69$), a^* ($-7,82 \pm 0,21$) e b^* ($34,10 \pm 0,55$) constituindo alta luminosidade e prevalectimento da cor amarela.

Quanto à avaliação da textura na análise sensorial de 180 dias, o queijo que teve melhor média de notas foi o PA1 cujo valor verificado na análise instrumental TPA resultou na segunda menor dureza ($19239,79$ g), elasticidade de 0,88, mastigabilidade de 8183,25, adesividade de $-92,20$ g/s, coesividade de 0,47 e resistibilidade de 0,13.

A análise sensorial torna-se mais eficaz quando se valida as relações entre as propriedades sensoriais e químicas, através de medições instrumentais e preferência dos consumidores. A determinação destas relações é uma das aplicações mais importantes, uma vez que, este conhecimento pode ser utilizado por investigadores, na área da tecnologia, microbiologia e química. Por exemplo, ao ser conhecida a composição desejada pelos consumidores, o processo de fabricação pode ser otimizado de forma a obter as características pretendidas (DRAKE, 2007; FUQUAY et al., 2011).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas bactérias lácticas endógenas do leite da região sudoeste do Paraná e identificadas através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A maioria dos isolados foi caracterizada como *Lactobacillus delbrueckii* sp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, que foram selecionadas e avaliadas quanto ao desempenho e utilizadas para fabricação de fermentos liofilizados e destinados a fabricação de queijo seguindo-se o fluxograma de fabricação estabelecido neste estudo.

O fermento elaborado possui ótimo desempenho no processo de acidificação rápida do leite, tal resultado foi comprovado durante a elaboração dos queijos, tanto o fermento A, quanto o B geraram curvas lineares e homogêneas, capazes de abaixar o pH da massa a um valor de 5,20 em um tempo máximo de 7 horas.

O produto final foi submetido a análises físicas, físico-químicas, microbiológicas e testes de aceitação. Os resultados obtidos mostraram que é viável a padronização do produto, proporcionando qualidade microbiológica e a manutenção das características físico-químicas, estruturais e sensoriais do queijo Regional realizando controles durante a elaboração dos queijos e durante o processo de maturação em relação a umidade, ventilação e temperatura.

O “Santo Giorno” é um queijo maturado que se obtém por coagulação do leite por meio de coalho Quimosina (coalho bovino), complementada pela ação de fermento endógeno, cloreto de sódio, e os inibidores de *Clostridium* Nitrato de Sódio e Liozima. Possui forma cilíndrica, borda reta com faces planas e peso aproximado de 5 Kg.

O queijo Regional é um queijo gordo e de média umidade de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos.

Poderão ser consideradas 4 tipologias de queijo “Santo Giorno”: Semi-curado - com maturação de 60 a 90 dias, *Mezzano* - com maturação de 91 a 150 dias, *Vecchio* - com maturação de 151 a 360 dias e *Stravecchio “Premium”* - com mais de 360 dias de maturação

A região de produção do queijo “Santo Giorno” é a mesorregião Sudoeste do Paraná. As criações bovinas que fornecem leite para a transformação no queijo e as queijarias e indústrias de transformação e maturação do produto devem ser localizadas na zona de abrangência dos 42 municípios do Sudoeste Paranaense.

A qualidade microbiológica dos queijos foi satisfatória, garantindo inocuidade ao produto. Houve um aumento significativo nas concentrações de proteínas, lipídios, cinzas, EST, GES e calorias e redução dos teores de umidade, carboidratos e A_w nos queijos

formulados. Os resultados da análise sensorial apontaram para a aprovação dos queijos pelos provadores com o IA maior para os queijos de 60 dias.

Foi realizado o pedido de Registro de Marca do queijo “Santo Giorno” no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial) através da Agência de Desenvolvimento Regional sob o protocolo nº 907620477.

Como sugestões de novas pesquisas a respeito do queijo “Santo Giorno” poderão ser realizadas análises para compreender a amplitude de proteólise, lipólise e quantificação do teor de Cloreto de Sódio, contagem das bactérias lácticas presentes nos queijos no decorrer da maturação e verificação da presença ou não de resíduos de Nitrato de Sódio nos queijos, desenvolver outras variedades de queijos utilizando o fermento endógeno, pois este estará disponível para os laticínios e queijarias, tais queijos teriam então no rótulo a denominação de serem feitos com o fermento endógeno do Sudoeste do paranaense.

REFERÊNCIAS

ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo). Disponível em: <<http://www.abic.com.br>>, acesso em: 05 de out. 2013.

ABRAHÃO, Wanda Moscalewski. **Método de detecção e ocorrência de *Listeria monocytogenes* e de outros microrganismos em queijos comercializados no estado do Paraná.** Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

AKOPYANZ, N.; BUKANOV, N.; WESTBLOM, T.; BERG, D. RFLP baseada em PCR da diversidade de sequências de ADN no patógeno gástrica *Helicobacter pylori*. **Nucleic Acids Res.** 11 de dezembro, 20 (23) : 6221-6225, 1992.

ALLISON, G. E.; KLAENHAMMER, T. R. Phage resistance mechanism in lactis acid bacteria. **International Dairy Journal**, v 8, p. 207-226, 1998.

ALMEIDA, K. E.; TAMINE, A. Y.; OLIVEIRA, M. N. Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, p. 311-316, 2008.

ALVARENGA, N. **Estudos em textura de Queijo Serpa.** Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2000.

