



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**



**Efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a  
microbiota de maturação e características sensoriais do  
queijo Prato**

**Priscila Cristina Bizam Vianna**  
Engenheira de Alimentos

**Profa. Dra. Mirna L. Gigante**  
Orientadora

**Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos**  
Co-Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos

Campinas/SP

2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

V655e Vianna, Priscila Cristina Bizam  
Efeito da contagem de células somáticas do leite sobre a microbiota de maturação e características sensoriais do queijo prato / Priscila Cristina Bizam Vianna. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante  
Co-orientador: Marcos Veiga dos Santos  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Queijo prato. 2. Células somáticas. 3. Qualidade. 4. Microbiologia. 5. Bactérias produtoras de ácido láctico. 6. Maturação. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Santos, Marcos Veiga dos. III. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Effect of milk somatic cell count on development of microorganisms and sensorial characteristics of prato cheese.

Palavras-chave em inglês (Keywords): Prato cheese, Somatic cells, Quality, Microbiology, Lactic acid bacteria

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante

Leila Maria Spadoti

Ana Lúcia Barreto Penna

Helena Maria André Bolini

## BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante  
(Orientadora)

---

Dra. Leila Maria Spadoti  
(Membro)

---

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna  
(Membro)

---

Profa. Dra. Helena Maria André Bolini  
(Membro)

**Dedico mais esta conquista**

Aos meus pais, José Carlos e Doraci,  
meus primeiros educadores e ao meu  
irmão Murilo. Obrigada pelo amor  
incondicional , pelo apoio, paciência  
e pelo exemplo de vida!

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela vida e por mais esta conquista;

À minha família pelo amor e incentivo no decorrer desta caminhada;

À Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante, pela amizade, por sua orientação e ensinamentos transmitidos no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Marcos Veiga dos Santos, pela co-orientação no trabalho e pelo fornecimento do leite utilizado nos processamentos;

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões na redação desta dissertação;

À CAPES pela bolsa de estudos concedida;

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

À Bete, técnica do Laboratório de Leite, e à Ana Lourdes, técnica do Laboratório de Microbiologia, pela amizade, atenção e ajuda nos momentos de dúvida;

À Dirce, técnica do Laboratório de Higiene, pela realização de parte das análises microbiológicas deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, por disponibilizar a utilização do equipamento Aqualab do Laboratório de Controle de Qualidade – DEPAN/FEA;

A todos os técnicos e funcionários do DTA que me ajudaram quando precisei;

Aos amigos do Laboratório de Leite: Janine, Guillaume, Gustavo, Renata, Raquel, Priscila Mamede, Priscila Hoffman, Luciana, Clarissa, Mariana's, Ana Patrícia, pela força e agradável convivência;

Às amigas Juliana, Denise, Kelly, Andréa, Larissa e Christiane pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas;

A todos os colegas da Pós-Graduação;

A todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	vi
LISTA DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE TABELAS .....	x
RESUMO .....	xi
SUMMARY .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
3.1. Características do queijo Prato .....	4
3.2. Efeitos das células somáticas sobre o leite e queijo .....	5
3.3. Microbiologia e bioquímica da maturação de queijos .....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	24
4.1. Leite .....	24
4.2. Coadjuvantes tecnológicos .....	25
4.3. Métodos .....	25
4.3.1. Fabricação do queijo Prato .....	25
4.4. Procedimento de amostragem e análises realizadas .....	28
4.5. Metodologias para as determinações analíticas .....	30
4.5.1. Análises físico-químicas .....	30
4.5.2. Análises microbiológicas .....	31
4.6. Delineamento experimental e análise dos dados .....	32
4.7. Análise sensorial .....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	36
5.1. CCS e composição do leite .....	36
5.2. Composição dos queijos .....	39
5.3. Efeito da CCS e do tempo de armazenamento sobre as características dos queijos .....	40

5.3.1. Características físico-químicas .....	40
5.3.2. Características microbiológicas .....	42
5.4. Análise sensorial .....	52
5.4.1. Caracterização dos queijos .....	52
5.4.2. Avaliação sensorial dos queijos .....	53
6. CONCLUSÕES .....	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60
ANEXO I .....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 4.1:</b>	Esquema geral de desenvolvimento do trabalho.....	26
<b>Figura 4.2:</b>	Fluxograma do processo de fabricação do queijo Prato.....	27
<b>Figura 4.3:</b>	Ficha utilizada para a avaliação sensorial dos queijos .....	35
<b>Figura 5.1:</b>	Média da umidade dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento .....	41
<b>Figura 5.2:</b>	Comportamento do pH dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento ( $y = 0,0038x + 2,2523$ ) ....	41
<b>Figura 5.3:</b>	Comportamento da $A_w$ dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento ( $y = -0,0002x + 0,9646$ ) ...	42
<b>Figura 5.4:</b>	Comportamento da contagem total de bactérias em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento ( $y = -0,0186x + 8,2447$ ) .....	42
<b>Figura 5.5:</b>	Média das contagens de bactérias lácticas e psicotróficos em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento .....	43
<b>Figura 5.6:</b>	(A) Comportamento da contagem de bactérias lácticas ( $y = -0,0166x + 9,3322$ ) e (B) de psicotróficos ( $y = -0,011x + 9,1922$ ), durante o período de armazenamento .....	45
<b>Figura 5.7:</b>	(A) Contagem de bactérias lácticas e (B) Contagem de psicotróficos, em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento .....	46
<b>Figura 5.8:</b>	Comportamento da contagem de bolores e leveduras, ao longo do período de armazenamento ( $y = 0,0213x + 2,8274$ )...	48
<b>Figura 5.9:</b>	Contagem de bolores e leveduras, em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento .....	49
<b>Figura 5.10:</b>	Média de aceitação dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente .....	54

<b>Figura 5.11:</b> Evolução média da aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta durante 61 dias de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente .....	55
<b>Figura 5.12:</b> Aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente .....	56
<b>Figura 5.13:</b> Avaliação sensorial da firmeza durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais firme que o ideal; (0) Firmeza ideal; (-4) Extremamente menos firme que o ideal .....	57
<b>Figura 5.14:</b> Avaliação sensorial do sabor durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais intenso que o ideal; (0) Sabor ideal; (-4) Extremamente menos intenso que o ideal .....	57
<b>Figura 5.15:</b> Avaliação sensorial do gosto residual (amargo) durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais amargo que o ideal; (0) Gosto amargo residual ideal; (-4) Extremamente menos amargo que o ideal..	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1:</b>	Contagem de células somáticas do leite utilizado nos processamentos .....	36
<b>Tabela 5.2:</b>	Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru de CCS baixa e alta (n=4) .....	37
<b>Tabela 5.3:</b>	Características físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado de CCS baixa e alta (n=4) .....	38
<b>Tabela 5.4:</b>	Características físico-químicas dos queijos fabricados a partir de leite de CCS baixa e alta, após 2 dias de fabricação (n=4) .....	39
<b>Tabela 5.5:</b>	Análise de Variância para pH, Aw e umidade dos queijos durante o período de armazenamento (n=4) .....	40
<b>Tabela 5.6:</b>	Análise de Variância para contagem total, bactérias lácticas, bolores e leveduras e psicrotóxicos dos queijos durante o período de armazenamento (n=4) .....	44
<b>Tabela 5.7:</b>	Contagens de <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> sp., <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e cliformes totais e fecais dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento .....	51
<b>Tabela 5.8:</b>	Características físico-químicas, após 2 dias de fabricação, dos queijos de CCS baixa e alta (n=1) .....	52
<b>Tabela 5.9:</b>	Características microbiológicas, após 7 dias de fabricação, dos queijos de CCS baixa e alta (n=1) .....	53
<b>Tabela 5.10:</b>	Análise de variância para aceitação geral .....	53

## RESUMO

A mastite é uma reação inflamatória da glândula mamária, causada por bactérias patogênicas, que resulta no aumento da contagem de células somáticas (CCS) no leite. O leite com CCS alta apresenta alterações na composição, influenciando, portanto, na qualidade dos produtos lácteos processados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da CCS do leite sobre o desenvolvimento da microbiota e características sensoriais do queijo Prato, durante a maturação. Para tanto, dois grupos de animais foram selecionados para a obtenção de leite com CCS baixa (< 200.000 cél/ml) e alta (> 700.000 cél/ml) e após a fabricação, os queijos foram avaliados quanto à composição centesimal. Após 6, 12, 19, 35 e 54 dias de armazenamento, foram avaliados quanto às contagens de bactérias lácticas, psicrotróficos, contagem total de bactérias e bolores e leveduras. O delineamento experimental utilizado foi do tipo fatorial 2 x 5 em blocos completamente aleatorizados. O efeito da CCS (2 níveis de variação) e do tempo de armazenamento (5 níveis de variação) sobre as variáveis estudadas foi avaliado por ANOVA aplicando-se teste de Tukey para comparação entre as médias ao nível de 5% de significância. A avaliação sensorial dos queijos foi feita através dos atributos firmeza, sabor e gosto residual amargo, utilizando-se a escala do ideal de nove pontos, e aceitação geral, através de escala hedônica de nove pontos, após 7, 21, 34, 48 e 61 dias de armazenamento. O leite de CCS alta apresentou pH significativamente maior que o leite de CCS baixa. Os queijos obtidos com leite de CCS alta apresentaram maior umidade que os de CCS baixa. A CCS afetou as contagens de bactérias lácticas e psicrotróficos, que foram maiores para os queijos com CCS baixa. A contagem total de bactérias, a contagem de bactérias lácticas e de psicrotróficos diminuíram durante o armazenamento, enquanto a contagem de bolores e leveduras aumentou independentemente da CCS. A avaliação sensorial indicou que os queijos de CCS alta apresentaram menor aceitação geral quando comparados aos queijos de CCS baixa.

