

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**ANA CAROLINE SACOMAN PIAZZA  
ANA PAULA ROSSI  
GRAZIELI BORTOLUZZI**

**UTILIZAÇÃO DE INFUSÕES DE PLANTAS CONDIMENTARES COM  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS  
FRESCAL**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**MEDIANEIRA  
2013**

**ANA CAROLINE SACOMAN PIAZZA**

**ANA PAULA ROSSI**

**GRAZIELI BORTOLUZZI**

**UTILIZAÇÃO DE INFUSÕES DE PLANTAS CONDIMENTARES COM  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS  
FRESCAL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Diplomação, do Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin.

Co-orientadora: Msc. Prof<sup>a</sup>. Eliana Maria Baldissera.

**MEDIANEIRA**

**2013**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**  
**CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS**

**TERMO DE APROVAÇÃO**

UTILIZAÇÃO DE PLANTAS CONDIMENTARES COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Por

**ANA CAROLINE SACOMAN PIAZZA**

**ANA PAULA ROSSI**

**GRAZIELI BORTOLUZZI**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado às 18:40 h do dia 27 de agosto de 2013 como requisito parcial para a obtenção do título de Tecnólogo no Curso Superior de Tecnologia em Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira. As candidatas foram arguidas pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

---

Prof. Dr. Valdemar Padilha Feltrin  
UTFPR – Campus Medianeira  
(Orientador)

---

Prof.<sup>a</sup> Msc. Eliana Maria Baldissera  
UTFPR – Campus Medianeira  
(Co-orientadora)

---

Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra  
UTFPR – Campus Medianeira  
(Convidado)

---

Prof. Sirley Laurindo Ramalho  
UTFPR – Campus Medianeira  
(Convidado)

---

Prof. Msc. Fábio A. Bublitz Ferreira  
UTFPR – Câmpus Medianeira  
(Coordenador TCC)

## **AGRADECIMENTOS**

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase da nossa vida. Portanto, desde já pedimos desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas elas podem estar certas que fazem parte do nosso pensamento e gratidão.

A Deus, primeiramente, por nos conceder a força e a capacidade necessária para elaborar, compreender, sonhar e realizar esse trabalho.

A família que acompanhou essa caminhada, sempre apoiando e dando força tanto nos momentos de alegria quanto nos momentos de dificuldade, sem dúvida a família é a base de tudo.

Ao professor orientador Valdemar Padilha Feltrin e a professora co-orientadora Eliana Maria Baldissera que sempre estavam dispostos a nos ajudar e acompanharam todos os passos desse trabalho.

A todos os professores que passaram por nossas vidas ao longo do curso, pelo conhecimento que nos foi transmitido.

A Rute Womer, responsável pelos laboratórios, pela força e ajuda.

E a todos, que de uma forma ou outra, contribuíram para que essa etapa tão importante da nossa trajetória acadêmica fosse concluída.

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.*

*Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

***Madre Teresa de Calcuta***

## RESUMO

PIAZZA, Ana Caroline Sacoman; ROSSI, Ana Paula; BORTOLUZZI, Grazieli. **Utilização de infusões de plantas condimentares com atividade antimicrobiana na produção de queijo Minas frescal**. 2013. 52f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira. 2013.

A busca por alimentos saudáveis e com alto valor nutricional é um dos principais objetivos das pesquisas na área de alimentos. Entre os alimentos com alto valor protéico está o queijo Minas frescal que é um produto tipicamente brasileiro, com elaboração simples e baixo custo de produção, mas com grande aceitação no mercado consumidor. Por ser um produto com alto teor de umidade possui alta contaminação microbiológica, sendo assim, sentiu-se a necessidade de adicionar ingredientes que aumentasse sua durabilidade. As ervas e condimentos são estudados há mais de um século em todo o mundo, por ter propriedades antimicrobianas, capazes de reduzir a carga de micro-organismos dos alimentos. No presente trabalho foram desenvolvidas 5 formulações de queijo Minas frescal com adição de plantas condimentares, F1 (3,5% de chimichurri e 1% de orégano), F2 (3,5% de orégano, 1,5% de hortelã e 1,5% de alho), F3 (2% de hortelã), F4 (2% de orégano) e F5 (2% de alho em pó) e após a fabricação foram realizadas análises microbiológicas para comprovar a atividade antimicrobiana das plantas condimentares. As análises microbiológicas realizadas foram: aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes 35°C e coliformes 45°C. Também foram realizadas análises de acidez, proteínas, gordura e umidade. Os padrões físico-químicos classificaram as amostras como sendo queijos semi-gordos e de alta umidade. Os resultados apresentados nas análises microbiológicas demonstraram que, de todas as formulações de queijo que exerceram atividade antimicrobiana, as que apresentaram melhores resultados, ou seja, maiores atividade antimicrobiana foram a F1 e a F5, diminuindo as contagens em até 3 ciclos logarítmicos. Nas contagens de aeróbios mesofílicos e *Staphylococcus* coagulase positiva, o queijo Minas Padrão sem adição de condimentos apresentou contagem acima de  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> em 15 e 30 dias de estocagem. Para coliformes 35°C e coliformes 45°C as formulações F1, F2, F4 e F5 foram as mais eficazes e diminuíram as contagens destes micro-organismos quando comparadas com a amostra padrão que não teve condimento adicionado. A utilização de plantas condimentares adicionadas na produção de queijo Minas frescal foi efetiva na redução das contagens de bactérias aeróbias mesófilas, *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes totais e termotolerantes.

**Palavras-chave:** Queijo Minas frescal. Plantas condimentares. Aeróbios mesófilos. *Staphylococcus* coagulase positiva. Coliformes.

## ABSTRACT

PIAZZA, Ana Caroline Sacoman; ROSSI, Ana Paula; BORTOLUZZI, Grazieli. **Use of condiments infusions with antimicrobial activity in the production of *Minas* fresh cheese.** 2013. 52p. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira. 2013.

The search for healthful foods and with high nutritional value is one of the main objectives of the research in the food area. It enters foods with high proteinic value is the *Minas* fresh cheese that are a typically Brazilian product, with simple elaboration and low cost of production, but with great acceptance in the consuming market. For being a product with high humidity it possess high microbiological contamination, being thus, felt necessity to add ingredients to it that increased its durability. The grass and condiments are studied have a century in the whole world more than, for having properties microbial, capable to reduce the load of microorganisms of foods. In the present work 5 formularizations of *Minas* fresh cheese had been developed added of plants condiments, F1 (3.5% of chimichurri and 1% of oregano), F2 (3.5% of oregano, 1.5% of mint and 1.5% of garlic), F3 (2% of mint), F4 (2% of oregano) and F5 (2% of garlic in dust) and after the manufacture had been carried through microbiological analyses to prove the antimicrobial activity of the plants. The carried through microbiological analyses had been: aerobic mesophyll microorganisms, coagulase positive *Staphylococcus*, coliforms at 35°C and coliforms at 45°C. Also analyses of acidity, fat and humidity had been carried through. The physicochemical parameters classified the samples as semi-fat cheese and high humidity. The results presented in the microbiological analysis showed that all formulations of cheese exerted antimicrobial activity, presented the best results, in other words, higher antimicrobial activity were F1 and F5, decreasing the count by up to 3 log cycles. In counts aerobic mesophyll and *Staphylococcus* coagulase positive, *Minas* fresh cheese standard without added condiments presented score above  $10^6$  CFU g<sup>-1</sup> at 15 and 30 days of storage. For coliforms at 35°C and coliforms at 45°C the formularizations F1, F2, F4 and F5 had been most efficient and had diminished the countings of these microorganisms. The use of plants condiments added in the production *Minas* fresh cheese was effective in the reduction of the countings of mesófilos aerobic microorganisms, coagulase positive *Staphylococcus*, coliforms at 35°C and coliforms at 45°C.

**Keywords:** *Minas* fresh cheese. Condiments plants. Aerobic mesophyll microorganisms. *Staphylococcus*. Coliforms.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fluxograma do Processo de Produção do Queijo Minas Frescal.....37



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Formulações para queijo Minas Frescal Padrão e com adição da infusão e das plantas condimentares na massa .....	34
<b>Tabela 2:</b> Formulações para queijo Minas Frescal com a utilização de plantas condimentares adicionadas na massa .....	35
<b>Tabela 3:</b> Ingredientes utilizados na elaboração do queijo Minas Frescal em suas diferentes formulações e concentrações .....	35
<b>Tabela 4:</b> Resultados da contagem de micro-organismos Aeróbios Mesófilos para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (UFC/g).....	41
<b>Tabela 5:</b> Resultados da contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (UFC/g).....	42
<b>Tabela 6:</b> Resultados da contagem de Coliformes 35°C (Totais) para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (NMP/g).....	43
<b>Tabela 7:</b> Resultados da contagem de Coliformes 45°C (Fecais) para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (NMP/g).....	44
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros Físico-químicos do queijo Minas Frescal Padrão, F1 e F2....	45