ÁLVAREZ, S.; RODRÍGUEZ, V.; RUIZ, M. E.; FRESNO, M. Correlaciones de textura y color instrumental con la composición química de quesos de cabra canarios. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, p. 663-666, 2007.

ANDRADE, Alex-Sandra Alexandre de; RODRIGUES, Maria do Carmo Passos; NASSU, Renata Tieko; NETO, Manoel Alves de Souza . **Medidas instrumentais de cor e textura em queijo de coalho.** Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará – UFC; Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos-SP; Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, 2007.

ANDREATTA, E.; FERNANDES, M.F.; SANTOS, M.V. *et al.* Quality of Minas frescal cheese prepared from milk with different somatic cell counts. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 320- 326, 2009.

ANDREATTA, Evelise. **Avaliação da qualidade dos queijos Minas Frescal e tipo Mussarela produzidos com leite contendo diferentes níveis de células somáticas**. Tese de Doutorado, 110 f. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2006.

ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. Informa Economics FNP, South America, 2012.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001, Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

APONTE, M., FUSCO, V., ANDOLFI, R., COPPOLA, S., Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: detection by different analytical approaches. **International Dairy Journal** 18, 403–413, 2008.

ARAÚJO, T. F. **Caracterização e identificação de *Enterococcus* ssp. Isolados do fermento endógeno utilizado na fabricação de do queijo minas artesanal da região da Canastra, Minas Gerais**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ARVANITOYANNIS, I.S.; VAN HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M. Implementation of Chemometrics for quality control and authentication of meat and meat products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 43, 173–218, 2003.

ATASOY, A. F.; TÜRKÖGLÜ, H. Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats and cow's milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening. **Food Chemistry**, v. 115, p. 71–78, 2009.

AYAD, E. H. E. *et al.* Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 715-725, 2004.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO, Produção leiteira no Brasil, Agropecuária, BNDES Setorial, n° 37, p. 371-398, 2013.

BARROW, G. H., R. K. A FELTHAM. **Cowan and Steel's Manual for Identification of Medical Bacteria**. 3ª ed. Cambridge University Press, Cambridge. p. 331, 1993.

BARROS, Jupyracyara Jandyra de Carvalho; AZEVEDO, Analice Cláudia de; JÚNIOR, Luiz Roberto Faleiros; TABOGA, Sebastião Roberto; PENNA, Ana Lúcia Barretto. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, ISSN 0101-2061, 2011.

BERESFORD, T. P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N L., COGAN, T. M., Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BERESFORD, T.; WILLIAMS, A. The Microbiology of Cheese ripening, **Chemistry, Physics and Microbiology**, 3ª Ed. Volume 1: Elsevier Ltd. 2004.

BERNARDI, Marta Regina Verruma; DAMÁSIO, Maria Helena; CAMPOS, Sonia D.; FERREIRA, Vera Lucia P., Análise instrumental de textura e cor do queijo mozzarella de leite de búfala elaborado pelos métodos tradicional e da acidificação direta, **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Mar/Abr, n°355, 62: 3-6, 2007.

BERTOLINO, M.; DOLCI, P.; GIORDANO, M.; ROLLE, L.; ZEPPA, G. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. **Food Chemistry**, v. 129, p.1001–1011, 2011.

BEUVIER, E.; BUCHIN, S. Raw Milk Cheeses. Cheese: **Chemistry, Physics and Microbiology**, Elsevier Ltd. 3ª Ed. Volume 1, 2004.

BIOAGRO, **Instituto de Qualidade e Tecnologia Agroalimentar**, Thiene, Itália, 2012.

BISCAIA, I. M. F.; STADLER, C. C.; PILATTI, L. A. **Avaliação das alterações físico-químicas em iogurte adicionado de culturas probióticas**. XI SIMPEP, Bauru-SP, 2004.

BORBA, Karla Kaligia Silva. **Desenvolvimento e caracterização de ricota cremosa elaborada com soro de queijo coalho caprino e bovino.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. João Pessoa-Paraíba, 2013.

BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A. et al. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.22, p.1115-1119, 2006.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **Relação Anual de Informações Sociais – RAIS: 2009.** Brasília, 2009. CD-ROM.

BRASIL. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. Diário Oficial da União. Brasília, 11 de março de 1996.

_____. Ministério da agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Secretaria de Defesa Agropecuária.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Secretaria de Defesa Agropecuária.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Secretaria de Defesa Agropecuária.

_____. Embrapa Gado de Leite. 2012. Disponível em:
<www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informações/estatísticas/producao/producao.php>.
Acesso em: 05 jan. 2011.

BROLAZO, E. M. **Seleção e utilização de bactérias lácticas produtoras de diacetil em leites fermentados.** Dissertação de mestrado em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2003.

BROWN, T.A. Molecular Biology. 2 ed. Manchester: **Academic Press**, 255 p. 1998.

BRUNO, L. M.; CARVALHO, J. D. G. **Microbiota lática de queijos artesanais**. Embrapa Agroindustrial Tropical, ISSN 1666-1915, 124. 30 p. Dezembro, 2009.

BRYANT, A.; USTUNOL, Z; STEFFE, J. Texture of Cheddar cheese as influenced by fat reduction. **Journal of Food Science**, v.60, n. 6, p. 1216–1221, 1995.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; CARDARELLI, Haíssa Roberta; SAAD, Susana Marta Isay. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina.

Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. vol. 44, n. 1, jan./mar., 2008.

CALLAGHAN, D. J.; GUINEE, T. P. Rheology and Texture of cheese. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**, 3^a Ed. Volume 1: General Aspects, Elsevier Ltd. 2004.