## SUMMARY

Mastitis is an inflammatory reaction of the mammary gland, caused by pathogenic bacteria, resulting in increased number of somatic cells of milk. Milks with high somatic cells count (SCC) present alterations in the composition, influencing, therefore, the quality of processed dairy products. The objective of this work was to evaluate the effect of milk SCC on the development of microorganisms and sensorial characteristics, during ripening of Prato cheese. Two groups of animals were selected to obtain milk with low ( $< 200.000$  cell/ml) and high ( $> 700.000$  cell/ml) SCC. Centesimal composition of cheeses was evaluated after processing and after 6, 12, 19, 35 e 54 days of storage for lactic bacteria, psychrotrophs, total bacteria count, yeasts and moulds counts. A factorial arrangement of treatments  $2 \times 5$  in a completely randomized blocks was used. The effect of SCC (2 levels of variation) and storage time (5 levels of variation) on studied variables was evaluated by ANOVA and Tukey's test at 5% of significance. The cheeses sensory evaluation was carried out through firmness, flavor and off-flavors using ideal scale of nine points and general acceptance was evaluated by hedonic scale of nine points. The sensory evaluations were carried out after 7, 21, 34, 48 and 61 days of storage. Milk with high SCC had higher pH than milk with low SCC. Cheeses obtained from high SCC milk showed higher moisture than cheeses with low SCC. SCC affected lactic bacteria and psychrotrophs counts, as higher levels were found in low SCC cheeses. Total count bacteria, lactic acid and psychrotrophs counts decreased during storage, while yeasts and moulds count increased, independently of milk SCC. The sensory evaluation showed lower general acceptance to high SCC cheeses when compared with low SCC cheeses.

## 1. INTRODUÇÃO

A qualidade da matéria-prima é requisito fundamental para a produção de alimentos. Para tanto, existem leis e requisitos que estabelecem padrões a serem cumpridos para a obtenção de produtos de qualidade e sem riscos à saúde do consumidor. Na indústria de laticínios, o leite é a matéria-prima básica para a fabricação de inúmeros produtos. Sua qualidade é primordial, pois influencia de forma significativa a qualidade dos produtos lácteos, como queijos, iogurte, leite UHT, leite em pó e demais derivados.

No Brasil, a publicação da Instrução Normativa Nº 51, em 2002 (Brasil, 2002), estabeleceu novos padrões para a produção do leite cru e incluiu pela primeira vez a contagem de células somáticas (CCS) como um parâmetro de qualidade a ser controlado. Segundo a IN 51/2002, o leite cru resfriado deve ter CCS < 1.000.000 cél/ml e contagem bacteriana total menor que 1.000.000 UFC/ml. Enquanto a contagem bacteriana reflete as condições de higiene na ordenha, armazenamento e transporte do leite, a CCS reflete o estado de saúde da glândula mamária dos animais, responsáveis pela síntese do leite.

As células somáticas são células epiteliais presentes no leite devido ao processo natural de renovação celular do epitélio. Entretanto, o seu aumento indica um processo inflamatório, conhecido como mastite. No caso de animais com mastite, a maioria das células somáticas são células de defesa, como os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleados, que migram do sangue para o interior da glândula mamária, com o objetivo de combater as bactérias causadoras do processo inflamatório (Brito, 2002). A reação inflamatória da glândula mamária altera a síntese do leite e a permeabilidade da membrana celular, provocando mudanças físicas, químicas e microbiológicas no leite (Auldish e Hubble, 1998).

As principais alterações incluem variações nas porcentagens de gordura e proteína, aumento da concentração de plasmina e outras enzimas do leite,

redução das porcentagens de lactose e sólidos totais e aumento do pH do leite de 6,7 para 6,9 ou maior (Auldist e Hubble, 1998; Machado, Pereira e Sarríes, 2000; Munro, Grieve e Kitchen, 1984).

A alteração da composição do leite influencia diretamente a qualidade dos produtos lácteos. De maneira geral, o aumento da CCS no leite utilizado para a fabricação de queijos causa o aumento do tempo de coagulação, a diminuição no rendimento, o aumento da umidade e decréscimo da firmeza do produto final (Auldist e Hubble, 1998; Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003; Munro Grieve e Kitchen, 1984).

Outra conseqüência do aumento da CCS do leite é o aumento da concentração de substâncias antimicrobianas provenientes do sangue ou secretadas pelas células somáticas. Estas substâncias podem afetar a atividade das culturas lácticas adicionadas na fabricação de queijos, alterando o processo de coagulação e as características sensoriais do produto (Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003; Okello-Uma e Marshall, 1986).

Alterações nas características físico-químicas de queijos fabricados a partir de leite de CCS alta são bem estabelecidas pela literatura. Entretanto, poucos trabalhos relataram as alterações que podem ocorrer na microbiota destes queijos, especialmente durante o processo de maturação do produto. A maturação envolve mudanças microbiológicas e bioquímicas responsáveis pelo desenvolvimento da textura e sabor característicos de cada variedade de queijo. Qualquer alteração no desenvolvimento da microbiota de queijos pode afetar as características físicas e sensoriais do produto (McSweeney, 2004).

Dentro deste contexto, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da contagem de células somáticas do leite sobre as características microbiológicas e sensoriais do queijo Prato durante a maturação.

## **2. OBJETIVOS**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Avaliar o efeito da CCS sobre a composição do leite e do queijo Prato;
2. Avaliar o efeito da CCS e do tempo de armazenamento sobre o desenvolvimento da microbiota do queijo Prato considerando a contagem total de bactérias, bactérias lácticas, psicrotróficos e bolores e leveduras;
3. Avaliar o efeito da CCS sobre as características sensoriais do queijo Prato ao longo da maturação.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Características do queijo Prato**

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, o Queijo Prato é o queijo maturado, obtido por coagulação enzimática do leite, complementada pela ação de bactérias lácticas específicas. É classificado como um queijo gordo, de média umidade e de massa semicozida. O produto deve apresentar consistência elástica, textura macia e compacta, podendo apresentar pequenas olhaduras bem distribuídas. Além disso, deve ser maturado por no mínimo 25 dias. A denominação queijo Prato compreende as variedades Lanche, Cobocó e Bola, de acordo com a forma e peso do produto. (Brasil, 1997). De um modo geral, o queijo Prato variedade Lanche apresenta uma textura fechada e boa fatiabilidade, já que é indicado para consumo indireto em sanduíches. A variedade Cobocó deve possuir textura mais macia, com pequenas olhaduras bem distribuídas (Oliveira, 1986).

Dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ, 2004), apontam o queijo Prato como o segundo queijo mais consumido no Brasil, sendo ultrapassado apenas pela Mussarela. Em 1999, a produção foi de 85.000 toneladas. No ano seguinte houve um aumento de 4,1%, passando a 88.500 toneladas, chegando a 97.600 toneladas produzidas em 2003. Com esta posição no mercado, o queijo Prato é um produto amplamente difundido, sendo um dos queijos mais populares do Brasil.

As etapas de fabricação incluem: pasteurização do leite (72°C/16 segundos), resfriamento a aproximadamente 32°C, adição de cultura láctica e de coalho para obter a coagulação. As etapas de tratamento da massa incluem corte, agitação, remoção parcial do soro e adição de água quente para promover o semi-cozimento da massa. Após a dessoragem, o queijo é enformado, salgado em salmoura, seco e embalado a vácuo para posterior maturação por 25 dias. Um queijo Prato típico apresenta cerca de 42 – 44% de umidade, 26 – 29% de

gordura, 1,6 – 1,9% de sal e pH entre 5,2 e 5,4 (Furtado e Lourenço, 1994). Apesar de pequenas variações, é um dos queijos com protocolo de fabricação mais bem definido dentro da indústria brasileira.

A Resolução RDC N° 12/2001 da ANVISA (Brasil, 2001), que estabelece o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, recomenda que queijos de média umidade, como o Prato, devem ser monitorados quanto às contagens de coliformes fecais, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. Os padrões exigidos de acordo com esta resolução são: ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*, contagem máxima de  $1 \times 10^3$  NMP/g para coliformes fecais e  $1 \times 10^3$  UFC/g para estafilococos.

### **3.2. Efeitos das células somáticas sobre o leite e queijo**

A mastite é a reação inflamatória de um ou mais quartos da glândula mamária, ocasionada por bactérias patogênicas que colonizam o úbere do animal. Como consequência, observa-se o aumento no número de células somáticas do leite, além de mudanças no tecido da glândula mamária (Auldist e Hubble, 1998). A contagem de células somáticas (CCS) pode então ser utilizada como um indicador da saúde do úbere do animal e da qualidade do leite (O'Brien *et al.*, 2001). Os limites máximos permitidos para CCS variam nos diferentes países. Por exemplo, nos Estados Unidos o limite máximo é de 750.000 cél/ml. O Canadá adota o limite de 500.000 cél/ml, enquanto países da União Européia, Nova Zelândia, Austrália e Japão permitem contagem máxima de 400.000 cél/ml (Brito, 2002).

No Brasil, com a aprovação da Instrução Normativa N° 51 (Brasil, 2002), limites para a CCS foram estabelecidos, visando melhorar de forma contínua e progressiva a qualidade do leite produzido no país. Esta instrução estabeleceu para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste o limite máximo de 1.000.000 cél/ml

para o leite cru refrigerado a partir de 01/07/2005, e para as regiões Norte e Nordeste, a partir de 01/07/2008. Além disso, a instrução estabelece que em 01/07/2011 a CCS máxima nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, não ultrapasse 400.000 cél/ml, atingindo assim o mesmo patamar dos países da União Européia.