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
3.1 QUEIJO .....	15
3.2 A IMPORTÂNCIA DO QUEIJO .....	15
3.3 QUEIJO MINAS FRESCAL .....	16
3.4 MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS .....	18
3.5 MICRO-ORGANISMOS COLIFORMES.....	18
3.5.1 Coliformes Totais .....	19
3.5.2 Coliformes Termotolerantes .....	19
3.5.3 <i>Escherichia coli</i> .....	20
3.5.4 Aplicação como Indicadores.....	20
3.6 <i>STAPHYLOCOCCUS</i> COAGULASE POSITIVA .....	21
3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONDIMENTOS .....	22
3.8 PLANTAS CONDIMENTARES.....	23
3.8.1 Orégano .....	24
3.8.2 Alho .....	24
3.8.3 Hortelã.....	25
3.8.4 Chimichurri .....	25
3.9 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS .....	26
3.9.1 Pasteurização .....	27
3.9.2 Preparo do Leite para Coagulação.....	27
3.9.2.1 Fermento .....	28
3.9.2.2 Cloreto de cálcio.....	28
3.9.2.3 Coalho .....	28
3.9.3 Coagulação do Leite.....	29
3.9.4 Agitação .....	29
3.9.5 Corte da Coalhada .....	30
3.9.6 Mexedura .....	30
3.9.7 Coleta da Massa .....	31
3.9.8 Salga dos Queijos .....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
4.1 MATERIAIS .....	33
4.2 MÉTODOS .....	33
4.2.1 Testes Preliminares.....	33

4.2.2	Formulações.....	34
4.2.3	Ingredientes.....	35
4.2.4	Processamento .....	36
4.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS .....	38
4.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS .....	39
4.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>41</b>
5.1	CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	41
5.1.1	Micro-organismos Aeróbios Mesófilos.....	41
5.1.2	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva .....	42
5.1.3	Coliformes Totais .....	43
5.1.4	Coliformes Termotolerantes .....	44
5.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS .....	45
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>48</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O Queijo Minas frescal é um queijo de origem brasileira, cujo processo de elaboração é simples e requer equipamentos de baixo custo, permitindo utilizar a mão-de-obra de pequenas propriedades que desejam buscar um lucro rápido e segurança em seus investimentos. Apresenta-se no mercado com formato cilíndrico, peso variando entre 300 g e 5 kg, consistência branda e macia, textura com ou sem olhaduras mecânicas, cor esbranquiçada, sabor suave ou levemente ácido e crosta fina. Esse derivado lácteo é um dos mais consumidos no Brasil, ficando atrás apenas dos queijos mussarela e prato. Por ser um produto de elevada umidade, deve ser consumido em poucos dias (EMBRAPA, 2004).

Segundo o Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade n145/96, "*entende-se por Queijo Minas frescal o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas*".

Segundo Rocha et al. (2006), o queijo apresenta susceptibilidade a contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima ou por contaminações cruzadas durante ou após o processamento. As contaminações, aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para consumo.

Segundo Brito et al. (2005), o leite é composto por aproximadamente 12 a 13% de elementos sólidos e 87% de água. Dentre esses elementos sólidos estão os lipídios, carboidratos, proteínas, sais minerais e vitaminas. As proteínas representam de 3% a 4% destes sólidos totais. Essa porcentagem pode variar de acordo com a raça do animal e sua alimentação, por exemplo.

A principal proteína encontrada no leite é a caseína, que é muito importante na fabricação dos queijos e também apresenta uma alta qualidade nutricional. Por ser resistente ao calor, a pasteurização não a desestabiliza. No entanto, a caseína não possui grande resistência à acidez. Com mudanças nessa acidez, as estruturas das micelas se rompem, fazendo com que a caseína se precipite e forme coágulos (BRITO et al., 2005).

A caseína e a gordura são responsáveis pela consistência e cor dos produtos lácteos, elas têm importância fundamental na manufatura de vários derivados do leite e representam a maior concentração de elementos sólidos dos queijos, e é essa concentração de elementos sólidos que determinam o valor industrial do leite, pois quanto mais gordura e proteína, maior o rendimento terá ao fabricar os derivados lácteos (BRITO et al., 2005).

As plantas produzem um vasto número de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador na tentativa de se adaptarem às mudanças do meio ambiente. Essas substâncias podem ser isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais (WILLIAMS, 2001 apud BARBOSA, 2008).

As ervas e condimentos são estudados há mais de um século em todo o mundo, a fim de elucidar os compostos químicos responsáveis pelos efeitos fisiológicos e atividade contra micro-organismos, bem como os mecanismos pelos quais estes efeitos são manifestados (PORTE; GODOY, 2001).

Segundo Lima (2001) apud Moraes (2006) o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Em amplo estudo sobre plantas medicinais realizaram uma avaliação sobre a atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de espécies vegetais contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e espécies fúngicas.

Existe uma tendência mundial quanto ao uso de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos (SOUZA et al., 2005).

Diante deste contexto, este trabalho tem como objetivo produzir queijo Minas frescal com infusão de plantas condimentares e realizar análises microbiológicas, associando o cunho científico comprovando a atividade antimicrobiana das plantas condimentares, bem como incentivar a produção de queijos com padrões microbiológicos aceitáveis.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a fabricação de queijos Minas frescal com infusões de plantas condimentares e posterior realização de análises microbiológicas para comprovar a atividade antimicrobiana das plantas condimentares e assim incentivar a produção de queijos com padrões microbiológicos aceitáveis.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fabricar as diferentes formulações de queijo Minas frescal com as infusões das plantas condimentares;
- Realizar as análises microbiológicas para micro-organismos aeróbios mesófilos, coliformes 35°C, coliformes 45°C e *Staphylococcus* coagulase positiva nas diferentes formulações de queijos Minas frescal;
- Realizar as análises físico-químicas de umidade, gordura, acidez e proteína.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 QUEIJO**

O queijo é uma das formas mais antigas de preservar as características nutricionais do leite, transformando-o em um produto mais estável, palatável, cujas qualidades são mantidas e podem ser padronizadas ou adaptadas às necessidades do mercado. É um concentrado láteo que apresenta na composição: caseína, gordura, água e pequenas quantidades de lactose, albuminas e sais solúveis do leite. É obtido pela coagulação do leite, pela ação de certas enzimas proteolíticas, ácido láctico produzido por micro-organismos ou mesmo pela acidificação direta utilizando ácido láctico (OLIVEIRA; CARUSO, 1996 apud ALVES, 2010).

A fabricação de queijos consiste uma série de operações desde a produção do leite até o último dia de maturação e expedição para o mercado. A qualidade do queijo depende diretamente da qualidade do leite, sendo necessário um rígido controle de qualidade durante todas as fases de processamento, contudo, o queijo é um alimento de grande comercialização, apresentando vantagens do ponto de vista tecnológico: é um produto de fácil aceitação, apresenta elevado rendimento na fabricação, o que implementa o seu escoamento e distribuição no mercado (FURTADO, 1991).

#### **3.2 A IMPORTÂNCIA DO QUEIJO**

Desde os tempos mais remotos, o homem cuidou da exploração do leite, com o qual fabricava, rudimentarmente, a manteiga e o queijo. A coagulação do leite obtinha-se pela acidificação espontânea ou pela ação de diversas substâncias, sendo a principal, o coalho, que é um extrato do estômago de mamíferos. Usava-se, também, coagular o leite por meio de certos sucos de



origem vegetal, como da flor do cardo (*Cynara cardunculus*), do figo e outros (KROLOW, 2006).

A produção do leite sempre esteve unida com a intenção do homem de conservar a tão valiosa e ao mesmo tempo tão deteriorável proteína do leite. Os diferentes procedimentos para fabricação dos queijos, que implicam uma série de transformações bioquímicas, fazem com que a caseína adquira um sabor agradável e característico para cada tipo de queijo (SPREER, 1991).

Os queijos são alimentos fundamentais para uma vida saudável. Derivados do leite são alimentos ricos em proteínas de alto valor biológico, cálcio, fósforo, zinco, iodo, selênio, vitaminas e oligoelementos (LACTEA BRASIL, 2006).

No Brasil e no mundo, o queijo é um dos produtos láteos que mais se difundiu e um dos que mais sofreu adaptações da técnica de elaboração. Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação ocasionam, conseqüentemente, o surgimento dos vários tipos existentes, cerca de 2.000 tipos no mundo. A tecnologia de fabricação compreende as seguintes etapas básicas: seleção e pasteurização do leite, coagulação do leite, corte da coalhada para liberação do lactosoro, enformagem e prensagem, salga e embalagem (SPREER, 1991; PERRY, 2004 apud ALVES, 2010).

### **3.3 QUEIJO MINAS FRESCAL**

O queijo Minas frescal encontra-se entre os queijos mais consumidos no Brasil. Apresenta massa crua, coloração esbranquiçada, consistência mole e textura fechada. Normalmente é vendido na forma cilíndrica, com o peso variando em torno de 500g a 3 kg. O queijo acabado apresenta, em média, a seguinte composição: 55% a 58% de umidade; 17% a 19% de gordura; teor de sal variando entre 1,4% e 1,6%; e pH entre 5,0 e 5,3 (SILVA, 2005).

Tornou-se muito popular, sendo hoje comercializado em todas as regiões e produzido em fábricas de pequeno, médio e grande porte, possuindo um

processo de fabricação simples, com utilização de equipamentos tradicionais (FURTADO, 2005).

O queijo Minas frescal é um produto altamente perecível, pela elevada taxa de umidade. Tem uma durabilidade de oito a dez dias, devendo ser conservado refrigerado até o consumo. Devido ao seu bom rendimento na produção é um produto com preços acessíveis. Não é prensado e nem maturado. Para sua fabricação é utilizado leite pasteurizado, cloreto de cálcio, ácido láctico, coalho, sal e água destilada (BUSNELLO, 2008).