CALLON, C., MILLET, L., MONTEL, M.C., Diversity of lactic acid bacteria isolated from AOC Salers cheese. **Journal of Dairy Research**. 71, 231–244, 2004.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 50, n. 1-2, p. 131-144, sep. 1999.

CARROLL, S.M. et al. Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. **Animal Feed Science and Technology**, London, v. 131, n.3, p.451-473, 2006.

CARVALHO, J. D. G. **Caracterização da microbiota lática isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas**. 2007. 154 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CARVALHO, J. D. G. et al. Bactérias ácidas lácticas isoladas de queijo de Coalho artesanais comercializados em Fortaleza, CE. **Revista do Instituto Cândido Tostes**. V. 60, n. 345, p. 221-224, jul./ag., 2005.

CAVALCANTE, J. F. M., ANDRADE, N. J. , FURTADO, M. M., FERREIRA, C. L. L. F. PINTO, C. L. O. ELARD, E. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, p. 205-214, jan.-mar. 2007.

CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FERREIRA, C.L.L.F. Isolamento de bactérias lácticas de leite cru da região do vale do Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.58, p.106-111, 2003.

CCFRA Method 2.7.1: 2007 Guideline n.43 5 th ed. 2007. Enumeration of Presumptive *Enterococcus* Species-Colony Count Technique cheese, 2007. **Food Microbiology**, v. 21, n. 2 p. 233-240, 2004.

CEPEA - **Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada**. Boletim do leite. ESALQ/USP, Ano 20 nº 226, Fevereiro 2014.

CHAMMAS, G. I.; SALIBA, R.; CORRIEU, G.; BEAL, C. Characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented Milk “laban”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 52-61, 2006.

CHATELAIN, Y.; ALOUI, J.; GUGGISBERG, D.; BOSSET, J. O. La couleur du lait et des produits laitiers et sa mesure-un article de synthèse. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 94, n. 5, p. 461-488, 2003.

DAMIN, M. R.; MINOWA, E.; ALCÂNTARA, M. R.; OLIVEIRA, M. N.; Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented Milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. **Journal of Texture Studies**, v. 39, p. 40-55, 2008.

DELGADO, S.; MAYO, B. Phenotypic genetic diversity of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus spp.* Strains isolated from Northern Spain starter-free farmhouse cheeses. **International journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 90, nº 3, p. 309-319, 2004.

DELORME, C. Safety assessment of dairy microorganisms: *Streptococcus thermophilus*. **International Journal of Food Microbiology**, v.126, p. 274-277, 2008.

DIAZ-RUIZ, G., GUYOT, J.P., RUIZ-TERAN, F., MORLON-GUYOT, J., WACHER, C., Microbial and physiological characterization of weakly amyolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize beverage. **Applied and Environmental Microbiology**. 69, 4367–4374, 2003.

DRAKE, M. Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods; **Journal Dairy Science**, 90: 4925 – 4937, 2007.

DUTKOSKY, Silvia Deboni. **Análise sensorial de alimentos**. 2ª ed. Curitiba: Champagnat, 2007.

ECOMMERCE BRASIL. Disponível em:
<http://www.ecommercebrasil.com.br/noticias/o-consumo-dos-brasileiros-ultrapassara-a-marca-dos-r-3-trilhoes-em-2013-diz-estudo> Acesso em: 20 de jun. de 2014.

EMBRAPA GADO DE LEITE. Disponível em:
<<http://www.cnpql.embrapa.br>> Acesso em: 18 de out. de 2013.

ESCOBAR, C. A. M. et al. Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 248-256, 2001.

FACKLAM, R., What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. **Clinical Microbiology Reviews**. 15, 613–630, 2002.

FAEP. Federação da Agricultura do Estado do Paraná. **Boletim Informativo**. Ano XXVI, nº 1163, 19 a 25 de dezembro de 2011.

FERNANDES, Rhea. Microbiology handbook dairy products. **Leatherhead Publishing**, Cambridge, 2009.

FERREIRA, M. F.; et al. Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C integral comercializado na cidade de Jaboticabal – SP, **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, nº 150, abril, p. 134, 2006.

FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. American Dairy Science Association, **J. Dairy Sci.** 90:1611–1624 doi:10.3168/jds.2006-703, North Carolina, 2007.

FONSECA, L. F. L.; SANTOS, M. V. **Qualidade do leite e controle de mastite.** São Paulo. Lemos, 175 p., 2000.

FOOD INGREDIENTS BRASIL, **Enzimas: natureza e ação nos alimentos**, revista N° 16, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** A Flora Microbiana dos Alimentos: Alimentos fermentados. Artmed Editora. p. 132-147, 2002.

FOX, P.; MCSWEENEY, P.; COGAN, T.; GUINEE, T. **Fundamentals of Cheese Science** – 3^a edition. Elsevier, Madison, 2004.

_____. P. F. et al. **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** London: Chapman & Hall, v. 1, 617p., 2004.

_____. P. F.; MCSWEENEY, P.; COGAN, T.; GUINEE, T. **Fundamentals of Cheese Science**, Aspen Publishers, Estados Unidos, 2000.

_____. P. F.; **Cheese: chemistry, physics and microbiology.** 2. ed., Vol. 1, General aspects. London UK: Chapman e Hall, 601 p., 1993.

_____. P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. **Dairy Chemistry and Biochemistry.** Published by Blackie Academic e Professional, an imprint of Thomson Science, 2-6 Boundary Row, London. 1^a Ed. 478p., 1998.