Existem vários tipos de células de defesa presentes na glândula mamária, porém, as que se destacam são os neutrófilos e macrófagos. Os neutrófilos são o principal tipo de célula de defesa encontrados na glândula mamária durante os primeiros estágios do processo inflamatório, podendo chegar a 90% do total de leucócitos durante a mastite. Estas células migram do sangue para a glândula mamária para fagocitar e eliminar os patógenos causadores da infecção, além de produzirem substâncias que podem contribuir para a morte dos agentes causadores da mastite. Já os macrófagos aparecem em pequeno número durante a mastite, mas também possuem a capacidade de fagocitar os patógenos e secretam substâncias que facilitam a migração e a atividade bactericida dos neutrófilos (Sordillo e Streicher, 2002).

Os principais microrganismos causadores da mastite bovina são *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* e *Escherichia coli* (Brito, 2002; Harmon, 1994). Estes microrganismos são inativados pelo tratamento térmico (72-75 °C/15-20 segundos) (Brasil, 2002) ao qual o leite é obrigatoriamente submetido antes do processo de fabricação do queijo Prato.

O aumento da CCS causa uma série de mudanças na composição do leite e três mecanismos básicos estão envolvidos: decréscimo na síntese de componentes do leite, aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula mamária e aumento da atividade proteolítica no leite. Um indicador da capacidade de síntese das células epiteliais é o conteúdo de lactose do leite (Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003). Um decréscimo no seu conteúdo está ligado à

redução de sua síntese pelas glândulas infectadas. O aumento da permeabilidade da membrana causa a perda de lactose para o sangue e, conseqüentemente, ela pode ser encontrada em maiores concentrações na urina de vacas mastíticas (Machado, Pereira e Sarríes, 2000).

De maneira geral, os autores relatam as seguintes alterações na composição do leite associadas ao aumento da CCS (Auldíst e Hubble, 1998; Machado, Pereira e Sarríes, 2000; Munro, Grieve e Kitchen, 1984):

- Diminuição da porcentagem de gordura, entretanto, a gordura pode ser concentrada no leite quando a produção deste é reduzida mais intensamente que a síntese de gordura;
- Aumento do teor de proteína total e das proteínas do soro, e redução da caseína, como conseqüência de sua degradação pelas proteinases presentes no leite;
- Aumento da concentração de plasmina e outras enzimas do leite;
- Redução das porcentagens de lactose e sólidos totais;
- Aumento do pH do leite de 6,7 para 6,9 ou maior.

Diversos autores relatam as conseqüências do aumento da CCS no leite, obtendo resultados muitas vezes conflitantes. O'Brien *et al.* (2001) não encontraram diferença significativa na composição de leites com CCS < 50.000 cél/ml e entre 101.000 - 300.000 cél/ml. Entretanto, leites com CCS entre 301.000 – 500.000 cél/ml apresentaram maiores concentrações de proteína total, caseína e proteínas do soro do que leites com CCS entre 101.000 – 300.000 cél/ml. Além disso, os autores não observaram alterações nas concentrações de lactose, gordura, frações de nitrogênio e no tempo de coagulação em leites com CCS > 650.000 cél/ml.

Já Machado, Pereira e Sarríes (2000), estudando a composição e CCS de leite de tanques de rebanhos brasileiros, observaram que leites com CCS mais

altas apresentaram maior porcentagem de gordura, menor de proteína e lactose e igual de sólidos totais. Essas mudanças ocorreram a partir de 1.000.000 cél/ml para gordura e 500.000 cél/ml para proteína e lactose.

Klei *et al.* (1998), trabalhando com leite de CCS baixa e alta, relataram aumento do pH do leite com o aumento da CCS, e maiores porcentagens de nitrogênio total e caseína para o leite de CCS alta, embora a caseína como porcentagem da proteína verdadeira tenha sido menor nestes leites. Os autores também observaram que a porcentagem de lactose foi muito menor no leite com CCS alta e que não houve diferença significativa no conteúdo de gordura.

O pH é um parâmetro importante no processo de fabricação de queijos e afeta a formação do coágulo, a sinérese da massa e, conseqüentemente, a umidade e a textura do produto final. O aumento do pH do leite pode retardar a ação da renina, aumentando o tempo de coagulação em leites com CCS alta, comprometendo assim, a qualidade dos queijos pela formação de um coágulo mais fraco e úmido (Auld *et al.*, 1996; Harmon, 1994; Munro, Grieve e Kitchen, 1984).

Como já dito anteriormente, durante a mastite ocorre aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos da glândula mamária, permitindo o fluxo de componentes do sangue para o leite (Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003). Entre estes componentes encontram-se substâncias antimicrobianas, em concentrações aumentadas no leite de CCS alta, que podem influenciar no crescimento e metabolismo das culturas lácticas, afetando desde a coagulação do leite até propriedades de textura e sabor do produto final (Okello-Uma e Marshall, 1986).

Entre estas substâncias, encontram-se as imunoglobulinas (Ig), a lactoferrina e a soroalbumina bovina (BSA). Durante a mastite, a concentração de imunoglobulinas aumenta, melhorando a capacidade de fagocitose dos neutrófilos

e macrófagos. A lactoferrina, que tem a capacidade de ligar ferro, previne o crescimento bacteriano (Sordillo e Streicher, 2002).

Estudando a influência da mastite no desenvolvimento de culturas lácticas, Okello-Uma e Marshall (1986) observaram que o crescimento do *Streptococcus thermophilus* foi estimulado no leite com CCS alta, devido à maior hidrólise da caseína neste leite. A produção de ácido pelo *Lactobacillus acidophilus* em leite de CCS alta foi negativamente afetada. Os autores afirmam que quando o leite com CCS alta foi analisado ao microscópio, observou-se a fagocitose dos microrganismos pelos neutrófilos. Ainda sugerem que a menor produção de ácido em leite mastítico é devido a fatores antimicrobianos que resultaram do aumento da atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleados. Os autores concluem que as células somáticas podem fagocitar e matar alguns microrganismos, ainda que a atividade proteolítica resultante da inflamação possa estimular outros.

Lindmark-Månsson *et al.* (2000) avaliaram o tempo de fermentação de leites com diferentes contagens de células somáticas utilizando cultura do tipo “LD” (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*). Os autores observaram aumento do tempo de fermentação em leites com CCS > 300.000 cél/ml, indicando que mesmo uma baixa CCS pode afetar o crescimento da cultura láctica, e aumento na concentração de imunoglobulinas em leites com CCS > 20.000 cél/ml. Segundo os autores, a presença de imunoglobulinas pode influenciar na atividade da cultura.

O aumento da atividade proteolítica é característica marcante nos leites com alta CCS. A concentração de diferentes enzimas aumenta no leite mastítico, como a catalase, lipase, fosfatase alcalina e ácida, NAGase e a plasmina (Harmon, 1994; Munro, Grieve e Kitchen, 1984). O aumento da atividade de plasmina pode estar relacionado com o aumento da CCS (O’Brien *et al.*, 2001). A

plasmina é a principal proteinase nativa do leite, com atividade ótima a pH 7,5 e 37°C (Bastian e Brown, 1996; Crudden, Fox e Kelly, 2005).

Vários estudos demonstram o efeito do aumento da contagem de células somáticas sobre as características sensoriais do leite e produtos lácteos (Ma *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Santos, Ma e Barbano, 2003). Ma *et al.* (2000) observaram mais intensa lipólise e proteólise em leite cru de CCS alta, quando comparado ao de CCS baixa. A mastite afetou a qualidade do leite pasteurizado produzido e diminuiu sua vida de prateleira. O leite pasteurizado de CCS baixa apresentou-se inalterado sensorialmente mesmo após 21 dias de armazenamento refrigerado, enquanto o leite de CCS alta apresentou defeitos sensoriais como rancidez, amargor e adstringência entre os dias 14 e 21 de armazenamento, provavelmente causado pelos altos níveis de enzimas lipolíticas e proteolíticas deste leite.

Santos, Ma e Barbano (2003), inibiram o crescimento microbiano em leites de CCS baixa e alta, através da adição de dicromato de potássio, para estudar isoladamente a atividade das proteases e lipases do leite durante seu armazenamento refrigerado. Os pesquisadores observaram o aumento da atividade proteolítica e lipolítica em leite de CCS alta. O leite cru de CCS < 50.000 cél/ml, armazenado a 6°C, apresentou sabores indesejáveis de proteólise e lipólise entre 50 e 70 dias, enquanto leite com CCS > 1.000.000 cél/ml, nas mesmas condições, apresentou sabores indesejáveis de lipólise por volta de 35 dias e de proteólise por volta de 18 dias de armazenamento. Eles ainda concluíram que a combinação de CCS < 100.000 cél/ml, baixa contagem microbiana (< 1 UFC/ml) e baixa temperatura de armazenamento podem ser o potencial para a produção de leite fluido com uma vida-de-prateleira refrigerada maior que 61 dias.

A contagem de células somáticas também pode afetar a qualidade sensorial de iogurtes. Um estudo mostrou que o iogurte fabricado a partir de leite com CCS

maior que 800.000 cél/ml apresentou qualidade sensorial inferior, especialmente quanto à consistência e sabor do produto final, apesar dos parâmetros químicos e microbiológicos não terem sido afetados (Oliveira *et al.*, 2002).