Devido à adoção de diferentes métodos de fabricação (por exemplo, com adição de ácido láctico ou emprego de fermento, assim como variações na temperatura de coagulação ou até mesmo emprego de prensagem), tornou-se um tipo de queijo bastante irregular em termos de padrão de consistência, textura, sabor, durabilidade e rendimento, chegando inclusive a ser fabricado por meio do processo de ultrafiltração (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

Por apresentar elevado teor de umidade, ser produto altamente perecível e passar por uma grande manipulação, o queijo Minas frescal apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, sendo que muitas dessas bactérias podem ser patogênicas ou produzir metabólitos microbianos e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (CÂMARA et al., 2002 apud MARTINS, 2012).

Diversos relatos indicam que queijos do tipo Minas Frescal comercializados no Brasil são amplamente contaminados. Araújo et al. (1997) observaram que 100% das amostras de queijo-de-minas frescal analisadas, obtidas em supermercados e padarias localizadas na cidade do Rio de Janeiro, revelaram a presença de coliformes fecais em níveis acima dos tolerados. Oliveira et al. (1998) relataram a detecção de coliformes totais e fecais acima dos permitidos, respectivamente, em 46,9% e 9,4% das amostras de queijo-de-minas elaboradas por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo. Pereira et al. (1999) observaram, em Belo Horizonte, que 90% das amostras de queijo-de-minas frescal analisadas no período de 1995-96 apresentaram coliformes fecais acima dos limites estabelecidos por lei (ROCHA, 2006).

### 3.4 MICRO-ORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS

A Contagem Total de Aeróbios Mesófilos em placas, (Aerobic Plate Count) também denominada Contagem Padrão em Placas, é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Não diferencia tipos de bactéria, sendo utilizado para se obter informações gerais sobre a qualidade de produtos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira. Não é um indicador de segurança, pois não está diretamente relacionado à presença de patógenos ou toxinas. Dependendo da situação, pode ser útil na avaliação da qualidade, porque populações altas de bactérias podem indicar deficiências na sanitização ou falha no controle do processo ou dos ingredientes (SILVA et al., 2007).

O método clássico de contagem total de aeróbios mesófilos em alimentos, descrito por Downes (2001), é a contagem padrão em placas (plaqueamento em profundidade, superfície ou filtração em membrana). O meio de cultivo recomendado para a maioria dos ensaios é o Àgar Padrão para Contagem (PCA), incubado a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C} / 48 \pm 2\text{h}$  (SILVA et al., 2010).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS COLIFORMES

Um dos principais grupos de micro-organismos indicadores da qualidade microbiológica em alimentos é o dos coliformes, formado por bactérias de família *Enterobacteriaceae*, Gram-negativas, não formadoras de endósporos e capazes de degradar a lactose com produção de gás a  $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$  (coliformes totais, que indicam deficiência na higiene de forma geral) ou a  $44,0\text{-}45,5^{\circ}\text{C}$  (coliformes termotolerantes, que indicam contaminação do alimento por material de origem fecal) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os grupos de coliformes a  $35^{\circ}\text{C}$  e a  $45^{\circ}\text{C}$  colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os homens e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos. Apesar das controvérsias com

relação aos micro-organismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes, em geral, a *Escherichia coli* têm merecido maior consideração (OKURA, 2010).

### 3.5.1 Coliformes Totais

O grupo dos coliformes totais é um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, que inclui 44 gêneros e 176 espécies. No grupo dos coliformes totais estão apenas as enterobactérias capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Mais de 20 espécies se encaixam nessa definição, dentre as quais se encontram tanto bactérias originárias do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também bactérias não entéricas (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, dentre outras). A capacidade de fermentar a lactose pode ser verificada pela formação de gás e/ou ácido, nos meios de cultivo contendo lactose. Essas características são utilizadas nos métodos tradicionais de contagem de coliformes totais (BRENNER; FARMER III, 2005 apud SILVA, 2007).

### 3.5.2 Coliformes Termotolerantes

O grupo dos coliformes termotolerantes, comumente chamados de coliformes fecais, é um subgrupo dos coliformes totais, restrito aos membros capazes de fermentar a lactose em 24 horas a 44,5-45,5°C, com produção de gás. Essa definição objetivou, em princípio, selecionar apenas as enterobactérias originárias do trato gastrointestinal (*Escherichia coli*), porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal (várias cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Em função disso, o termo coliformes fecais tem

vido, gradativamente, substituído por coliformes termotolerantes (SILVA et al.,2010).

### **3.5.3 *Escherichia coli***

A *Escherichia coli* está incluída tanto no grupo dos coliformes totais quanto no dos coliformes termotolerantes. Seu habitat natural é o trato intestinal de animais de sangue quente, embora também possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais. É tradicionalmente distinguida dos demais coliformes termotolerantes pelas características de crescimento no Àgar L-EMB (Levine eosina Azul de Metileno) e pelo perfil dos testes de indol e vermelho de metila (SILVA et al., 2007).

### **3.5.4 Aplicação como Indicadores**

A *Escherichia coli* foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por matéria fecal, e conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos (*Salmonella*, por exemplo). O padrão foi mudado para coliformes totais em 1915, pelo U.S. Public Health Service, baseado na premissa (questionável) de que todos os coliformes apresentavam igual valor como indicadores de contaminação fecal. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma série de razões: 1) *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, coliformes fecais ou enterobactérias não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, podendo ser encontrados em reservatórios ambientais.

2) Esses organismos são comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, podendo se tornar parte da microbiota residente (principalmente se as condições de limpeza são inadequadas).

3) Várias cepas de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados (SILVA et al., 2007).

Segundo a FAO (Food Agricultural Organization) e a OMS (Organização Mundial da Saúde) é possível avaliar a segurança (inocuidade) de alimentos em função dos níveis de *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias. Um alto índice desses micro-organismos pode estar, em certas circunstâncias, relacionado com uma maior probabilidade de presença de patógenos entéricos, porém, frequentemente não está. Da mesma forma, sua ausência nem sempre significa que os produtos estejam livres de bactérias entéricas patogênicas. As principais aplicações desses micro-organismos como indicadores, na verdade são:

- a) Enterobactérias e coliformes – indicadores das condições de higiene dos processos de fabricação, porque são facilmente inativados pelos sanitizantes e capazes de colonizar vários nichos das plantas de processamento, quando a sanitização é falha.
- b) Coliformes – indicadores de falha de processo ou de contaminação pós processo em alimentos pasteurizados, porque são facilmente destruídos pelo calor e não devem sobreviver ao tratamento térmico.
- c) *Escherichia coli* – indicador de contaminação fecal em alimentos “in natura” (mas não em alimentos processados).

### **3.6 STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA**

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, medindo de 0,5 a 1,0 µm, agrupadas em massas irregulares em forma de "cacho". Apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos, sendo aeróbias e anaeróbias facultativas. Podem crescer

em temperaturas de 7 a 48°C, com um ótimo de 30 a 37°C (BERGEY'S, 1994 apud NETO, 2002).

O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar. As peculiaridades do seu habitat tornam a sua presença largamente distribuída na natureza, sendo transmitido aos alimentos por manipuladores (CASTRO; IARIA, 1984 apud NETO, 2002).

O reservatório de *S. aureus* são os seres humanos e os animais de sangue quente, ocorrendo nas vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais indivíduos humanos saudáveis. Os manipuladores são a fonte mais freqüente de contaminação, embora os equipamentos e superfícies do ambiente também possam contaminar os alimentos. O úbere infectado de vacas leiteiras são uma fonte comum de contaminação do leite (SILVA et al, 2007).

### **3.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE CONDIMENTOS**

Tem sido crescente a investigação da potencialidade antimicrobiana de produtos vegetais. Impulsiona também esta busca, a preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos em todos os campos de estudo da microbiologia. O abuso por longos anos da utilização de compostos antimicrobianos apresenta-se como o fator principal para o surgimento de tal fenômeno de resistência (ANDREMONT, 2001 apud SOUZA, 2005).

Para que uma substância antimicrobiana exerça sua atividade é indispensável que ela seja capaz de atingir o alvo específico sobre o qual é capaz de atuar. Como a grande maioria das atividades metabólicas das células se desenvolve no interior do citoplasma, é necessário que essas substâncias antimicrobianas que ali atuam estejam aptas a atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática dos microrganismos. Os agentes antimicrobianos, de um modo geral, atravessam com maior facilidade a membrana simples das bactérias Gram-positivas do que a dupla membrana das bactérias Gram-negativas. Alguns

micro-organismos são resistentes a determinados antimicrobianos cujo alvo tem localização intracelular, pelo fato desses agentes não conseguirem ultrapassar adequadamente sua membrana citoplasmática; outros não têm necessidade de penetrar no citoplasma para exercer sua atividade, já que seu alvo de ação está localizado na parede celular ou na membrana citoplasmática (BLOCK; LAWRENCE, 1995; NETO, 1985; PELKSAR 1981 apud OURIVES, 1997).

### **3.8 PLANTAS CONDIMENTARES**

Os condimentos são utilizados com a finalidade de realçar ou repor características, como a cor e o sabor, que com o processamento, podem ser perdidas. Estima-se que existam mais de 70 condimentos diferentes, cultivados e utilizados em todo o mundo (MAIA; FERREIRA; ABREU, 2004).