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

FREIRE, Carlise Beddin Fritzen. **Efeito da adição de *Bifidobacterium* Bb-12 e/ou do emprego da acidificação direta sobre as propriedades de queijo minas frescal.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos. Florianópolis, 2009.

FUQUAY, J.; FOX, P.; MCSWEENEY, P. **Encyclopedia of Dairy Sciences**. Elsevier, Academic Press, United Kingdom, 2011.

FURTADO, M. M. Fundamentos originais dos queijos Grana Italianos. **Revista Instituto Lático Cândido Tostes**, jan/fev, n° 378, 40-50 p., 2011.

_____. M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. Fonte comunicações e Editora, São Paulo, 2005.

_____. M. M. **Quesos Típicos de Latinoamérica**. São Paulo: Danisco, 192 p., 2005.

FURTADO, Mirian Regina Alves. **Caracterização histórico, tecnologia de fabricação, características físico-químicas, sensoriais, perfil de textura e de comercialização do queijo Reino**. Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, 2008.

GEORGALAKI, M., MANOLOPOULOU, E., ANASTASIOU, R., PAPADELLI, M., TSAKALIDOU, E., Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. **International Dairy Journal**, 19, 96–99, 2009.

GEORGALAKI, M.D., SARANTINOPOULOS, P., FERREIRA, E.S., DE VUYST, L., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E., Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese. **Journal of Applied Microbiology**. 88, 817–825, 2000.

GERMOND, Jacques-Edouard, LAPIERRE, Luciane, DELLEY, Michele, MOLLET, Beat, FELIS, Giovanna E., DELLAGLIO Franco. Evolution of the Bacterial Species *Lactobacillus delbrueckii*: A Partial Genomic Study with Reflections on Prokaryotic Species Concept. **Mol. Biol. Evol.** v. 20, p. 93–104, 2003.

GOBETTI, M., LANCIOTTI, R., DE ANGELIS, M., CORBO, M. R., MASSINI, R., FOX, P. F. Study of the temperature pH and NaCl on the peptidases activities of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) by quadratic response surface methodology. **International dairy Journal**, v. 9 p. 865-875, 1999.

GONDIM, F. A. L. **Renforcement des propriétés organoleptiques d'un fromage à pâte pressée brésilien COALHO DO CEARA à l'aide de la lipase-estérase de *Rhizomucor miehei***. Thèse (Doctorat), L'Institut National Polytechnique de Lorraine, Lorraine, 1995.

GONZÁLEZ, C.G., LISTE, A.V. & FELPETO, A.B. **Tratamiento de datos con R, Statística y SPSS**. (Data treatment by Statística and SPSS.) Chap. XI, 1st ed., Diaz de Santos, Espanha, p. 453–557, 2011.

GUGLIELMOTTI, D.M. et al. *Streptococcus thermophilus* phage monitoring in a cheese factory: Phage characteristics and starter sensitivity. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 8, p. 476-480, 2009.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages - New weapons for food safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HAIR, JR, J.F., BLACK, W.C., BABIN, B.J., ANDERSON, R.E. & TATHAM, R.L. **Análise multivariada de dados**. (Multivariate data analysis) Chap. 5, 6th ed., Bookman, Porto Alegre, p. 221–302, 2009.

HARDIE, J. M.; WHILEY, R. A. **The genus *Streptococcus***. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. The genera of lactic acid bacteria. London: Chapman e Hall, v. 2, p. 55-124, 1995.

HASSAN, A. N.; FRANK, J. F. Starter culture and their uses. In: MARTH, E.H.; STEELE, J. L. **Applied Dairy Microbiology**, 2^aed. New York. Marcel decker, 2001.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Pecuária, Jun. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 14 de jun. 2013.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em:
<<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 16 de jun. 2013.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea - São Paulo, 2008.

IPARDES. INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL, Leituras regionais: Mesorregião Geográfica Sudoeste Paranaense/ Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social. – Curitiba : IPARDES : BRDE, 2004.

_____. INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná. Sumário executivo / Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social e Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. Convênio IPARDES, SETI, EMATER, Curitiba, 29p., 2009.

_____. INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Características e perspectivas da indústria de laticínios do Paraná, Curitiba, PR, ISSN 2236-8248, v.1, n.1, p. 32-46, jan./jun. 2011.

IPHAN-Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Disponível em:
<<http://portal.iphan.gov.br/>>. Acesso em: agosto. 2013.

ISO 7889 IDF 117: 2003, **Yogurt Enumeration of characteristic microorganisms-Colony count technique at 37°C.**

JASTER, Henrique; CAMPOS, Anna Carolina Leonelli Pires; AUER, Luciellen Bach; LOS, Francine Gomes Basso; SALEM, Renata Dinnies Santos; ESMERINO, Luís Antônio; NOGUEIRA, Alessandro; DEMIATE, Ivo Mottin. Quality evaluation of parmesan-type cheese: a chemometric approach, **Food Science and Technology** ISSN 0101-2061, Campinas, 34(1): 181-188, Jan.-Mar. 2014.

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

JUSTUS, A. et al. Caracterização física e química de queijos parmesão ralado comercializados na região Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.66, n.379, p.16-24, 2011.

KLIJN, N.; WEERKAMP A. H., de VOS W. M. 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA *probe*. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 3390–3393.