Modificações na qualidade sensorial do queijo podem ser dependentes de vários fatores, entre eles a transferência de enzimas do sangue ou do leite para o queijo, que modificam a proteólise e lipólise durante a maturação, e modificações no ecossistema microbiano. O impacto do leite mastítico na textura e sabor do queijo está parcialmente relacionado à atividade enzimática aumentada deste leite (Coulon *et al.*, 2004). De maneira geral, os efeitos do aumento da CCS do leite nos queijos causam diminuição de rendimento, aumento do tempo de coagulação, decréscimo da firmeza do coágulo e aumento da umidade do queijo (Arcuri *et al.*, 1990; Auldust e Hubble, 1998; Coulon *et al.*, 2004; Le Roux, Laurent e Moussaoui, 2003; Mazal, 2005; Munro, Grieve e Kitchen, 1984).

### **3.3. Microbiologia e bioquímica da maturação de queijos**

O processo de maturação de queijos é complexo e envolve mudanças microbiológicas e bioquímicas que desenvolvem na massa textura e sabor característicos de cada variedade. As mudanças microbiológicas durante a maturação incluem a morte e lise das células da cultura láctica e o crescimento da microbiota secundária. As mudanças bioquímicas envolvem o metabolismo da lactose residual, lactato e citrato, metabolismo da gordura e proteína, seguidos do desenvolvimento de compostos do sabor e metabolismo de ácidos graxos e aminoácidos (McSweeney, 2004).

Embora a legislação não permita a fabricação de queijo Prato a partir de leite cru, quando sua utilização é permitida para outros queijos, por exemplo, queijos de longa maturação, o leite cru contribui com uma microbiota muito rica e diversa. Esta microbiota tem função fundamental na fermentação e é um dos mais importantes parâmetros que afetam a qualidade do queijo. Além disso, a

biodiversidade desta microbiota é ampla, influenciando de maneira decisiva as características bioquímicas e o sabor dos queijos (Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

A qualidade microbiológica do leite utilizado como matéria-prima é de fundamental importância, pois muitos problemas podem ser originados do uso de leite cru de baixa qualidade na fabricação de queijos, podendo causar intoxicações alimentares pela presença de bactérias patogênicas. Carmo *et al.* (2002) relataram dois casos de intoxicação alimentar ocasionados por consumo de queijo Minas e de leite cru contaminados por *Staphylococcus aureus* e suas toxinas, envolvendo 378 indivíduos que consumiram os produtos. Os autores concluíram que a contaminação pode ter sido provocada pela utilização de leite mastítico.

A pasteurização do leite visa a fabricação de produtos padronizados e com requisitos de segurança à saúde do consumidor. No entanto, a pasteurização do leite para produção de queijos, além de garantir a eliminação de patógenos também reduz a microbiota do leite, havendo a necessidade da adição de culturas lácticas, no intuito de se obter um queijo com características semelhantes ao produzido com leite cru (Albenzio *et al.*, 2001).

A microbiota desempenha função fundamental no desenvolvimento das características únicas de cada variedade de queijo e vários fatores influenciam seu crescimento durante a maturação. Dentre eles estão atividade de água, concentração de sal, temperatura de maturação e pH. A atividade de água ( $A_w$ ) é diretamente proporcional ao conteúdo de umidade do queijo e inversamente proporcional à concentração de sal. Durante os primeiros estágios de fabricação, a  $A_w$  é alta para dar condições de crescimento à cultura láctica. Após a dessoragem, salga e durante a maturação a  $A_w$  decresce, diminuindo também a atividade metabólica e de multiplicação dos microrganismos presentes no queijo. O sal auxilia no controle do desenvolvimento balanceado das bactérias da cultura

e na prevenção do crescimento de microrganismos deteriorantes (Beresford *et al.*, 2001).

A temperatura deve ser adequada para promover o crescimento dos microrganismos de maturação (mesofílicos ou termofílicos), controlar o crescimento da microbiota secundária e prevenir a propagação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Geralmente, o queijo Prato é maturado a 12°C, o Cheddar de 6-8°C e o Camembert a temperaturas de 10-15°C. Queijos do tipo Suíço, como o Emmental, são maturados a 12°C por duas semanas, depois a 20-24°C por mais 2-4 semanas, para que ocorra a formação de olhaduras e depois a temperatura é diminuída para 4°C até o final da maturação (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2000; Oliveira, 1986). O pH do queijo após a fabricação encontra-se numa faixa de 4,5 – 5,3. Como a maioria das bactérias crescem de forma bastante lenta em pH abaixo de 5,0, este torna-se um fator significativo no controle do crescimento bacteriano (Fox *et al.*, 2000).

Os microrganismos presentes no queijo podem ser divididos em: bactérias ácido-láticas adicionadas como cultura, microrganismos da microbiota láctica e microrganismos contaminantes do processo. Todos eles desempenham papel importante na maturação microbiológica contribuindo para o processo com a liberação de enzimas extracelulares, liberadas no queijo durante o seu crescimento, e intracelulares, liberadas após a morte e lise das células (Beresford *et al.*, 2001).

As bactérias ácido-láticas podem ser tanto adicionadas no início da fabricação, quanto contaminantes naturais do leite. Sua principal função é produzir ácido láctico a partir da lactose durante a fermentação, mas suas enzimas certamente contribuem para a maturação após a lise das células (Beresford *et al.*, 2001). O ácido favorece a atividade da renina, auxilia na sinérese do coágulo e previne o crescimento de microrganismos indesejáveis. A maior sinérese advinda

do menor pH afeta a composição do queijo e, conseqüentemente, a posterior ação dos microrganismos durante a maturação (Fox *et al.*, 2000).

As bactérias ácido-láticas dominam a microbiota durante a maturação. Os microrganismos pertencentes a este grupo são, geralmente, *Lactococcus* e *Lactobacillus*, mesofílicos ou termofílicos. Sua predominância depende do tipo de queijo e das condições de processamento. Os *Lactococcus* geralmente fazem parte do fermento adicionado durante a fabricação, degradando lactose e produzindo ácido durante a fabricação e nos primeiros estágios da maturação. Os *Lactobacillus* pertencem ao grupo de microrganismos contaminantes presentes em queijos denominados de NSLAB (“non-starter lactic acid bacteria”). Possuem o metabolismo mais lento e podem se adaptar a condições mais adversas, tais como acidez mais elevada, baixa  $A_w$  e altas concentrações de sal, contribuindo para os estágios mais avançados da maturação, aumentando no queijo as concentrações de pequenos peptídeos, aminoácidos e ácidos graxos livres (Arenas *et al.*, 2004; Beresford *et al.*, 2001; Coppola *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2000; Manolopoulou *et al.*, 2003; Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

Vários estudos foram realizados com o objetivo de caracterizar a microbiota de diferentes queijos. Arenas *et al.* (2004) observaram em queijo Genestoso, fabricado a partir de leite cru, com coagulação ácida e maturado por 30 dias, que *Lactococcus* e *Leuconostoc* passaram por rápido crescimento durante os primeiros dias de maturação, o que foi acompanhado por grande decréscimo no pH. Ao longo da maturação, as contagens destes microrganismos decresceram, e as contagens de *Lactobacillus* e fungos aumentaram.

Marino, Maifreni e Rondinini (2003), trabalhando com queijo Montasio, produzido com leite cru ou termizado, através de coagulação ácida e maturado por 2 meses, relataram que a população de coliformes totais e fecais desapareceu rapidamente durante a maturação, provavelmente devido ao efeito inibitório do pH. As bactérias ácido-láticas foram predominantes, com a diminuição de

*Lactococcus* e aumento da contagem de *Lactobacillus* mesofílicos (NSLAB) durante a maturação. Coppola *et al.* (2000) também observaram a redução na contagem de *Lactococcus* durante os primeiros estágios de maturação do queijo Parmigiano Reggiano.

A microbiota secundária, presente na maioria dos queijos de leite cru ou pasteurizado, denominada NSLAB (“non-starter lactic acid bacteria”), é constituída por lactobacilos mesofílicos e outras bactérias como *Enterococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. Estas bactérias não fazem parte da cultura láctica adicionada e não contribuem para a produção de ácido no coágulo, durante a fermentação. Sua presença é atribuída a recontaminação pós-pasteurização e possuem a capacidade de se multiplicar no interior de queijos com baixo pH, alto conteúdo de sal e falta de carboidrato fermentável e de oxigênio. O grupo é considerado de importância tecnológica por sua capacidade acidificante nos estágios mais avançados da maturação, e por sua atividade proteolítica e lipolítica. Os *Leuconostoc* são considerados importantes por sua capacidade de desenvolvimento de aromas e formação de pequenas olhaduras por sua habilidade de metabolizar citrato. Entretanto, dependendo do tipo de queijo, sua presença pode ser indesejável por ocasionar defeitos pela formação de gás (Arenas *et al.*, 2004; Beresford *et al.*, 2001; Manolopoulou *et al.*, 2003; Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

Na fabricação de queijo Prato tipo Lanche, utiliza-se o fermento do tipo O, composto por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, uma cultura basicamente acidificante, o que proporciona ao produto uma textura mais fechada e boa fatiabilidade, por ser geralmente consumido como ingrediente em lanches. O fermento láctico normalmente utilizado para fabricação de queijo Prato variedade Cobocó é do tipo LD, composto por *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc cremoris*. As duas primeiras espécies são responsáveis pela produção de ácido láctico. O *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

biovar. *diacetylactis* e o *Leuconostoc cremoris* são fermentadores de citrato, produzindo CO<sub>2</sub> e diacetil, que conferem ao queijo a textura, aroma e sabor característicos desta variedade (Oliveira, 1986).