As especiarias por muito tempo têm sido usadas como agentes de provedores de caracteres organolépticos característicos aos alimentos aos quais são adicionados. Porém, nos recentes anos tem surgido um interesse voltado para o emprego destes agentes como promissores compostos antimicrobianos em sistemas de conservação de alimentos, sendo tal fato evidenciado frente a crescente disponibilidade de trabalhos científicos com ênfase em tal assunto (EL-SHAMI et al., 1985; AKGUL; KIVANÇ, 1988; COSSETINO et al., 1999; DOMAN; DEANS, 2000; RISTORI et al., RADHAKRISHANAN-SRIDHAR; VELUSAMY-RAJAOPAL, 2003 apud SOUZA, 2005).

As plantas aromáticas e as especiarias são ricas em óleos essenciais caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, e por esta razão, seus produtos podem ser usados para retardar ou inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (MARINO et al., 2001 apud SANTOS, 2010).



### 3.8.1 Orégano

O Orégano tem alta atividade anti-oxidante pela presença de ácido fenólico e flavonóides. Adicionalmente tem propriedades anti-microbianas contra *Listeria monocytogenes* e outros patógenos presentes nos alimentos, o que faz com que seja bom para ajudar a preservar alimentos (VIA INTEGRAL, 2007).

Vários estudos relacionados aos diferentes extratos e óleos essenciais do orégano tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antioxidante e propriedades antimicrobianas (MILOS et al., 2000 apud OLIVEIRA, 2011).

Souza (2006) constatou, em estudo realizado com o óleo de orégano adicionado à carne moída o seu potencial antibacteriano. Nesse estudo foram usadas várias cepas de bactérias, entre elas: *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesius* e *S. aureus*. Além disso, os ótimos resultados apóiam a possibilidade do seu uso como alternativa antimicrobiano a ser aplicado nos sistemas de conservação de alimentos.

### 3.8.2 Alho

Bulbo comestível largamente utilizado em diferentes culturas culinárias, o alho tem sido usado como medicamento desde antes do nascimento de Cristo. Há registros de seu uso como medicamento desde a época dos faraós. Mais recentemente, pesquisas têm demonstrado alguns desses efeitos, principalmente em relação à sua atividade imunoestimulante, antiaterosclerótica, anticancerígena e antimicrobiana. Embora alguns dos resultados ainda sejam conflitantes devido à falhas metodológicas, as evidências sugerem resultado positivo contra várias enfermidades (MARCHIORI, 2003).

O uso medicinal dos diferentes tipos de alho como antimicrobianos é destacado por Cellini et al. (1996), atribuindo a alicina, um componente sulfuroso, a intensa atividade descrita. Ankri e Mirelman (1999) reforçam estas observações,

ressaltando a ação significativa sobre linhagens de *Escherichia coli* enterotoxigênicas, multidroga-resistentes (ARAÚJO, 2009).

### 3.8.3 Hortelã

*Mentha piperita*, da família *Lamiaceae* (Labiatae), reconhecida como menta, menta verdadeira, hortelã e *peppermint* (inglês), é uma planta rica em óleo essencial. O óleo é produzido na Índia, China, Inglaterra, EUA e Brasil, mas sua origem é inglesa, sendo extraído de folhas semi-secas, através da destilação a vapor. O óleo essencial, que possui aroma mentolado, balsâmico e fresco é constituído principalmente do mentol, mentona, cineol (SILVA, 2001 apud NEUWIRTH, 2008).

Mimica-Dukin et al., (2003) apud Trajano (2009), em um estudo realizado com óleo de hortelã observou ação bacteriostática principalmente sobre *Escherichia coli* e também ótimos resultados como bacteriostático e bactericida tanto para *Escherichia coli* como para *L. monocytogenes*.

### 3.8.4 Chimichurri

O Chimichurri é um molho típico da Argentina e do Uruguay, usado principalmente para fazer churrascos. Pode ser usado tanto para deixar a carne de molho antes de fazer o churrasco (marinada), como para molhar a carne enquanto esta sendo assada, ou mesmo para temperar depois de pronta. A base do chimichurri é a salsinha, o alho, o vinagre e o azeite de oliva. Sobre essa base, pode haver muitas variações, desde acrescentar ou substituir a salsinha por coentro, acrescentar orégano ou mesmo alfavaca ou manjericão, até acrescentar ou substituir o vinagre por suco de limão. É comum acrescentar alguma pimenta. A mais usual é a pimenta calabresa ou outra semelhante, mas pode ser páprica picante ou mesmo pimenta do reino (LAZARTE, 2012).

O Chimichurri utilizado nesse trabalho foi uma mistura de condimentos desidratados que continha alho moído, alho granulado, orégano, salsinha, pimentão, louro, coentro e sal.

### **3.9 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DOS QUEIJOS**

A fabricação de queijos consiste em uma série de operações desde a obtenção do leite até o último dia de maturação e expedição para o mercado. A qualidade do queijo depende diretamente da qualidade do leite, sendo necessário um rígido controle de qualidade durante todas as fases de processamento. Contudo, o queijo é um alimento de grande comercialização, apresentando vantagens do ponto de vista tecnológico: é um produto de fácil aceitação, apresenta elevado rendimento na fabricação, o que melhora seu escoamento e distribuição no mercado (FURTADO, 1991).

Segundo Furtado (1991) a fabricação de um queijo é um processo que pode durar meses desde a coleta do leite até o final da maturação. Entretanto, os principais fatores que determinam as características finais do queijo são regulados no espaço de poucas horas, começando com a chegada do leite ao tanque de fabricação até a sua prensagem nas formas. Este período é crucial, porque os tratamentos dispensados ao leite e à coalhada determinarão o tipo de queijo a ser elaborado, suas características e seu grau de qualidade. Não há dúvida de que esta é a parte do processo na qual o queijeiro pode exercer com plenitude sua capacidade de influir e alterar os rumos da fabricação, quando arte e ciência devem se misturar em benefício da qualidade do produto. A elaboração requer observação constante e cuidadosa, caso contrário poderá ocorrer erros. Por isso é tão importante conhecer os principais pontos da elaboração, sabendo relacioná-la com a composição e características dos queijos.

### **3.9.1 Pasteurização**

O processo de pasteurização permitido pela legislação para o leite consiste no aquecimento do produto em camada laminar submetido à temperatura de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização à placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C (BRASIL, 2002).

A pasteurização é a forma de garantir que o leite esteja isento de micro-organismos contaminantes prejudiciais à saúde, como bactérias e fungos. Como, durante a pasteurização, também ocorre a destruição de microrganismos favoráveis à produção de queijo, é preciso repor essa perda por meio da adição de fermento (SILVA, 2005).

Segundo Furtado (1991), para corrigir esse problema resultante do tratamento térmico, é adicionado fermento láctico ao leite para repor as bactérias desejáveis que auxiliam na coagulação.

### **3.9.2 Preparo do Leite para Coagulação**

Segundo a EMBRAPA (2004) nessa etapa são realizados os procedimentos necessários para coagular a caseína, dando origem à massa do queijo. Para a coagulação do queijo, é preciso adicionar ao leite os ingredientes descritos a seguir:

### **3.9.2.1 Fermento**

É uma cultura láctica, selecionada, que deve ser adicionada ao leite para a fabricação de queijos com a finalidade de produzir ácido láctico, reduzindo o crescimento de microorganismos indesejáveis; desenvolver pequena acidez, que aumentará o poder de coagulação do coalho; melhorar a consistência do coágulo auxiliando na etapa de retirada do soro (SILVA, 2005).

### **3.9.2.2 Cloreto de cálcio**

Como no tratamento térmico do leite uma parte do cálcio é insolubilizada, adiciona-se cálcio complementar ao leite sob a forma de cloreto de cálcio. A adição do cloreto de cálcio provoca alguns efeitos desejáveis no leite, tais como redução no tempo de coagulação; aumento da firmeza da coalhada; melhora a capacidade de expulsão do soro da coalhada e provoca aumento no teor final de cálcio do queijo (FURTADO, 1991).

### **3.9.2.3 Coalho**

O coalho é o agente que vai promover a coagulação do leite, formando a massa do queijo. Esse método é denominado “coagulação enzimática”, pois o coagulante é formado por uma enzima, que é uma proteína com propriedades específicas (FURTADO, 1991).

### 3.9.3 Coagulação do Leite

A coagulação é a etapa mais decisiva na fabricação de queijos, a qual visa concentrar a proteína do leite retendo também a gordura. O fenômeno da coagulação do leite se deve basicamente à caseína, a qual perde sua estabilidade em função de vários agentes físicos e/ ou químicos, dos quais a acidificação e a ação de enzimas proteolíticas são as mais importantes do ponto de vista tecnológico (HOHENDORFF; SANTOS, 2006).

O coagulante (coalho) deve ser adicionado em proporções exatas em função de sua atividade e do tempo de coagulação que se deseja. Para se evitar a formação de flocos de coágulo, o produto deve ser diluído antes da aplicação, a qual deve ser lenta e ocorrer sob agitação durante 2 a 3 minutos, período após o qual o leite é deixado em repouso para que o processo de coagulação se complete (BASSO; SEOLIN, 2004).

O coágulo enzimático se forma em 30 a 40 minutos, sendo o final da coagulação determinado em função da consistência do gel ou coágulo formado, o que na prática é denominado ponto de corte da massa (HOHENDORFF; SANTOS, 2006).