KLUGE, K. A.; NACHTIGAL, J. C.; FACHINELLO, J. C.; BILHALVA, A. B. **Fisiologia e manejo pós-colheita de frutas de clima temperado**. Campinas: Livraria e editora Rural, 2002.

KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. DNA amplification by the polymerase chain reaction. In: BROWN, T. A. **Essential Molecular Biology. A practical approach**. New York: **Oxford University Press**, 1991, v. 2, p. 185-207.

KRISTENSEN, D.; HANSEN, E.; ARNDAL, A.; TRINNDERUP, R. A.; SKIBSTED, L. H. Influence of light and temperature on the colour and oxidative stability of processed cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 10, p. 837-843, 2001.

KRISTO, E.; BILIADERIS, C. G.; TZANETAKIS, N. Modeling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented Milk produce containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 517-528, 2003.

LAW, B. A. Controlled and accelerated cheese ripening: the research base for new technologies. **International Dairy Journal**, Barking, v. 11, p.383–398, 2001.

LEITE JR, A. F. S.; TORRANO, A. D. M.; GELLI, D. S. Qualidade microbiológica do leite tipo C pasteurizado, comercializado em João Pessoa, Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 45-49, 2000.

LICK, S.; KELLER, M.; BOCKELMANN, W. et al. Rapid identification of *Streptococcus thermophilus* by primer-specific PCR amplification based on its *lacZ* gene. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.19, p.74-77, 1996.

LIMA, Danielle C. de; GOULART, Patrícia de F. P.; OLIVEIRA, Roseane M. E. Avaliações sensorial, físico-química e microbiológica de queijo camembert em diferentes tempos de maturação. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Jan/Fev, nº 372, 65: 41-46, 2010.

LIMA, C.D.L.C. LIMA, L.A., CERQUEIRA, M.M.O.P., FERREIRA, E.G. ROSA, C.A. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.1, p.266-272, 2009.

LIMA, M. H. P. **Elaboração de queijo de coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *S. thermophilus* e *L. bulgaricus***. 1996. 82 f.. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

LOMBARDI, L., M. GATTI, L. RIZZOTTI, S. TORRIANI, C. ANDRIGHETTO, and G. GIRAFFA. Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses. **Int. Dairy Journal**. 14, 967-976, 2004.

LÓPEZ-DÍAZ, T. M. et al. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. **Food Microbiology**, London, v. 17, n. 1, p. 23-32, 2000.

LUCAS, A.; SODINI, I.; MONET, C.; JOLIVET, P.; CORRIEU, G. Probiotic cell counts and acidification in fermented milks supplemented with milk protein hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 47-53, 2004.

LUCEY, J. A.; JOHNSON, M. E.; HORNET, D. S. Invited Review: Perspectives on the basis of the rheology and texture properties of cheese. **Journal Dairy Science**, v. 86, n. 9, 2003.

MACEDO, A. C.; TAVARES, T. G.; MALCATA, F. X. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela. **Food Microbiology**. Volume 21, abril, p. 233-240, 2004.

MACHADO, M. **Evolução da textura e composição do queijo Serpa durante a sua maturação.** Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Engenharia de Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2003.

MACHADO, P.F.; PEREIRA, A.R.; SARRIES, G.A. Composição do leite de tanques de rebanhos brasileiros distribuídos segundo sua contagem de células somáticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p. 1883-1886, 2000.

MADERA, C. et al: Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, n. 3, p. 213-222, 2003.

MANLY, B.J.F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**, 3ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

MARINO, M.; MAIFRENI, M. RONDONINI; G. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 229, n. 1 p. 133-140, 2003.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; HERMIDA, M.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Characteristics of “Tetilla” pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. **Food Microbiology**, v. 21, n. 1 p. 97-104, 2004.

MICHEL, V.; MARTLEY, F., G. *Streptococcus thermophilus* in cheddar cheese-production and fate of galactose. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 317-325, 2001.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/indicacao-geografica>> . Acesso em: julho. 2013.

MOREIRA, Claudia Patrícia Martins. **Desenvolvimento de Metodologias Analíticas para queijos.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2011.

MOR-MUR, M.; CARRETERO, C.; PLA, R.; GUAMIS, B. Microbiological changes during Ripening of Cendrat del Montsec, a goat's milk cheese. **Food Microbiology**, n. 11, p. 177-185, 1994.

MORTENSEN, G.; BERTELSEN, G.; MORTENSEN, B. K.; STAPELFELDT, H. Light-induced changes in packaged cheeses-a review. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 4, p. 85-102, 2004.

MOULAY, M., AGGAD, H.; BENMECHERNENE, Z.; GUESSAS, B.; HENNI, D.E., & KIHAL, M. Cultivable Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Raw Goat's Milk and Their McaFaddin J. 1980. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Catalase Test. 2ª edição. 51-58; Proteolytic Activity. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, p. 12-18, 2006.

MUZILLI, Osmar (org) et al. Desenvolvimento de conhecimentos e inovações tecnológicas para a cadeia produtiva do leite: termos de referência para a região Sul do Brasil. Curitiba: RIPA, 92p., 2008.

NAIDU, A.S. et al. Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 38, p.13-126, 1999.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 85 p. 1999.

NASSAR, André M. Certificação de origem e as relações entre produtores e torrefadoras de café. In: Work-shop brasileiro de Gestão de sistemas agroalimentares, II. PENZA/FEA/USP. Ribeirão Preto, 1999. Disponível em: < <http://www.fearp.usp.br/egna/arquivo/21.pdf> >
Acesso em: 20/03/14

NHUCH, E.; et al. Caracterização de queijos artesanais produzidos em Viamão, no estado do Rio Grande do Sul quanto a evolução físico química e microbiológica. **Veterinária em foco**, v.2, n.1, p.15-24, 2004.

NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F.; DORES, M. T. Diferenças sazonais no fermento endógeno utilizado na produção do queijo minas artesanal produzido na Serra da Canastra, Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 63, p. 26- 30, 2008.

NOLLET, L.; TOLDRÁ, F. **Handbook of Dairy Foods Analysis**. CRC Press, USA, 2010.

NONNENMACHER, J. A. Q. **Estratégias, custos e formação de preços em uma empresa de queijos finos: o caso da Confer Alimentos**. 2009. 68 p. Monografia (Graduação em Administração) Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

NORTE, Alexandre Ribeiro. **Cor e Textura em Queijos e Mortadelas comercializados em Janaúba-MG**. Monografia do curso de Agronomia da Universidade Estadual de Montes Claros para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Agrônoma. Janaúba MG, Out., 2010.

NOZIÈRI, P.; GRAULET, B.; LUCAS, A.; MARTIN, B.; GROLIER, P.; DOREAU, M. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products: Animal Fees **Science and Technology**, v. 131, n. 3, p. 418-450, 2006.

PACINI, F., CARIOLATO, D., ANDRIGHETTO, C., LOMBARDI, A., Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. **Microbiology Letters**. 261, 69–73, 2006.

PAQUEREAU, Benoit. **Denominação de Origem de Queijo coalho do Agreste de Pernambuco**. II Encontro do Projeto Denominação de Origem de Queijo coalho do Agreste de Pernambuco. Garanhuns, Pernambuco, 2007.

PARENTE, E.; ROTA, M. A.; RICCIARD, A.; CLEMENTI, F. Characterization of natural Starter cultures used in the manufacture of Pasta Filata cheese in Basilicata (Southern Italy). **International Dairy Journal**, v. 7, p. 775-783, 1997.

PARK, Y. Proteolysis and Lipolysis of Goat Milk Cheese; **J. Dairy Sci.** 84, p.84 – 92, 2001.

PAULA, J. C. J. ;CARVALHO, A. F. ; FURTADO, M. M. Princípios Básicos de Fabricação de queijo: Do Histórico à Salga. **Revista Instituto Cândido Tostes**, Mar/Jun, n° 367/368, 64: 19-25, 2009.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. L.; COSTA JÚNIOR, L. C. G. C. **Físico- química do leite e derivados** – Métodos analíticos. 1.ed. Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 2001. 190p.

PERRY, Katia S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, vol. 27, nº 2, p. 293-300, 2004.

PICQUE, D.; PERRET, B.; LATRILLE, E.; CORRIEU, G. Caractérisation et classification de bactérias lactiques à partir de la mesure de leur cinétique d' acidification. **Food Science and Technology**, v. 25, p. 181-186, 1992.

QUEIJOS NO BRASIL. Disponível em:
<<http://www.queijosnobrasil.com.br>> . Acesso em: agosto. 2013.

QUIBERONI, A. et al. Comparative analysis of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 461-469, 2003.

RENZ, U.; PUHAN, Z. Factors promoting bitterness in yoghurt. **Milchwissenschaft**, v. 30, p. 265, 1975.

RESENDE, Maria de Fátima Silva. **Queijo minas artesanal da serra da canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas**. Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 2010.

REZENDE, D. C. **Estratégias de marketing para o mercado de queijos finos: um estudo no varejo de Belo Horizonte**. 2000, 141 p. Dissertação de Mestrado em Administração, Universidade Estadual de Lavras, Lavras, 2000.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A G. **Química de Alimentos**. 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 124 p. 2004.

RIBEIRO, Jéssica Caroline Bigaski; CARDOSO, Carolina Rentz; ESMERINO, Luís Antônio; SANTOS, Renata Dinnies; DEMIATE, Ivo Mottin; NOGUEIRA, Alessandro.

Qualidade físico-química e microbiológica do queijo parmesão ralado comercializado em Ponta Grossa, Paraná. **Rev. Inst. Latic. Cândido Tostes**, Jul/Ago, nº 387, 67: 21-29, 2012.

RIBEIRO, M. **Textura de Queijo – Um estudo de variáveis de processamento**. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos; Universidade Técnica de Lisboa – Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 1998.

ROBERT, N. F. Fabricação de queijos especiais a partir do leite de vaca. **Boletim Técnico do SEBRAE**, Santa Catarina, 87 p., 2007.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricacion de queso**. 2. ed. Editorial Acribia, S.A., 488 p., Zaragoza, Espanha, 2002.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2001.

SCHIFFMAN et al. **Consume Behavior**, 6th.edition, Prentice Hall, 2000.

SEBRAE (Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas), Estudos de Mercado - Queijos nacionais, relatório completo, 2008.

SENAR (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural), Como produzir leite de qualidade. Coleção SENAR, 2012.

SILVA, Neusely da.; et al. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 4ed. São Paulo: Varela, 624p., 2010.

SILVA, WILLIAM SOARES DA. **Comportamento mecânico do queijo de coalho tradicional, com carne seca, tomate seco e orégano armazenados sob refrigeração**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB – Campus de Itapetinga, 2013. 59p.

SYMONEAUX, R., GALMARINI, M.V. & MEHINAGIC, E. Comment analysis of consumer's likes and dislikes as an alternative tool to preference mapping. A case study on apples. **Fd Quality Prefer.**, 24, 59–66, 2012.