Alguns estudos foram realizados para estabelecer qual a função e significância da microbiota secundária no processo de maturação. Ela pode estar envolvida no desenvolvimento do sabor e baixas contagens podem ter efeito benéfico no queijo, entretanto, contagens elevadas são indesejáveis. O reconhecimento da ação destes microrganismos levou a pesquisas sobre a aplicação de culturas adjuntas. Culturas adjuntas são definidas como aquelas adicionadas com os objetivos de acelerar a maturação e intensificar o desenvolvimento de sabor, porém não são acidificantes. *Lactobacillus* e *Enterococcus* geralmente fazem parte da microbiota do leite cru, e podem ser utilizados como culturas adjuntas. Estes microrganismos conferem ao queijo produzido com leite pasteurizado, características de sabor e aroma bastante semelhantes a dos queijos produzidos com leite cru (Fox, McSweeney e Lynch, 1998; Giraffa, 2003).

A microbiota secundária é composta também por outras bactérias, leveduras e/ou fungos que são adicionadas intencionalmente ao processo e crescem internamente ou externamente ao queijo. Sua função é produzir características específicas de maturação como olhaduras nas variedades Suíças e desenvolvimento de fungos nos queijos Roquefort, Gorgonzola e Camembert, além de sabor e textura (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2000).

Leveduras e bolores podem também ser originários da contaminação de equipamentos e do ambiente. A contaminação por leveduras pode ocorrer também através da salmoura. Elas podem contribuir para a maturação devido sua atividade proteolítica e lipolítica, que afetam o desenvolvimento de aroma e sabor. Os bolores crescem bem no pH do queijo e são tolerantes ao sal e baixas Aw, mas precisam de um mínimo de oxigênio para se multiplicar. A contaminação pode ser

proveniente das paredes das salas de maturação, por isso é importante evitar seu crescimento nestas áreas (Arenas *et al.*, 2004; Manolopoulou *et al.*, 2003; Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

Microrganismos indicativos de qualidade higiênica como coliformes e *E. coli* podem estar presentes no coágulo na etapa de fabricação. No entanto, sua contagem decresce rapidamente durante a maturação até níveis não detectáveis, provavelmente devido às condições inibitórias que se desenvolvem no queijo, como baixo pH e falta de oxigênio (Manolopoulou *et al.*, 2003; Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

A conversão da lactose a lactato é feita pelas bactérias da cultura láctica desde a formação do coágulo e nos primeiros estágios da maturação. A concentração de lactose no coágulo fresco depende de vários fatores, dentre eles a umidade, a extensão da fermentação antes da prensagem e do tratamento aplicado à massa (lavagem da massa). Variações na concentração de lactose do coágulo podem afetar o pH final do queijo, que por sua vez, afetará a textura, a atividade enzimática e a microbiota secundária (Fox *et al.*, 2000). O lactato produzido é um substrato de grande importância para reações que ocorrem durante a maturação de certas variedades de queijo como o Emmental. As bactérias ácido-lácticas presentes neste tipo de queijo metabolizam o lactato, formando propionato, acetato, CO<sub>2</sub> e água. O acetato e propionato contribuem para o sabor do queijo, enquanto o CO<sub>2</sub> é responsável pela formação de olhaduras (McSweeney, 2004).

O citrato existe no leite em quantidades relativamente pequenas, mas é um importante precursor de compostos de sabor em queijos que usam culturas mesofílicas. Ele é metabolizado em diacetil e CO<sub>2</sub> já no início da maturação (Fox *et al.*, 2000). Valle *et al.* (1992), estudando a evolução da microbiota de queijo Prato, observaram que os microrganismos fermentadores de citrato, que eram numerosos inicialmente, apresentaram redução durante a maturação. Os autores

confirmam a importância destes microrganismos para a maturação por produzirem compostos responsáveis pelo aroma e pequenas olhaduras características de algumas variedades do queijo Prato.

A lipólise ocorre em todas as variedades de queijos, sendo de forma limitada na maioria deles e mais extensiva nas variedades italianas e nos queijos azuis. Entre as enzimas que podem contribuir para a lipólise estão a lipase lipoprotéica (LPL) nativa do leite, lipases do coagulante e lipases microbianas (McSweeney, 2004). A hidrólise dos triacilgliceróis pelas lipases produz ácidos graxos livres (AGL). AGL são componentes do sabor de queijos e também servem como precursores para a produção de compostos voláteis do sabor. Um fator que pode contribuir para o aumento da concentração de AGL no leite é a mastite. Neste caso, a concentração de AGL tem sido associada ao desenvolvimento de sabor e odor de ranço (Deeth, 2002).

A proteólise é o evento bioquímico mais complexo e importante que ocorre durante a maturação da maioria dos queijos. Considerando-se as diferenças entre práticas de fabricação e protocolos de maturação das muitas variedades de queijos, o padrão de proteólise pode ser resumido como se segue: as caseínas são hidrolisadas pela atividade do coagulante residual retido na massa e pela plasmina, produzindo grandes e médios peptídeos. Estes peptídeos são hidrolisados pelas enzimas das bactérias da cultura láctica e da microbiota secundária a pequenos peptídeos e aminoácidos (McSweeney, 2004). As reações primárias são responsáveis pela mudança da textura devido à hidrólise da matriz protéica por enzimas proteolíticas. Os peptídeos e aminoácidos são substratos para reações catabólicas que geram compostos sápidos e aromáticos, contribuindo diretamente para o sabor do queijo. A proteólise pode variar de muito limitada a muito extensiva, dependendo da característica do queijo produzido. A mussarela sofre muito pouca proteólise, enquanto queijos azuis, como o Roquefort, passam por um processo proteolítico muito intenso. Peptídeos e aminoácidos podem também conferir sabor amargo em queijos, dependendo da

extensão da proteólise e da especificidade da enzima proteolítica (Fox *et al.*, 2000; McSweeney, 2004).

O sistema enzimático plasmina é normalmente encontrado no leite na forma de um complexo compreendido por plasmina, plasminogênio, inibidores de plasmina, ativadores de plasminogênio e inibidores de ativadores de plasminogênio. Plasmina, plasminogênio e ativadores de plasminogênio encontram-se associados às micelas de caseína, enquanto inibidores de plasmina e inibidores de ativadores de plasminogênio estão na fase aquosa do leite. O plasminogênio é o precursor inativo da plasmina. Portanto, em ausência de inibidores, ativadores de plasminogênio produzem plasmina ativa a partir do plasminogênio, resultando na degradação da caseína (Bastian e Brown, 1996).

A plasmina tem alta especificidade por ligações peptídicas contendo resíduos lisina na porção N-terminal da cadeia. Ela é ativa sobre todas as caseínas, mas especialmente sobre a  $\alpha_{s2}$ - e  $\beta$ -caseínas. A plasmina quebra a  $\beta$ -caseína com formação de  $\gamma$ -caseínas e proteose peptona e cliva a  $\alpha_{s2}$ -caseína produzindo peptídeos hidrofóbicos potencialmente amargos. Embora com menor intensidade, esta enzima também atua sobre a  $\alpha_{s1}$ -caseína, mas a  $\kappa$ -caseína é resistente à proteólise por plasmina (Crudden, Fox e Kelly, 2005; Farkye e Fox, 1992; Fox *et al.*, 2000).

Apesar do pH no queijo não ser ótimo para sua ação, a plasmina é a principal responsável pela hidrólise da  $\beta$ -caseína nos primeiros estágios da maturação de queijos com alta temperatura de cozimento (Fox *et al.*, 2000). Farkye e Fox (1992) estudaram a contribuição da plasmina na proteólise e desenvolvimento de sabor durante a maturação do queijo Cheddar e comprovaram, através da eletroforese, que a maior concentração de plasmina resultou em aumento na quebra de  $\beta$ -caseína e maior formação de  $\gamma$ -caseínas. Entretanto, os autores não detectaram nenhum tipo de gosto amargo durante os 6 meses de maturação dos queijos.

Crudden, Fox e Kelly (2005), estudando os fatores que afetam a ação da plasmina em leite, observaram que a 37°C, quando a concentração de plasmina no leite foi aumentada, ocorreu extensiva degradação da  $\beta$ -caseína, quando comparada com a mesma concentração a 4°C. Os autores sugerem que quanto mais rápido o leite for resfriado após a ordenha, a ação de hidrólise da plasmina sobre a caseína será minimizada, preservando assim a sua funcionalidade.

A ação da plasmina sobre a caseína tem sido amplamente estudada, pois pode provocar mudanças significativas nas características finais dos produtos processados com leite mastítico, especialmente produtos de base protéica. Srinivasan e Lucey (2002) estudaram os efeitos da atividade de plasmina nas propriedades reológicas de géis de renina, como sistema modelo. Foi demonstrado que a hidrólise da caseína afetou negativamente as propriedades destes géis, hidrolisando prontamente  $\beta$ - e  $\alpha$ -caseínas. A hidrólise das caseínas levou à formação de géis mais fracos e frágeis, com poucas interconexões entre partículas em sua estrutura. Textura e rendimento dos géis foram afetados negativamente pela elevada atividade de plasmina. O conteúdo de umidade destes géis também aumentou. Considerando que a elevada atividade de plasmina afeta as características dos géis de renina, certamente afetará na fabricação de queijos na mesma direção.

Mara *et al.* (1998) investigaram os efeitos da hidrólise das proteínas do leite pela plasmina no rendimento e umidade de géis de renina. Os resultados mostraram diminuição do rendimento, decréscimo na firmeza dos géis formados e aumento no tempo de coagulação, com o aumento da concentração de plasmina. Entretanto, o conteúdo de umidade dos géis não foi afetado. Os autores sugerem que o maior conteúdo de umidade encontrado em queijos fabricados com leite de CCS alta pode estar ligado a fatores como alterações no pH e no balanço mineral desses leites, e não ao aumento da atividade de plasmina.