### 3.9.4 Agitação

A agitação do leite por 3 minutos após a adição do coalho é suficiente para assegurar que a mistura seja uniforme. A agitação inadequada resulta na dissolução incompleta do coalho, o que permite a gordura subir para superfície. Tal acontecimento aumenta a perda de gordura durante o corte. A agitação prolongada e muito vigorosa determina a desintegração do coágulo que está se formando. Após a fase de agitação o leite deve permanecer em repouso, é nessa fase que acontece a coalescência e a união das mistelas de caseína (SCOTT, 1998).

### 3.9.5 Corte da Coalhada

A etapa de fabricação de queijos denominada de corte tem como objetivo produzir uma grande superfície livre para que se possa ocorrer a sinérese e facilitar a retração do coágulo. O tamanho dos grãos do coágulo após o corte depende da variedade de queijo que se deseja, quanto maior o grão, maior a umidade no produto final (FOX et al., 2000 apud SANGALETTI, 2007).

Para verificar se o coágulo está no ponto de corte, é necessário verificar a sua resistência. Decorrido o tempo de coagulação esperado, são realizados alguns testes empíricos para verificar se o coágulo está no ponto. Inicialmente, através do fácil desprendimento do coágulo das paredes do tanque, quando se exerce uma leve pressão com as mãos ou com uma espátula. Em seguida outro teste realizado, que permite verificar o ponto, é a introdução de uma espátula na superfície do coágulo, no sentido inclinado, e depois a mesma é empurrada para cima para romper o coágulo. Se estiver no ponto de corte, deve ser formada uma fenda única retilínea e sem fragmentação do coágulo. O objetivo dessa etapa é aumentar a área superficial das partículas de massa, o que por sua vez permite a expulsão do soro e um aquecimento mais uniforme de todas as partículas de massa no tanque. Quanto menor o tamanho das partículas, maior é a sinérese e, conseqüentemente, menor a umidade do queijo (HOHENDORFF; SANTOS, 2006).

### 3.9.6 Mexedura

Após o corte, inicia-se imediatamente a eliminação do soro ocorrendo o surgimento de duas fases, uma de maior densidade, que precipita, denominada de massa e outra aquosa, denominada de soro. Para evitar que os grãos de massa precipitem de forma compacta, dificultando a dessoragem, efetua-se a agitação (mexedura) dos grãos. No início, devido à fragilidade dos grãos, a agitação é mais lenta e vai se intensificando à medida que os grãos tornam-se mais firmes. Isso permite que as superfícies das partículas formem novas ligações intramoleculares

e firmem o coágulo enquanto expõem o soro. Em queijos moles e de massa crua, como o Minas frescal, alguns fabricantes utilizam a agitação alternada com períodos de repouso. Quando, porém, se deseja uma dessora mais intensa, como nos queijos semiduros e duros, a agitação é contínua (HOHENDORFF; SANTOS, 2006).

### **3.9.7 Coleta da Massa**

Para esse procedimento, as fôrmas de plástico são ideais, por permitirem fácil manuseio e limpeza, tem formato redondo e furos no fundo (do tipo coador), que permitem a saída do soro. Geralmente, não se usa um dessorador (equipamento para tirar o soro) na produção do Minas frescal, já que tem curto tempo de enformagem e elevada umidade. Também é desnecessário prensar esse tipo de queijo por muito tempo, por causa de sua elevada umidade. O próprio peso da massa dentro da fôrma é suficiente para exercer uma leve prensagem (SILVA, 2005).

### **3.9.8 Salga dos Queijos**

Existem maneiras distintas de salgar os queijos, como: salga no leite, na massa, a seco (na superfície do queijo) e em salmoura. A salga em salmoura é a maneira mais usual. A concentração de salmoura deve ficar entre 18-23% de NaCl e o pH ideal da salmoura deve estar entre 5,2 e 5,3 para temperaturas entre 10-14°C, de modo a facilitar a absorção do sal e manter um grau ótimo de dissolução da caseína (PERRY, 2004).

O sal garante o desenvolvimento do sabor, o controle da umidade e a conservação do produto. Geralmente, na produção de queijo Minas frescal, é realizada a chamada salga seca, que consiste em aplicar sal na superfície do queijo já enformado. Passados 30 minutos, quando for feita a viragem, aplica-se



sal na outra superfície. Existe outra forma de salgar o queijo, que é pela salga da massa. Consiste em aplicar sal após a retirada do soro. Na mistura do sal à massa, deve-se tomar cuidado para não formar um soro leitoso, que vai aparecer se os grãos forem danificados (SILVA, 2005).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Leites e nos Laboratórios de Análises Microbiológicas e Físico-químicas da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira. As formulações foram desenvolvidas com leite e condimentos comprados no comércio local. Os demais ingredientes como coalho, ácido láctico e cloreto de cálcio foram disponibilizados pela UTFPR.

### **4.2 MÉTODOS**

Foram desenvolvidas 5 formulações de queijo Minas frescal com diferentes condimentos. As formulações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e padrão foram submetidas à análise microbiológica e físico-química. As formulações F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> e F<sub>5</sub> foram submetidas apenas à análise microbiológica.

#### **4.2.1 Testes preliminares**

Para a definição das plantas que seriam utilizadas nas formulações, foram realizados testes preliminares para verificar a atividade antimicrobiana com as seguintes plantas condimentares: alecrim, alho, orégano, hortelã, macela, sálvia e chimichurri.

A técnica utilizada nos testes preliminares foi a de difusão em placas utilizando disco de papel onde as placas preparadas com ágar PCA foram contaminadas adicionando-se 0,1mL de uma população inicial de  $10^{-3}$  UFC mL<sup>-1</sup> de

*S. aureus* e *Escherichia coli*, posteriormente, discos de papeis estéreis foram embebidos nas diferentes concentrações das plantas medicinais que estavam sendo testadas (0,5, 2, 5, 10%) e colocados sobre as placas contaminadas que foram incubadas a 35°C durante 24 horas. Após as 24 horas, observou-se a zona de crescimento de micro-organismos em volta dos discos de papel e constatou-se quais plantas condimentares haviam inibido o crescimento dos micro-organismos.

#### 4.2.2 Formulações

Foram desenvolvidas 5 formulações, uma formulação de queijo Minas frescal padrão sem a utilização de plantas, duas formulações com a utilização da infusão das plantas e com adição das plantas condimentares na massa (F1 e F2) e outras três formulações somente com a adição das plantas condimentares na massa (F3, F4, F5). A infusão de cada formulação (F1 e F2) foi realizada adicionando os condimentos específicos a um litro de água fervida, passados 5 minutos a infusão foi coada e adicionada ao leite. As formulações realizadas podem ser visualizadas nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1: Formulações para queijo Minas Frescal Padrão e com adição da infusão e das plantas condimentares na massa.**

Matéria prima	Padrão	F1	F2
Chimichurri	-	3,5%	-
Orégano	-	1%	3,5%
Hortelã	-	-	1,5%
Alho	-	-	1,5%
Sal	1%	1%	1%

Fonte: Autores (2013).

Padrão; F1; F2; foram as formulações desenvolvidas.

**Tabela 2: Formulações para queijo Minas Frescal com a utilização de plantas condimentares adicionadas na massa.**

<b>Matéria prima</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>	<b>F5</b>
Hortelã	2%	-	-
Orégano	-	2%	-
Alho	-	-	2%
Sal	1%	1%	1%

Fontes: Autores (2013)

F3; F4; F5 foram as formulações desenvolvidas.

### 4.2.3 Ingredientes

O leite adquirido para a fabricação dos queijos Minas frescal foi previamente pasteurizado e antes da sua utilização foram realizadas análises microbiológicas e os resultados apresentaram-se dentro do padrão estabelecido pela legislação.

Os ingredientes utilizados nas seis formulações, recomendados por Furtado e Neto (1994), bem como a quantidade de cada um, são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3: Ingredientes utilizados na elaboração do queijo Minas frescal em suas diferentes formulações e concentrações.**

<b>Ingredientes</b>	<b>Quantidade %</b>
Coalho	0,8
Ácido Lático	0,025
Cloreto de Cálcio a 50%	0,04

Fonte: Furtado e Neto (1994)

#### 4.2.4 Processamento

Para o processamento do queijo Minas frescal primeiramente pasteurizou-se o leite no pasteurizador do Laboratório de Leites da UTFPR, após a pasteurização o leite foi colocado na Queijomat juntamente com a infusão já preparada, aqueceu-se até aproximadamente 41°C. Com a temperatura estabilizada, adicionou-se o cloreto de cálcio (40 mL de cloreto de cálcio a 50 % para 100 L de leite), o ácido láctico (25 mL de ácido com 85 % de pureza para 100 L de leite) e por último o coalho (9ml para cada 10 litros de leite). Após 40 minutos verificou-se o ponto da coalhada e foi realizado o corte com liras onde se obteve grãos com 1,5 a 2,0 cm de aresta, durante 3 minutos deixou-se em repouso a massa por 5 minutos. Após, realizou-se a mexedura durante 30 minutos, logo removeu-se o soro e realizou-se a salga na massa, colocou-se a massa em formas e prensou-se por 15 minutos cada lado. Após a prensagem os queijos foram armazenados em câmara fria (12°C) por 12 horas e embalados a vácuo em embalagens de polietileno, segundo a metodologia de Furtado e Neto (1994), porém com algumas modificações, como mostra o fluxograma abaixo, para que fosse produzido queijos Minas frescal com as mesmas características dos produzidos na região.