SISTEMA BRASILEIRO DO AGRONEGÓCIO, Disponível em:
<<http://www.sba1.com/noticias/pecuaria-de-leite>>, acesso em 05 de out. 2013.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; Mc SWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **Int. Dairy J.**, Huntington, v. 11, p. 327-345, 2001.

SOUZA, M. T. de. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 211 p., 2003.

SOLOMON et al. *Consumer Behaviour – A European Perspective*, 2nd. Edition, Prentice Hall, 2002.

SZCZESNIAK, A. S. Texture is a sensory property. Food quality and preference, **Elsevier**, v. 13, p. 215-225, 2002.

TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (TACO)/NEPA – Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação. UNICAMP. 4. ed. Revisada e Ampliada, Campinas, 161 p. 2011.

TAGLE, M. A. **Nutrição**. 1.ed. São Paulo: **Artes Médicas**. 1981. 233p.

TEIXEIRA, E.; MEINERT, E. M.; BARBETTA, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: UFSC, 1987.

TERRA, N. N. **Apontamentos de tecnologia de carnes**. São Leopoldo: Editora Unisinos, 1998.

TIMM, C. D. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado integral, produzido em micro-usinas da região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 106, p. 100-104, 2003.

TSAKALIDOU, E., ZOIDOU, E., POT, B., LUDWIG, W., WASSIL, L., DEVRIESE, L.A., KALANTZOPOULOS, G., SCHLEIFER, K.H., KERSTERS, K., Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology** 48, 519–527, 1998.

TUNICK, M. H. Rheology of dairy foods that gel, stretch, and fracture. **Journal Dairy Science**, v. 83, n. 8, p. 1892-1989, 2000.

TUNICK, M.H.; COOKE, P.H.; MALIN, E.L.; SMITH, P.W.; HOLSINGER, V.H. Reorganization of casein submicelles in Mozzarella cheese during storage. **International Dairy Journal**, v.7, p.149-155, 1997.

VALLE, José Leonardo Eto do.; CAMPOS, Sônia Dedeca da Silva.; YOTSUYANAGI, Katumi.; SOUZA, Genevaldo de., Influência do teor de gordura nas propriedades funcionais do queijo tipo mozzarella. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 24(4): 669-673, out.-dez., 2004.

VINCENT, S.J.F., FABER, E.J., NEESER, J.R., STINGELE, F., KAMERLING, J.P., Structure and properties of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus macedonicus*. **Glycobiology**. 11, 131–139, 2001.

VIOTTO, W. H., CUNHA, C. R. Teor de sólidos do leite e rendimento industrial. In: MESQUITA, A. J., DURK, J. W., COELHO, K. O. **Perspectivas e avanços da qualidade do leite no Brasil**. Goiânia: Talento, 2006. V.1, p. 241-258.

WALKER, M.; RAPPLEY, R. (tradução Fernando Salvador Moreneo). **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Editora Ateneu, 1999.

WALSTRA, P. *Physical Chemistry of Foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2003.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J. ; NOOM, A. ; LELEMA, A. VAN BOEKEL, M. A. J. S. ; *Dairy technology: principles of milk properties and processes*. **Food science and technology**. Marcel Dekker, Inc. New York, 727 p. 1999.

WANG, H. H.; SUN, D. W. Melting characteristics of cheese: analysis of effects of cooking conditions using computer vision technology. **J. Food Eng.**, Barking, v. 51, p. 305-310, 2002.

ZANATTA, P. BASSO, A. A new approach to the characterization of *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* based on acidification rates. **Lait**. Volume 72, n. 3, p. 285-295, 1992.

APÊNDICE A



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Unidade Pato Branco
 Laboratório de Qualidade Agroindustrial
LAQUA - Alimentos e Água



LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA N°. 603 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBL 1 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
N°. de registro: 603/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC n°. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 604 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBL 2 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 604/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Salmonella sp	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 605 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PA1 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 605/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 606 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PA2 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 606/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Salmonella sp	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 607 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBN 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 607/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 608 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PAN 30 dias
Data da coleta: 06/08/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 06/08/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 608/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(1) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 20/08/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 609 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBL 1 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 609/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 27/09/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 610 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBL 2 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 610/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 27/09/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 611 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PA1 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 611/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 27/09/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 612 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PA2 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 612/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 27/09/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 613 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PBN 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 613/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 29/09/2013

LAUDO DE ANÁLISE MICROBIOLÓGICA Nº. 614 UTFPR/2013

Solicitante: Carla Todescatto
Coletor da Amostra: Carla Todescatto
Produto: Queijo
Identificação da amostra: PAN 60 dias
Data da coleta: 10/09/2013
Data do recebimento da amostra no laboratório: 10/09/2013
Cidade/Estado: Pato Branco – PR
Nº. de registro: 614/2013

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Parâmetros	Resultados
Bolores e Leveduras	
Estafilococos Coagulase Positiva	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
<i>Salmonella sp</i>	Ausência
Coliformes totais a 35 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL
Coliformes Termotolerantes a 45 °C	<1,0x10¹ UFC ⁽¹⁾ g/mL

Notas:

(2) UFC – Unidade Formadora de Colônia

Metodologia Utilizada: Instrução Normativa 62 de 26/10/2003. MAPA

INTERPRETAÇÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução – RDC nº. 12, de 02 de Janeiro de 2001, os produtos alimentícios devem atender as seguintes características microbiológicas:

GRUPO DE ALIMENTOS	MICROORGANISMO	Tolerância para Amostra INDICATIVA
8. B- Queijos b) de média umidade: 36% (Danbo, pategrás sandwich, prato, tandil, tilsit, tybo, mussarelas (mozzarella, muzzarella) curado e similares) e de queijo ralado e em pó.	Coliformes a 45°C/g	10 ³
	Estaf.coag.positiva./g	10 ³
	Salmonella sp/25g	Ausência
	L. monocytogenes/25g	Ausência

CONCLUSÃO: Comparando os valores encontrados nas análises realizadas com os valores acima estabelecidos, este PRODUTO ESTÁ EM CONFORMIDADE COM OS PADRÕES LEGAIS VIGENTES.