Outras enzimas, provenientes dos leucócitos, também podem contribuir para o aumento da atividade proteolítica em leites com CCS alta. Cooney *et al.* (2000) avaliaram o efeito do aumento da CCS do leite sobre a proteólise do queijo tipo Suíço durante a maturação. A alta temperatura de tratamento da massa durante a fabricação do queijo Suíço (54°C) inativou o coagulante adicionado, diminuindo a proteólise primária da  $\alpha_{s1}$ -caseína durante a maturação. Neste estudo, com o aumento da CCS, a recuperação de proteína no queijo diminuiu, aumentando suas perdas para o soro. A proteólise durante a maturação foi alterada, ocorrendo quebra mais rápida da  $\alpha_{s1}$ -caseína, formando  $\alpha_{s1}$ -I-caseína no queijo com elevada CCS. Como a plasmina não produz  $\alpha_{s1}$ -I-caseína, os autores sugerem que a elevada atividade proteolítica neste tipo de queijo pode ser atribuída à outra enzima derivada dos leucócitos, provavelmente a catepsina-D. O aumento da atividade desta enzima, somado a elevada CCS pode influenciar negativamente na qualidade do queijo Suíço.

Além da renina, da plasmina e de proteinases e lipases produzidas pelos microrganismos da cultura láctica, as enzimas de microrganismos psicrotóxicos também contribuem para a proteólise no queijo. A ação da renina depende da sua quantidade no queijo. Normalmente, 30% da renina adicionada ao leite permanece no coágulo após a dessoragem (McSweeney, 2004). Esta renina residual quebra, principalmente, a  $\alpha_{s1}$ -caseína e é mais ativa em pH mais baixo, enquanto a plasmina degrada a  $\beta$ -caseína, sendo mais ativa no pH mais alto. Como o leite mastítico possui pH elevado, conseqüentemente, o pH do coágulo também será maior, prejudicando a ação da renina e favorecendo a ação da plasmina (Watkinson *et al.*, 2001).

O efeito do leite com CCS alta sobre o comportamento do pH durante a fabricação do queijo Prato foi observado por Mazal (2005). O autor observou que durante a fabricação do queijo, o pH do leite de CCS alta e do coágulo formado foi maior que o de CCS baixa. Ao final do processo, o pH do queijo de CCS alta

também foi mais elevado que o do queijo de CCS baixa. O comportamento do pH afetou a sinérese dos queijos de CCS alta, aumentando o seu teor de umidade.

Segundo estudo realizado por Santana *et al.* (2001), os principais pontos de contaminação de microrganismos psicotróficos são os latões, tanques de expansão, água residual de equipamentos e utensílios de ordenha e tetos higienizados inadequadamente. Embora os psicotróficos sejam destruídos pela pasteurização, eles produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que mantêm suas atividades após o tratamento térmico. A ação destas enzimas ocasionará perda de consistência na formação do coágulo para fabricação de queijos (Santos e Fonseca, 2001).

Algumas pesquisas foram realizadas para avaliar os efeitos da CCS alta sobre as características físico-químicas de diferentes queijos como Cheddar (Grandisson e Ford, 1986; Politis e NG-Kwai-Hang, 1988); queijo tipo Suíço (Cooney *et al.*, 2000); queijo Prato (Arcuri *et al.*, 1990; Mazal, 2005) e queijo Cottage (Klei *et al.*, 1998). No entanto, existem poucos trabalhos focados nas alterações que podem ocorrer na microbiota de maturação do queijo produzido com leite de CCS alta. Segundo estudos realizados por Albenzio *et al.* (2001) o queijo Canestrato Pugliese fabricado a partir de leite de ovelha cru de CCS alta (950.000 cél/ml) não diferiu do queijo produzido com leite de CCS baixa (750.000 cél/ml). Apesar de não mostrarem os resultados, os autores afirmam que a cinética dos principais grupos de microrganismos (estafilococos, enterococos e lactobacilos mesofílicos) não foi alterada nos queijos de alta CCS. Esta diferença pode não ter sido evidenciada pelo fato de que as contagens dos dois leites podem ser consideradas altas.

Arcuri *et al.* (1990) avaliaram o efeito da CCS do leite sobre a qualidade do queijo Prato. Os autores observaram depreciação significativa do sabor nos queijos fabricados com leite de CCS acima de 500.000 cél/ml. Os queijos apresentaram textura quebradiça com formação de olhaduras e produção de gás

que causaram, conseqüentemente, o estufamento do produto. Os autores ainda observaram a redução da atividade da cultura láctica em leite cru, pasteurizado e desnatado pasteurizado com CCS >  $1 \times 10^6$  cél/ml. Segundo os autores, esta redução foi causada pela fagocitose das bactérias do fermento pelos leucócitos presentes no leite de alta CCS. A depreciação sensorial pode ter sido influenciada pelo comportamento da cultura láctica.

Considerando-se que a mastite causa aumento da CCS e do pH do leite, todo o processo de fabricação de queijos pode ser comprometido, tanto no aspecto físico-químico quanto microbiológico. Entre estas alterações estão: aumento da atividade enzimática e do tempo de coagulação, formação de coágulo mais frágil, possibilidade do desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e de alterações no desenvolvimento da microbiota normal do queijo.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Leite**

O leite utilizado como matéria-prima para o experimento foi proveniente de vacas leiteiras da raça Holandesa, pertencentes ao rebanho da Prefeitura do Campus Administrativo da USP de Pirassununga – Departamento de Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP.

Foram selecionadas vacas em estágio intermediário de lactação e não submetidas ao tratamento com antibióticos durante os últimos sete dias. As vacas foram ordenhadas individualmente e as amostras coletadas de cada animal foram encaminhadas para o Laboratório de Fisiologia da Lactação – Departamento de Produção Animal da Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ/USP), em Piracicaba/SP, para avaliação da CCS e da composição centesimal, através de espectrofotometria infravermelha, em contador eletrônico de células somáticas (Bentley®).

Com base na CCS, no volume de leite produzido e nos teores de proteína e gordura, foram separados dois grupos de animais, que foram ordenhados separadamente para a obtenção de leite com CCS baixa (< 200.000 cél/ml) e alta (> 700.000 cél/ml), mantendo-se similares os teores de gordura e proteína total. Um exemplo das planilhas utilizadas para fazer estes cálculos encontra-se no Anexo I.

Após a ordenha, o leite foi resfriado (4°C) e transportado para a Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Tecnologia de Alimentos – UNICAMP/SP para a fabricação do queijo Prato. Antes do tratamento térmico, amostras foram coletadas e analisadas para confirmação dos níveis de células somáticas no mesmo laboratório citado anteriormente (ESALQ/USP). Em seguida, os leites de CCS baixa e alta foram submetidos ao tratamento térmico (68°C/2

minutos), resfriados a 4°C e armazenados em câmara fria à mesma temperatura até o dia seguinte, quando foram utilizados para a fabricação dos queijos.

## 4.2. Coadjuvantes Tecnológicos

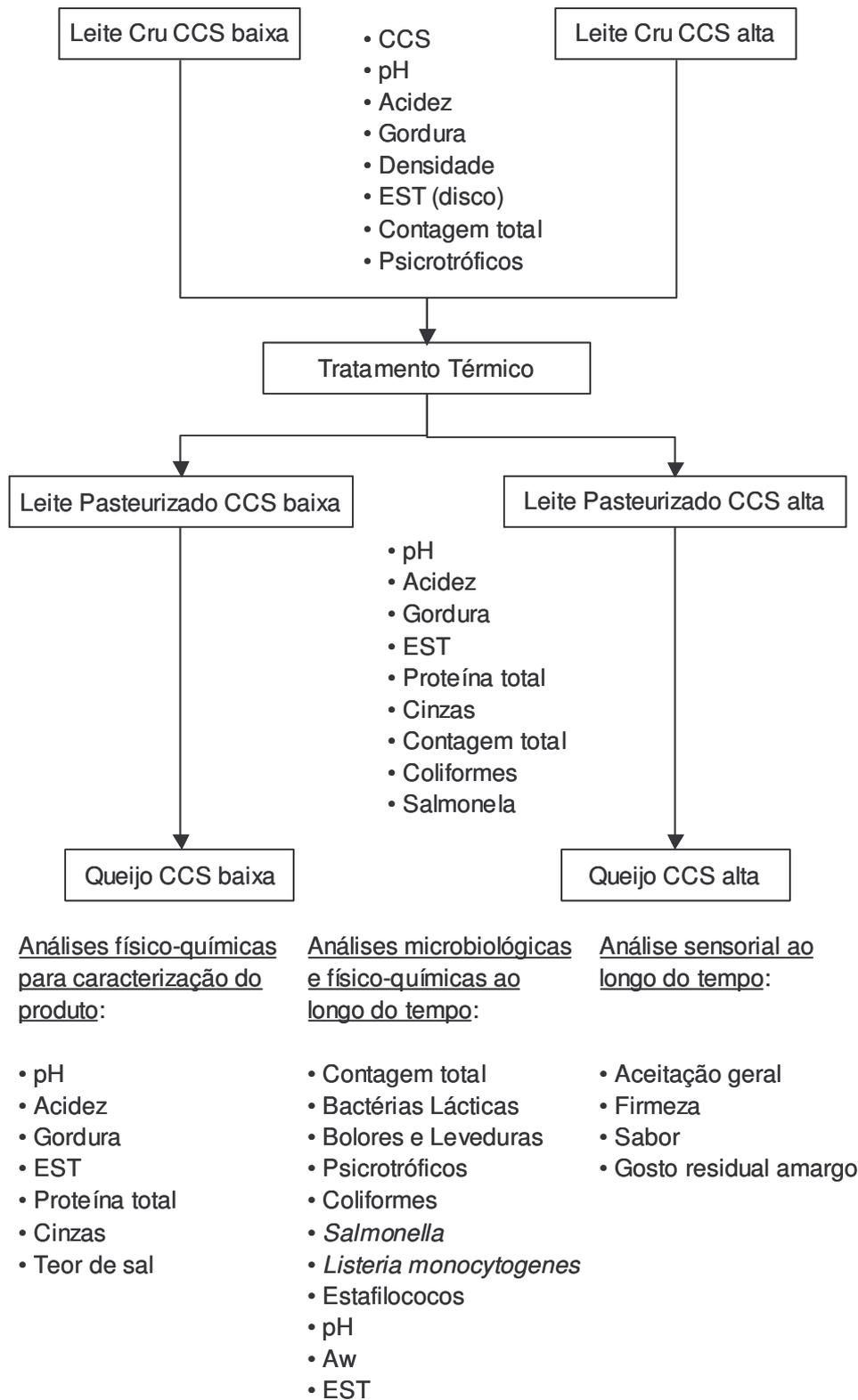
- Solução de cloreto de cálcio 50%;
- Fermento láctico mesofílico tipo “O”, Wisby-Visbyac<sup>®</sup> LC-MIX F0 2 01, composto de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, fornecida pela Danisco Brasil Ltda;
- Coalho bovino em pó (Calf Rennet Powder Concentrate – Quimosina 90%), fornecido pela Rhodia Brasil;
- Corante urucum líquido.