**Figura 1:** Fluxograma do Processo de Produção do Queijo Minas Frescal.

**Fonte:** Autores (2013), modificado de Furtado e Neto (1994).

### 4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para verificar a qualidade do produto elaborado, as diferentes formulações de queijo Minas frescal foram submetidas às análises microbiológicas estabelecidas pela Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, que são indicadoras de contaminação ambiental, fecal e do manipulador sendo elas: coliformes 45°, *Staphylococcus* coagulase positiva e contagem de *Staphylococcus aureus*. As determinações de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* não foram realizadas, pois o objetivo desse trabalho foi de verificar a inibição dos principais contaminantes. A contagem de aeróbios mesófilos viáveis não está estabelecida na RDC 12 de 2001 da ANVISA, mas foi realizada para verificar a população bacteriana desse grupo de micro-organismos nas cinco formulações de queijo Minas Frescal para avaliação das condições higiênicas de produção e da vida de prateleira.

A metodologia empregada para as análises microbiológicas segue a proposta de SILVA et. al. (2007) e a Instrução Normativa nº. 62 de 26 de agosto de 2003 do MAPA.

As embalagens dos queijos foram desinfetadas através da limpeza com álcool iodado. Retirou-se 25g de cada amostra que foram homogeneizadas com 225mL de água peptonada a 0,1% (diluição  $10^{-1}$ ). A partir dessa diluição foram realizadas as sucessivas diluições até  $10^{-4}$ .

Para determinar as bactérias mesófilas realizou-se uma semeadura em superfície em ágar PCA (Plate Count Agar) até a diluição  $10^{-4}$  que foram incubadas em estufa a 35°C por 48 horas.

Para *Staphylococcus* coagulase positiva realizou-se o plaqueamento em superfície até a diluição  $10^{-3}$ , em meio BP (Baird Parker) com incubação a 35°C por 48 horas.

Na análise de Coliformes Totais utilizou-se a Técnica do Número Mais Provável (NMP). As amostras foram enriquecidas em meio LST (Lauril Sulfato Triptose) em concentração simples que foram incubados a 35°C durante 24 - 48 horas. Para a confirmação dos coliformes totais realizou-se a repicagem dos tubos positivos para Caldo VB (Verde Brillante) e para confirmação dos coliformes

termotolerantes realizou-se a repicagem em caldo EC (*Escherichia coli*), os mesmos foram incubados a 35°C e 45°C por 24 - 48 horas. Após a verificação de resultado positivos nos tubos de EC, realizou-se a confirmação em meio EMB que foram incubados a 35°C por 24 horas. Os tubos registrados como positivos foram comparados na tabela do Número mais provável.

#### 4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras das formulações F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> e padrão foram analisadas em duplicata quanto à acidez em ácido láctico, gordura e umidade.

Para a análise de acidez em ácido láctico, pesou-se 5g de cada formulação em um becker de 100mL, adicionou-se 10mL de água destilada na temperatura de 30 a 40°C, com um bastão de vidro misturou-se a amostra até que uma pasta fosse formada, adicionou-se mais 50mL de água destilada e filtrou-se a amostra para retirar as partes sólidas, após foram adicionadas 4 gotas do indicador fenolftaleína 1% e titulou-se com NaOH 0,1N até que obteve-se uma coloração levemente rosada na amostra, seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

As análises de gordura foram realizadas segundo o método de SOXHLET, no Laboratório de Análises Microbiológicas e físico-químicas de Alimentos e Água (LAMAG) – UTFPR.

Para a análise de umidade as amostras foram pesadas em cadinhos de porcelana, previamente secados em estufa 105°C durante 30 minutos, após a pesagem as amostras permaneceram na mesma estufa durante 3 horas, resfriou-se os cadinhos em dessecador até a temperatura ambiente e pesou-se a amostra até a mesma apresentar peso constante, seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para realizar a análise de proteína pesou-se cerca de 5 gramas de cada amostra, colocou-se a amostra em um tubo de Kjeldahl e fez-se a adição de uma mistura catalítica que permaneceu no digestor durante 3 horas, com as amostras já digeridas adicionou-se 25mL de ácido bórico e 4 gotas do indicador misto com vermelho de metila e azul de metileno, ligou-se o destilador de nitrogênio e



esperou-se aproximadamente 10 minutos para a caldeira esquentar, adicionou-se 20mL de NaOH no copo dosador, este, aqueceu-se, notando-se uma ligeira coloração rosa lilás, liberando amônia para dentro do erlenmeyer que continha a solução receptora de ácido bórico, formando borato de amônia. A destilação e condensação durou cerca de 5 minutos. Após esse intervalo de tempo, o erlenmeyer com o borato de amônia chegou a um volume de 50mL, então zerou-se a bureta com HCl e realizou-se a titulação até que obteve-se uma coloração rósea alaranjada, onde constatou-se o ponto de viragem.

#### **4.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados obtidos nas análises microbiológicas e físico-químicas foram submetidos à análise da variância e testes de hipóteses através do teste de *Tukey* a 5% de probabilidade utilizando o programa *Statistic 7.0*.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

#### 5.1.1 Micro-organismos Aeróbios Mesófilos

A contagem de aeróbios mesófilos não é exigida pela Legislação, porém foi realizada neste estudo para verificar a população bacteriana desse grupo de micro-organismos.

A legislação brasileira federal não estabelece limite para esse grupo de micro-organismo indicador em alimentos. No entanto, a legislação sanitária do Estado de São Paulo considera o valor de  $1 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  como limite para a contagem de aeróbios mesófilos em produtos alimentícios manipulados (SÃO PAULO, 1992).

**Tabela 4: Resultados da contagem de Aeróbios Mesófilos para as diferentes formulações de queijo Minas frescal (UFC  $g^{-1}$ ).**

Formulações	0 Dia	15 Dias	30 Dias
Padrão	$2,7 \times 10^6$ <sub>b</sub>	$2,2 \times 10^7$ <sub>a</sub>	$2,4 \times 10^7$ <sub>a</sub>
F1	$1,6 \times 10^4$ <sub>d</sub>	$2,9 \times 10^5$ <sub>c</sub>	$3,8 \times 10^6$ <sub>b</sub>
F2	$2,8 \times 10^4$ <sub>d</sub>	$2,8 \times 10^5$ <sub>c</sub>	$2,0 \times 10^6$ <sub>b</sub>
F3	$7,8 \times 10^3$ <sub>d</sub>	$7,8 \times 10^5$ <sub>b,c</sub>	$2,0 \times 10^6$ <sub>b</sub>
F4	$1,7 \times 10^4$ <sub>d</sub>	$1,7 \times 10^6$ <sub>b</sub>	$1,5 \times 10^7$ <sub>a</sub>
F5	$5,5 \times 10^2$ <sub>f</sub>	$5,5 \times 10^3$ <sub>e</sub>	$7,5 \times 10^4$ <sub>d</sub>

Médias com letras iguais na mesma linha e mesma coluna não são estatisticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Fonte: Autores (2013).**

Observa-se na Tabela 4, que praticamente todas as amostras se aproximaram da contagem da amostra padrão em trinta dias de estocagem,

somente a F5 (2% de alho em pó) diminuiu a contagem de Aeróbios Mesófilos em até 3 ciclos logarítmicos.

Elevadas quantidades de mesófilos em alimentos, podem indicar que os mesmos foram preparados com matéria-prima altamente contaminada, que o processo foi insatisfatório do ponto de vista sanitário ou que os alimentos foram estocados em condições inadequadas de tempo e temperatura (LEITE Jr. et al., 2000).

### 5.1.2 *Staphylococcus coagulase positiva*

Os resultados das análises da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* para as diferentes formulações de queijo Minas frescal são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5: Resultados da contagem de *Staphylococcus coagulase positiva* para as diferentes formulações de queijo Minas frescal (UFC g<sup>-1</sup>).**

Formulações	0 Dia	15 Dias	30 Dias
Padrão	1,5x10 <sup>4</sup> c,d	2,9x10 <sup>6</sup> a	2,4x10 <sup>6</sup> a
F1	3,5x10 <sup>2</sup> e	2,9x10 <sup>4</sup> c	7,0x10 <sup>4</sup> b,c
F2	4,0x10 <sup>2</sup> e	3,0x10 <sup>3</sup> d	1,3x10 <sup>5</sup> b
F3	5,0x10 <sup>2</sup> e	6,0x10 <sup>3</sup> c,d	7,1x10 <sup>5</sup> a,b
F4	3,6x10 <sup>2</sup> e	4,6x10 <sup>3</sup> d	5,8x10 <sup>5</sup> a,b
F5	3,6x10 <sup>2</sup> e	3,7x10 <sup>3</sup> d	2,5x10 <sup>4</sup> c

Médias com letras iguais na mesma linha e mesma coluna não são estatisticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Fonte: Autores (2013).**

Pode-se observar na tabela acima, no tempo de 30 dias, que todas as amostras de queijo Minas frescal apresentaram resultados acima do estabelecido pela legislação que é de 5x10<sup>2</sup> UFC g<sup>-1</sup> para *Staphylococcus coagulase positiva*. Porém com a adição das plantas condimentares houve uma diminuição na

contagem destes micro-organismos e o que apresentou menor contagem foi a Formulação F5 que continha 2% de alho em pó e em seguida a formulação F1 com 3,5% de chimichurri e 1% de orégano.

Komatsu et al. (2010) observaram que 88% das amostras analisadas de queijo Minas frescal produzido em Uberlândia-MG estavam contaminadas com níveis inaceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positiva, para comercialização, de acordo com a legislação do Ministério da Saúde.