DATA: 27/09/2013



Prof. Msc. Pedro Paulo Pereira
 CRQ 09300206 IX Região
Responsável Técnico

Registro no CRQ – 02335 de acordo com a lei 2.800 de 18/06/1956

Via do Conhecimento km 01, Cx. Postal 571 – Pato Branco – PR CEP: 85.501-970 FONE: (46)3220-2537 e-mail: laqua-pb@utfpr.edu.br

APÊNDICE B**Ficha de Análise Sensorial de Queijos****Dados Pessoais:**

NOME (opcional): _____

SEXO (obrigatório): () Feminino () Masculino

FAIXA ETÁRIA (obrigatório): () <25 anos () 25-35 anos () 36-50 anos () >50 anos

Hábitos de Consumo:

Que tipos de queijos você prefere?

- () Frescos (Minas Frescal , Ricota)
- () Convencionais (Mussarela, Prato, Nozinho, Coalho)
- () Finos (Gorgonzola, Parmesão, Suíço, Gouda, Camembert)

Indique sua frequência de consumo de queijos:

- () Todos os dias
- () Uma vez por semana
- () Mais de uma vez por semana
- () Uma vez por mês
- () Não consumo

Qual a quantidade que você costuma consumir por vez?

- () Uma fatia
- () Duas fatias
- () Três fatias
- () Mais de três fatias
- () Não consumo

Por que motivo você consome queijos?

- () Pelo sabor
- () Pelo preço
- () Uso em preparação culinárias
- () Não consumo
- () Outros (especificar) _____

Como você costuma consumir queijos?

- () Sozinho, sem acompanhamento
- () Com acompanhamento (massas, pão, geléias, vinho)
- () Em preparações culinárias
- () Outros (especificar) _____

TESTE DE ACEITAÇÃO

Você está recebendo seis (06) amostras de queijo codificadas, observe sua aparência, cor, cheiro, sabor e textura, marque com um **X** a nota que representa sua aceitabilidade nesses queijos. Observe na escala hedônica abaixo o significado de cada número.

Em seguida marque com **X** a(s) característica(s) identificada/observada(s) em cada amostra

ESCALA HEDÔNICA:					
1 <input type="checkbox"/>	Desgostei muito	2 <input type="checkbox"/>	Desgostei	3 <input type="checkbox"/>	Nem desgostei,
	nem gostei	4 <input type="checkbox"/>	Gostei	5 <input type="checkbox"/>	Gostei muito

APARÊNCIA					
Amostra	Nota				
185	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
246	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
445	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
673	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
845	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
967	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>

COR					
Amostra	Nota				
185	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
246	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
445	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
673	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
845	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>
967	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	3 <input type="checkbox"/>	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>

CHEIRO						
Amostra	Nota		Características			
185	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			
246	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			
445	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			
673	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			
845	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			
967	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Lácteo	<input type="checkbox"/> Adocicado	<input type="checkbox"/> Ranço	
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____			

TEXTURA							
Amostra	Nota		Características				
185	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme	<input type="checkbox"/> Macia	<input type="checkbox"/> Dura	<input type="checkbox"/> Amanteigada	<input type="checkbox"/> Pegajosa
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____				
246	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme	<input type="checkbox"/> Macia	<input type="checkbox"/> Dura	<input type="checkbox"/> Amanteigada	<input type="checkbox"/> Pegajosa
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____				
445	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme	<input type="checkbox"/> Macia	<input type="checkbox"/> Dura	<input type="checkbox"/> Amanteigada	<input type="checkbox"/> Pegajosa
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____				
673	1 <input type="checkbox"/>	2 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme	<input type="checkbox"/> Macia	<input type="checkbox"/> Dura	<input type="checkbox"/> Amanteigada	<input type="checkbox"/> Pegajosa
	4 <input type="checkbox"/>	5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Outro: _____				

845	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Amanteigada <input type="checkbox"/> Pegajosa <input type="checkbox"/> Outro: _____
967	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Firme <input type="checkbox"/> Macia <input type="checkbox"/> Dura <input type="checkbox"/> Amanteigada <input type="checkbox"/> Pegajosa <input type="checkbox"/> Outro: _____

SABOR		
Amostra	Nota	Características
185	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____
246	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____
445	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____
673	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____
845	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____
967	1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5 <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Salgado <input type="checkbox"/> Adocicado <input type="checkbox"/> Ácido <input type="checkbox"/> Amargo <input type="checkbox"/> Picante <input type="checkbox"/> Outro: _____

Quanto a sua intenção de compra dos queijos?				
185	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria
246	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria
445	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria
673	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria
845	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria
967	() Não compraria	() Talvez compraria	() Compraria	() Com certeza compraria

Obrigada pela colaboração!