## 4.3. Métodos

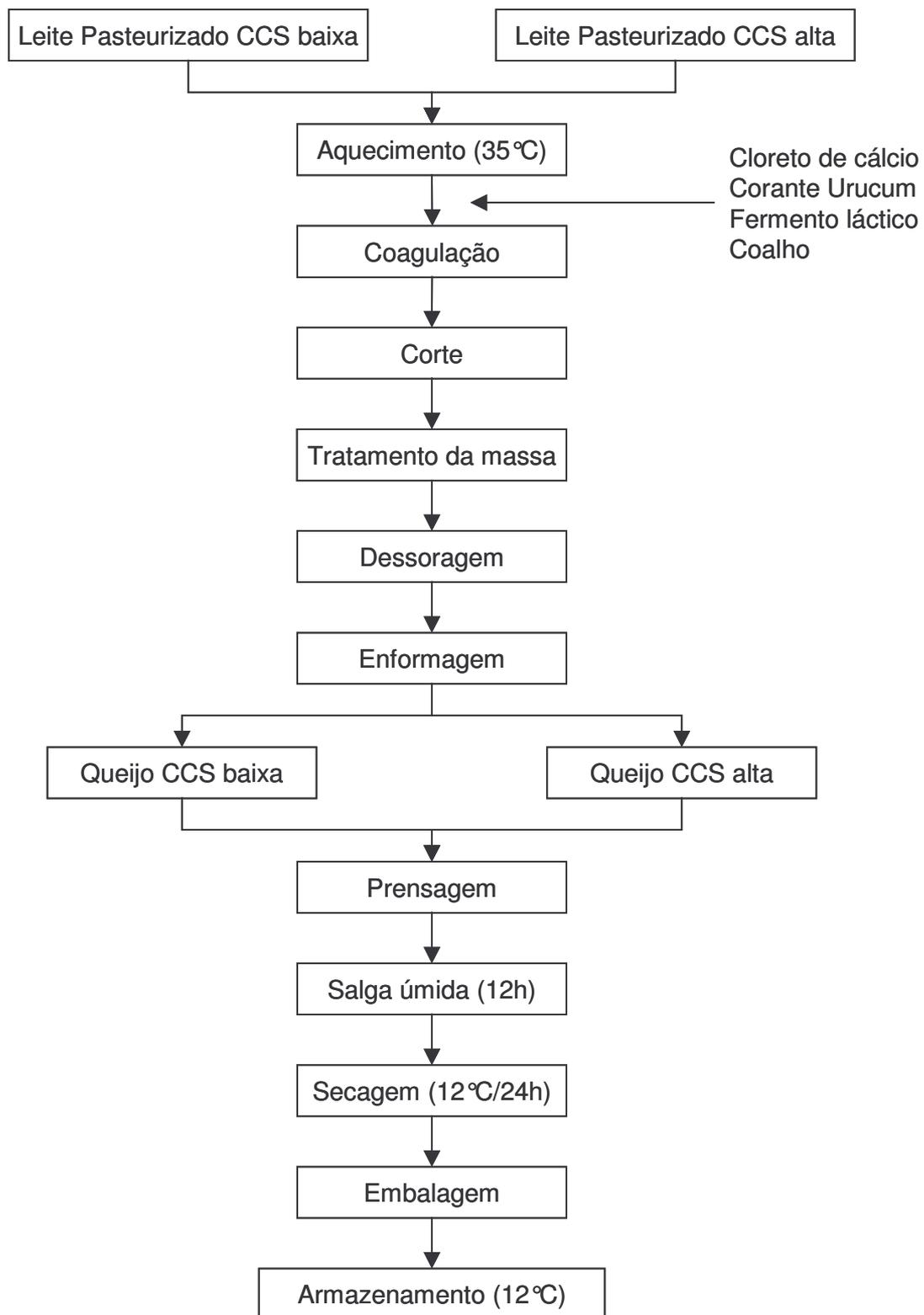
### 4.3.1. Fabricação do queijo Prato

O esquema geral de trabalho é apresentado na Figura 4.1. Foram feitas 5 repetições do processamento, sendo que os queijos obtidos das quatro primeiras foram utilizados para acompanhamento das características microbiológicas do produto ao longo do tempo. Os queijos obtidos da quinta repetição foram utilizados para avaliação sensorial ao longo da maturação.

Os queijos foram fabricados pelo método tradicional (Oliveira, 1986) a partir dos leites com CCS baixa e alta, conforme fluxograma apresentado na Figura 4.2. A quantidade de coalho adicionada foi calculada para se obter a coagulação em 35 minutos no leite com CCS baixa. O tempo de coagulação foi ajustado para o leite com CCS alta, utilizando-se a mesma quantidade de coalho, e o tempo médio de coagulação para este leite foi de  $46 \pm 6$  minutos. Esta avaliação foi feita para cada processamento.



**Figura 4.1:** Esquema geral de desenvolvimento do trabalho.



**Figura 4.2:** Fluxograma do processo de fabricação do queijo Prato.

Para a fabricação dos queijos, utilizou-se “queijomatic”, com capacidade para 100 litros de leite, dotada de lira para corte e controle de agitação. O leite foi aquecido a 35°C através da adição de vapor na camisa do tanque. Adicionou-se cloreto de cálcio (250 ppm), corante urucum (80 ppm), fermento láctico mesofílico tipo O (1%) e coalho. Após a coagulação, o gel foi cortado em cubos de cerca de 0,5 cm de aresta e a mistura soro/coágulo foi agitada por 20 minutos com aumento gradativo da velocidade de agitação. Em seguida, foi feita a primeira dessoragem, com a retirada de 30% do soro. Adicionou-se água a 80°C, aumentando-se a temperatura da mistura soro/coágulo em 1°C a cada 3 minutos, até atingir 42°C. Atingido o ponto da massa, foi realizada a dessoragem, pré-prensagem e enformagem em formas retangulares de 0,5 kg, que foram encaminhadas para a prensagem. A prensagem se deu da seguinte forma: 1ª prensagem – 9 kg durante 30 minutos; 2ª prensagem – 12 kg por 30 minutos; 3ª prensagem – 15 kg por 2 horas; 4ª prensagem – 15 kg por 2 horas. Após a prensagem, os queijos foram salgados por imersão em salmoura 20% durante 12 horas e secos por 24 horas a 12°C. Depois de secos, os queijos foram embalados a vácuo em plástico termocolhível e armazenados a 12°C para maturação durante 54 dias.

#### **4.4. Procedimento de amostragem e análises realizadas**

Após agitação com misturador perfurado de aço inox higienizado, amostras representativas do leite cru de CCS baixa e alta foram coletadas dos latões e colocadas em frascos estéreis, destinados à realização das análises microbiológicas, e frascos higienizados, para as análises físico-químicas. O mesmo procedimento foi utilizado para coleta de amostras do leite pasteurizado.

O leite cru foi analisado quanto contagem de células somáticas (CCS) pH, acidez, gordura, densidade e extrato seco total. Após a pasteurização, os leites de CCS baixa e alta foram avaliados quanto ao pH, acidez, extrato seco total, gordura, proteína total e cinzas. O teor de lactose foi calculado por diferença.

Para as análises microbiológicas do leite cru e pasteurizado, uma alíquota de 10 ml do leite foi transferida para um frasco contendo 90 ml de solução de água peptonada 0,1%, obtendo-se assim a diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram feitas as diluições subseqüentes necessárias à realização das análises.

No leite cru foram realizadas contagens de bactérias mesófilas e microrganismos psicotróficos. Para o leite pasteurizado foram feitas contagens de bactérias mesófilas, coliformes totais e fecais e salmonela.