### 5.1.3 Coliformes 35°C (Totais)

A contagem de coliformes totais não é exigida pela legislação sanitária vigente, porém segundo SILVA (2007), é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene e sanitização inadequadas para o processamento de alimentos.

**Tabela 6: Resultados da contagem de Coliformes 35°C (Totais) para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (NMP g<sup>-1</sup>).**

Formulações	0 Dia	15 Dias	30 Dias
Padrão	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>
F1	120 <sub>e,f</sub>	150 <sub>e</sub>	460 <sub>c</sub>
F2	150 <sub>e</sub>	210 <sub>d</sub>	1100 <sub>b</sub>
F3	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>
F4	210 <sub>d</sub>	460 <sub>c</sub>	1100 <sub>b</sub>
F5	93 <sub>f</sub>	150 <sub>e</sub>	210 <sub>d</sub>

Médias com letras iguais na mesma linha e mesma coluna não são estatisticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Fonte: Autores (2013).**

Através da interpretação dos resultados do Número Mais Provável obtidos para coliformes 35°C (totais) do queijo Minas frescal padrão e das 5 formulações com adição de diferentes plantas condimentares, observa-se na Tabela 6, que

tomando como base o parâmetro estabelecido para coliformes termotolerantes ( $5 \times 10^2$  NMP.g<sup>-1</sup>) a amostra padrão e a formulação 3 obtiveram contagens acima do permitido por legislação e as formulações F1, F2, F4 e F5 diminuíram as contagens de coliformes 35°C, mostrando que as formulações F1 (3,5% de chimichurri e 1% de orégano), F2 (3,5% de orégano, 1,5% de hortelã e 1,5% de alho), F4 (2% de orégano) e F5 (2% de alho em pó) inibiram a contagem de Coliformes Totais nos queijos Minas frescal.

#### 5.1.4 Coliformes 45°C (Termotolerantes)

Assim como para os coliformes totais, as amostras que apresentaram maior diminuição na contagem foram as formulações F1, F2, F4 e F5, como mostra a Tabela 7 apresentada abaixo.

É importante ressaltar que os coliformes fecais pertencem a um grupo de micro-organismos que tem habitat no trato intestinal do homem e outros animais, portanto sua presença neste alimento garante contato direto do produto com fezes, evidenciando assim o risco para a saúde dos consumidores, devido a alta patogenicidade do micro-organismo (SALOTTI et al. 2006).

**Tabela 7: Resultados da contagem de Coliformes 45°C (Termotolerantes) para as diferentes formulações de queijo Minas Frescal (NMP g<sup>-1</sup>).**

Formulações	0 Dia	15 Dias	30 Dias
Padrão	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>	≥2400 <sub>a</sub>
F1	64 <sub>g</sub>	93 <sub>f</sub>	240 <sub>d</sub>
F2	120 <sub>e</sub>	210 <sub>d</sub>	460 <sub>c</sub>
F3	460 <sub>c</sub>	1100 <sub>b</sub>	1100 <sub>b</sub>
F4	150 <sub>d,e</sub>	240 <sub>d</sub>	1100 <sub>b</sub>
F5	39 <sub>h</sub>	64 <sub>g</sub>	93 <sub>f</sub>

Médias com letras iguais na mesma linha e mesma coluna não são estatisticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

Fonte: Autores (2013).

## 5.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Na Tabela 8, podem-se observar os valores médios encontrados nas análises físico-químicas do queijo Minas frescal padrão, F1 (3,5% de chimichurri e 1% de orégano) e F2 (3,5% de orégano, 1,5% de hortelã e 1,5% de alho).

**Tabela 8: Parâmetros Físico-químicos do queijo Minas padrão, F1 e F2.**

	Acidez (g/100g ácido láctico)	Proteína (%)	Umidade (%)	Lipídios (%)
Padrão	0,831 <sub>a</sub>	19,33 <sub>b</sub>	50,55 <sub>a,b</sub>	24,3 <sub>a</sub>
F1	0,733 <sub>b</sub>	20,25 <sub>a</sub>	51,04 <sub>a</sub>	22,5 <sub>a,b</sub>
F2	0,682 <sub>b</sub>	20,47 <sub>a</sub>	50,08 <sub>b</sub>	20,5 <sub>b</sub>

Médias com letras iguais na mesma coluna não são estatisticamente diferentes ( $p > 0.05$ ).

**Fonte: Autores (2013).**

O aumento da acidez do queijo está diretamente relacionada com o aumento da população de micro-organismos mesófilos, psicrotóxicos e principalmente as bactérias lácticas, as quais são os principais agentes da transformação da lactose em ácido láctico (SANGALETTI, 2009). Observando os valores da Tabela 8, a acidez das formulações F1 e F2 foram menores que a do queijo padrão, por possuírem uma carga microbiológica menor deixando-o menos ácido.

De acordo com a Portaria nº146 de 07 de março de 1996, os queijos Minas Frescal Padrão, a formulação F1 e a formulação F2 analisadas foram classificadas como sendo de alta umidade (valores entre 46,0 e 54,9 g/100g), o principal efeito da alta umidade em queijos inclui o favorecimento da multiplicação microbiana decorrente da elevada atividade de água no produto como pode ser observado neste estudo.

Quanto ao teor de lipídios, os queijos obtiveram resultados entre 20,5 e 24,3% de gordura, e foram classificados como queijos semi-gordos. Valores

semelhante a este foram encontrados por Rosa (2004) (21%) e Furtado e Lourenço Neto (1994) (23 a 25% de gordura). Segundo Furtado (2005) o teor de lipídios no queijo Minas frescal varia segundo vários fatores, dentre eles a raça do animal e a porcentagem de gordura do leite.

Os teores de proteínas encontrados foram em torno de 20%, resultados semelhantes aos encontrados por Silva e Ferreira (2010) que realizaram um estudo onde amostras de queijo Minas frescal variaram de 16 à 22% de proteína.

## 6 CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se a atividade antimicrobiana de plantas condimentares aplicadas a fabricação de queijo Minas frescal. Foram realizadas análises físico químicas de umidade, acidez, proteínas e gordura e análises microbiológicas de contagem de aeróbios mesófilos, *Staphylococcus* coagulase positiva, coliformes 35°C e 45°C.

Na análise de acidez do queijo Minas padrão, verificou-se um aumento nesse teor que está relacionado com o crescimento de micro-organismos contaminantes e bactérias lácticas, porém os queijos adicionados de infusão dos condimentos apresentaram menores teores de acidez. As análises de gordura e umidade estavam dentro das estabelecidas pela legislação, classificando o queijo produzido como gordo e de alta umidade.

Quanto às análises microbiológicas, as contagens de aeróbios mesófilos se mostraram dentro dos padrões de qualidade para as formulações de queijos adicionados de plantas condimentares, a amostra F5 teve a contagem diminuída de 2 a 3 ciclos log que as outras formulações. Na contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, o queijo Minas padrão sem adição de condimentos apresentou contagem acima do estabelecido pela legislação nos tempos 0, 15 e 30 dias de estocagem, porém, as formulações adicionadas de condimentos tiveram contagens menores, a amostra F5 que é adicionada de alho, foi a que teve menor contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva. Para coliformes 35°C e 45°C, com exceção das formulações de queijo Padrão e F3, todas as outras diminuíram as contagens desses micro-organismos, podendo assim aumentar a vida útil do produto melhorando sua qualidade.

De todas as amostras analisadas, as que apresentaram melhores resultados foram F1 com infusão de orégano e chimichurri e a F5 adicionada de alho em pó. Com base nos resultados apresentados, o presente trabalho mostrou que as plantas condimentares utilizadas na produção do queijo Minas frescal obtiveram resultado satisfatório, pois diminuiu a contagem microbiana, aumentando assim a qualidade do produto final.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.** Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

ALVES, C. C. da C., 2010. **Comportamento da *Escherichia coli* em Queijo Minas Frescal Elaborado com Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de Acidificação Direta com Ácido Lático.** Disponível em: <[http://www.uff.br/higiene\\_veterinaria/teses/Clara\\_Calil.pdf](http://www.uff.br/higiene_veterinaria/teses/Clara_Calil.pdf)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

ARAÚJO, C. A.; CARVALHO, H. H. C.; SOUTO, S. A.; SOBREIRO, A. A.; WIEST, J. M. **Atividade Antimicrobiana in vitro de Extratos de Alho Nirá (*Allium tuberosum* Rottler ex Spreng).** 2009 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722009000300006](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000300006)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

BASSO, A; SEOLIN, R. **Produção de Queijo: Biotecnologia.** 2004 Disponível em:<[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad2004/queijos/biotecnologia.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/queijos/biotecnologia.htm)>. Acesso em: 28 jul. 2013.

BRASIL, Portaria n. 146, de 07 de março de 1996. **Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.** Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial de Brasília, Brasília. Disponível em <<http://www.agais.com/normas/leite/queijos.htm>> Acesso em: 14 ago. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado.** Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Disponível em <[http://www.qualidadedoleite.com.br/hd/arquivos/IN51de2002\\_leitecnormas.pdf](http://www.qualidadedoleite.com.br/hd/arquivos/IN51de2002_leitecnormas.pdf)> Acesso em 22 ago. 2013.

BRITO, M. A.; BRITO, J. R.; ARCURI, E.; LANGE, C.; SILVA, M.; SOUZA, G. Agência de Informação Embrapa. **Agronegócio do Leite.** Brasília, 2005. Disponível em: <

[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_128\\_21720039243.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_128_21720039243.html) >. Acesso em: 21 mai. 2013.

BUSNELLO, S. R. **Aspectos da Qualidade do Leite e Produção de Queijo Minas Frescal**. 2008. CENTRO DAS FACULDADES METROPOLITANAS UNIDAS – FMU. Disponível em: <<http://arquivo.fmu.br/prodisc/medvet/srb.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2013.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. **Avaliação microbiológica de queijo tipo Minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul**. Higiene Alimentar, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

EMBRAPA. **Comunicado Técnico: Tecnologia de Fabricação do Queijo Minas Frescal**, Belém, PA, 2004. Disponível em: <[http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes\\_online/comunicado-tecnico/2004/tecnologia-de-fabricacao-do-queijo-minas-frescal-com-tec-125](http://www.cpatu.embrapa.br/publicacoes_online/comunicado-tecnico/2004/tecnologia-de-fabricacao-do-queijo-minas-frescal-com-tec-125)>. Acesso em: 15 mai. 2013.

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

FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. 2.ed. São Paulo : Globo, 1991. 297p.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. 1. ed. São Paulo: Ed. Dipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 2005. 200p.

FURTADO, M. M. **Quesos típicos de latinoamérica**. São Paulo: fonte Comunicações e editora, 2005. 79p

HOHENDORFF, C. G.; SANTOS, D. **Produção de Queijos**. Florianópolis, 2006. Disponível em: <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad/trabalhos\\_grd\\_2006-1/queijos.doc](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad/trabalhos_grd_2006-1/queijos.doc)>. Acesso em: 29 jul. 2013.

Instituto ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª Edição, 1ª Edição Digital. São Paulo, 2008.

KOMATSU, R. S.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. **Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijo Minas frescal produzido em Uberlândia – MG**. 2010. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7159>>. Acesso em: 14 ago. 2013.

KROLOW, A. C. R.; RIBEIRO, M. E. R. **Obtenção de Leite com Qualidade e Elaboração de Derivados** - Pelotas: Embrapa, Clima Temperado, 2006. Disponível em: <[http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento\\_154.pdf](http://www.cpact.embrapa.br/publicacoes/download/documentos/documento_154.pdf)>. Acesso em: 28 jul. 2013.

LACTEA BRASIL. **Queijo: Alimento Nobre e Saudável**. 2006. Disponível em: <[http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/lactea\\_brasil\\_queijos.pdf](http://www.caprilvirtual.com.br/Artigos/lactea_brasil_queijos.pdf)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

LAZARTE, L. **Receita do “Chimichurri”**. Disponível em: <[www.mat.unb.br/~llazarte/chimichurri.html](http://www.mat.unb.br/~llazarte/chimichurri.html)>. Acesso em: 03 ago. 2013.

LEITE Jr, A. F. S; FLORENTINO E. R.; OLIVEIRA, N. E. B.; AS, S. N. E.; TORRANO, A. D. M. **Qualidade Microbiológica de queijo tipo coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração**, Campinas Grande – Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=264105&indexSearch=ID>>. Acesso em: 11 ago. 2013.

LIMA, E. O., 2001. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna. Disponível em: <[http://www.bdtf.ufu.br/tde\\_arquivos/14/TDE-2008-08-26T091917Z-1134/Publico/Daniela%20B.pdf](http://www.bdtf.ufu.br/tde_arquivos/14/TDE-2008-08-26T091917Z-1134/Publico/Daniela%20B.pdf)>. Acesso em: 20 mai. 2013.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. **Microbiologia de Queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente**. Revista Ciência Rural, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782001000600024](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000600024)>. Acesso em: 12 ago. 2013.

MAIA, S. R.; FERREIRA, A. C.; ABREU, L. R. de. **Uso de Açafrão (*Curcuma longa* L.) na redução da *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048) em ricota.** 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-70542004000200016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542004000200016)>. Acesso em: 20 jul. 2013.

MAPA, **Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003.** Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

MARTINS, E. da S., REIS, N. E. V. **Determinação de Coliformes e *Staphylococcus* Coagulase Positiva em Queijos Minas Frescal.** 2012. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/pg/index.php/rbta/article/download/1049/880>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

MARCHIORI, V. F. **Propriedades funcionais do alho. 2003** Disponível em: <[http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho\\_revisado.pdf](http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho_revisado.pdf)> Acesso em 14 ago 2013.

MERCOSUL/GMC/RES.Nº145/96. **Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal.** Disponível em: <[http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas\\_web/Resoluciones/PT/96145.pdf](http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/96145.pdf)>. Acesso em: 20 mai. 2013.

NETO, A. C., SILVA, C. G. M., STAMFORD, T. L. M. ***Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil.** 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612002000300012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010120612002000300012&script=sci_arttext)>. Acesso em: 20 jun. 2013.

NEUWIRTH, A.; CHAVES, A. L. R.; BETTEGA, J. M. R. **Propriedades dos Óleos Essenciais de Cipestre, Lavanda e Hortelã-pimenta.** 2008. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Amanda%20Neuwirth%20e%20Ana%20Chaves.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

OKURA, M. H. **Avaliação Microbiológica de Queijos tipo Minas Frescal Comercializados na Região do Triângulo Mineiro.** 2010. Disponível em: <<http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/micro/d/1385.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

OLIVEIRA, C. E. C.; LUCCA, P. S. R.; SILVA, L. L.; MARCA, P.; DUARTE, F. A. **Demostración del Efecto Antimicrobiano de los Extractos de Ajo, Gengibre y Orégano en Cultivos de *Helicobacter pylori***. 2011. Disponível em: <<http://www.fitoterapia-uruguay.net/2011/10/antimicrobianos-ajo-gengibre-oregano.html>>. Acesso em: 29 jul. 2013.

OURIVES, E. A. A. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Condimentos Vegetais (Ervas Aromáticas) em Meio de Cultura e Peite de Frango Picado Frente a *P. fluorescens***. 1997. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/77044/264737.pdf?sequence=1>>. Acesso em 02 ago. 2013.

PERRY, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química Nova, v. 27, n. 2, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000200020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000200020)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): **Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial**. 2001. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/view/1233/1033>>. Acesso em: 19 mai. 2013.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo de Minas Frescal. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zootec.** v. 58, n.2. Belo Horizonte, p.236-272, apr. 2006.

ROSA, V. P. **Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal**. 2004. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-08092004-155552/pt-br.php>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. **Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. 2006. Disponível em: < [http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73\\_2/salotti.PDF](http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arq/V73_2/salotti.PDF)>**. Acesso em: 13 ago. 2013.

SANGALETTI, N. **Estudo da vida útil do queijo Minas Frescal disponível no mercado**. 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11141/tde-19102007-100720/pt-br.php>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

SANTOS, J. C. **Avaliação do Efeito Antimicrobiano de Óleos Essenciais sobre micro-organismos patogênicos em Vôngole (*Anomalocardia brasiliensis*)**. 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/8801/1/Juliana%20Cantalino%20dos%20Santos.pdf>>. Acesso em: 02 ago. 2013.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde. **Código Sanitário. Decreto n. 12.342, de 27 de setembro de 1978**. Regulamento da Promoção, Preservação e Recuperação da Saúde no Campo da Competência da Secretaria de Estado da Saúde. 5. ed. (Revisto e atualizado até dezembro de 1990). São Paulo: IMESP, 1992.

SCOTT, R.; ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Fabricación de Queso**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1998.

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal** – Brasília, DF: Embrapa, Informação Tecnológica, 2005. 50 p. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/116395/1/00076200.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de métodos de análise microbiológicas em alimentos**. 3 edição. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA, K. S. **Avaliação de rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo Minas frescal, queijo Minas frescal “light” e ricota**. 2010. Disponível em: <<http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/alimentos/article/viewFile/1023/a14v21n3>>. Acesso em: 13 ago. 2013.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMKA, E. O. **Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil**. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822006000400023&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000400023&lang=pt)>. Acesso em: 13 ago. 2013.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; FILHO, J. M. B., 2005. **Orégano (*Origanum vulgare* L. Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos**. Revista de Higiene Alimentar, 19 (132), 40-45. Disponível em: <

<http://penelope.dr.ufu.br/bitstream/123456789/1955/1/AvaliacaoAtividadesAntimicrobiana.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

SPREER, E. **Lactología Industrial: Leche, preparación y elaboración, máquinas, instalaciones y aparatos, productos lácteos**. 6º Edición. España: Editora Acribia, 1991, p. 617.

TRAJANO, V. N.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAVASSOS, A. E. R. **Propriedade Antibacteriana de Óleos Essenciais de Especiais sobre Bactérias Contaminantes em Alimentos**. 2009. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612009000300014](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612009000300014)>. Acesso em: 30 jul. 2013.

VIA INTEGRAL. **Orégano**. 2007. Disponível em: <<http://www.viaintegral.com/via2007/paginas/oregano.htm>>. Acesso em: 19 jul. 2013.

WILLIAMS, J. E., 2001. **Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Cadro**. Altern. Med. Rev., 6 (6), 567-579. Disponível em: <[http://www.bdtu.ufu.br/tde\\_arquivos/14/TDE-2008-08-26T091917Z-1134/Publico/Daniela%20B.pdf](http://www.bdtu.ufu.br/tde_arquivos/14/TDE-2008-08-26T091917Z-1134/Publico/Daniela%20B.pdf)>. Acesso em: 20 mai. 2013.