As determinações físico-químicas dos queijos foram feitas 2 dias após o processamento. Os queijos foram avaliados quanto ao pH, acidez, umidade, gordura, proteína total, cinzas e teor de sal. Umidade, pH e atividade de água ( $A_w$ ) foram também monitorados após 6, 12, 19, 35 e 54 dias de maturação. Para constituição de uma amostra representativa, um queijo foi randomicamente escolhido, triturado em multiprocessador e homogeneizado, para ser utilizado nas determinações analíticas. O mesmo procedimento de amostragem foi repetido para as determinações ao longo do tempo de maturação. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para realização das análises microbiológicas, os queijos foram aleatoriamente escolhidos após 6, 12, 19, 35 e 54 dias de maturação. Foram retiradas três fatias (com aproximadamente 1 cm de espessura) representativas de todo o queijo. As fatias foram picadas em pequenos cubos e estes foram devidamente homogeneizados. Pesou-se 25 g da amostra em saco para Stomacher e adicionou-se 225 ml de citrato de sódio 2%. A mistura foi homogeneizada por 60 segundos em Stomacher e imediatamente utilizada para as análises microbiológicas. A partir desta diluição foram preparadas as diluições subseqüentes necessárias para a análise. Todo material utilizado foi previamente esterilizado. As análises microbiológicas foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Para o acompanhamento da microbiota durante a maturação, após 6, 12, 19, 35 e 54 dias de maturação, os queijos foram analisados quanto às contagens de bactérias lácticas, psicrotóxicos, contagem total de bactérias, bolores e leveduras.

As análises de *Salmonella* em leite e as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* em queijo foram realizadas pelo Laboratório de Higiene do Departamento de Tecnologia de Alimentos – FEA/UNICAMP. A análise de *Salmonella* em leite foi feita um dia após o tratamento térmico do produto, e as análises de coliformes totais e fecais, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Listeria monocytogenes* foram realizadas após 6, 35 e 54 dias de armazenamento dos queijos.

#### **4.5. Metodologias para as determinações analíticas**

##### **4.5.1. Análises físico-químicas**

- **pH:** determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo o eletrodo diretamente nas amostras;
- **Densidade:** determinada utilizando termolactodensímetro;
- **Acidez titulável:** determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 (solução Dornic), em presença de indicador fenolftaleína, segundo a metodologia AOAC 947.05 (1995);
- **Extrato Seco Total:** determinado por secagem em estufa a 105 °C, de acordo com AOAC 925.23 (1995) para leite pasteurizado e através do disco de Ackermann para leite cru;
- **Gordura:** determinado pelo Método de Gerber para leite e queijo, de acordo com British Standard Institution (1989);
- **Proteína total em leite:** determinada pelo método de micro-Kjeldahl AOAC 991.20 (1995), utilizando o fator de correção 6,38;
- **Proteína total em queijo:** determinada pelo método de Kjeldahl conforme metodologia da AOAC 920.123 (1995), utilizando o fator de correção 6,38;

- **Cinzas:** determinado por incineração a 550°C, de acordo com AOAC 935.42 (1995);
- **Teor de Sal:** determinado pelo método de Volhard (Richardson, 1985);
- **Atividade de água:** determinada instrumentalmente utilizando determinador de atividade de água Decagon CXT-2 Aqualab.

#### 4.5.2. Análises microbiológicas

- **Bactérias lácticas:** foi feita contagem em MRS ágar, pelo método de plaqueamento em profundidade, incubando as placas a 32°C por 48 horas (APHA, 1992a);
- **Psicrotróficos:** contagem em ágar padrão (PCA), utilizando plaqueamento em superfície e incubação a 7°C por 10 dias (APHA, 1992a);
- **Contagem total de bactérias:** contagem pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando ágar padrão (PCA), incubado a 35°C por 48 horas (APHA, 1992b);
- **Bolores e leveduras:** contagem pelo método de plaqueamento em superfície, utilizando ágar batata dextrose (PDA) acidificado (pH 3,5), incubado a 25°C por 5 dias (APHA, 1992a);
- **Coliformes totais e fecais:** contagem pelo método do número mais provável (NMP) através das seguintes etapas: 1) Inoculação em Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) incubado por 48 horas a 35°C; 2) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VB) e incubação a 35°C por 48 horas; 3) Transferência de uma alçada dos tubos com produção de gás para Caldo E. coli (EC) e incubação em banho-maria 45,5°C por 24 horas (APHA, 1992b);
- **Staphylococcus coagulase positiva:** contagem em ágar Baird Parker (BP), pelo método de plaqueamento em superfície, incubando as placas a 35°C por 48 horas. A confirmação das colônias suspeitas foi feita através do teste de coloração de Gram e testes bioquímicos de catalase e coagulase (APHA, 2001);

- **Listeria monocytogenes:** 1) Enriquecimento primário em caldo LEB (Caldo para enriquecimento de Listeria) e incubação a 30°C; 2) Após 24 e 48 horas, inoculação do caldo LEB em caldo MFB (Caldo Fraser Modificado) e incubação a 35°C/24-48 horas; 3) Transferência de 1 alçada para ágar LPM (Ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactano) e para ágar Oxford (OXA); 4) Identificação das colônias através de coloração de Gram e pelos testes de catalase,  $\beta$ -hemólise em ágar sangue de cavalo, motilidade a 25°C em meio SIM e produção de ácido a partir da utilização de ramnose, manitol e xilose (Pagotto *et al.*, 2001);
- **Salmonella:** 1) Pré-enriquecimento em água peptonada tamponada e incubação a 35°C/18-24 horas; 2) Enriquecimento seletivo em Caldo Tetrionato (TT) e em Caldo RV (Rappaport-Vassiliadis), incubados a 35°C/18-24 horas e 42°C/18-24 horas, respectivamente; 3) Transferência de 1 alçada para Ágar HE (Hektoen Entérico), Ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato) e para Ágar Bismuto Sulfito (BS); 4) Identificação das colônias suspeitas em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (TSI) e em Ágar Lisina e Ferro (LIA) (APHA, 2001).

#### 4.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

Utilizou-se o experimento do tipo fatorial 2 x 5, em blocos completamente aleatorizados. O fator CCS teve 2 níveis de variação (alta e baixa) e o fator tempo, 5 níveis de variação (6, 12, 19, 35 e 54 dias de armazenamento). Os processamentos foram considerados como blocos (processamentos 1, 2, 3 e 4).

Para a avaliação da composição química dos queijos foi considerado apenas o efeito da CCS e dos processos (blocos). Esta avaliação foi feita através de Análise de Variância (ANOVA).

Para avaliação das características físico-químicas e microbiológicas ao longo do tempo de armazenamento, testaram-se, através de Análise de Variância, os efeitos independentes dos níveis de CCS, do tempo de armazenamento, bem

como a interação entre estes fatores. Após a análise de variância aplicaram-se os testes de Tukey de comparações múltiplas de médias, considerando o nível de significância de 5%.

#### **4.7. Análise Sensorial**

Os queijos obtidos do quinto processamento, fabricados a partir de leite de CCS baixa e alta foram submetidos à avaliação sensorial dos atributos firmeza, sabor e gosto residual utilizando-se a escala do ideal de nove pontos. A aceitação geral dos queijos foi avaliada através de escala hedônica estruturada de nove pontos. Para a realização da avaliação sensorial foram recrutados 50 provadores não treinados, aleatoriamente, para cada dia de análise.

Antes da avaliação sensorial, os queijos com CCS baixa e alta foram analisados quanto à composição centesimal (pH, acidez, umidade, gordura, proteína total, cinzas e teor de sal) e características microbiológicas (contagens de bactérias lácticas, psicotróficos, contagem total de bactérias, bolores e leveduras, coliformes totais e fecais, *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Listeria monocytogenes*) conforme descrito anteriormente.

Para a avaliação sensorial, os queijos tiveram a casca superficial removida e foram cortados em cubos de aproximadamente 2 cm de aresta. As amostras foram servidas a aproximadamente 7°C, em pratos plásticos codificados com números aleatórios de 3 dígitos. As amostras foram apresentadas monadicamente para a avaliação dos provadores, em cabines individuais, utilizando a ficha apresentada na Figura 4.3. Os provadores foram instruídos para provar cada amostra e avaliar a firmeza, sabor, gosto residual amargo e aceitação geral. Os queijos foram avaliados após 7, 21, 34, 48 e 61 dias de armazenamento.

Os resultados relativos à firmeza, sabor e gosto residual foram analisados da seguinte maneira: para cada dia de análise foi calculada a média das notas dos

50 provadores para cada queijo, que pode variar de -4 a +4. Assim, para cada dia de análise obteve-se um valor médio de notas para o queijo de CCS baixa e outro para o queijo de CCS alta. Com isto, foi construído um gráfico, representando o comportamento médio das notas para cada atributo durante os 5 dias de análise, onde o ponto zero representa o ideal.

O efeito da CCS (2 níveis de variação), do tempo de armazenamento (5 níveis de variação) e de suas interações sobre a avaliação da aceitação geral da amostra foi analisado por Análise de Variância (ANOVA), ao nível de significância de 5%, e teste de médias de Tukey.

**AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO PRATO**

Nome: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_  
e-mail: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

1) Você está recebendo uma amostra codificada de **QUEIJO PRATO**. Prove o queijo e indique na escala o quão ideal encontra-se a sua **FIRMEZA** (força necessária para romper o queijo na primeira mordida).

**AMOSTRA:** \_\_\_\_\_

- extremamente mais firme que o ideal
- muito mais firme que o ideal
- moderadamente mais firme que o ideal
- ligeiramente mais firme que o ideal
- firmeza ideal**
- ligeiramente menos firme que o ideal
- moderadamente menos firme que o ideal
- muito menos firme que o ideal
- extremamente menos firme que o ideal

Comentários: \_\_\_\_\_

2) Como você avalia o **SABOR** do queijo, em relação ao que você considera ideal.

- extremamente mais intenso que o ideal
- muito mais intenso que o ideal
- moderadamente mais intenso que o ideal
- ligeiramente mais intenso que o ideal
- sabor ideal**
- ligeiramente menos intenso que o ideal
- moderadamente menos intenso que o ideal
- muito menos intenso que o ideal
- extremamente menos intenso que o ideal

Comentários: \_\_\_\_\_

3) Como você avalia o **GOSTO RESIDUAL** (amargo), em relação ao que você considera ideal.

- extremamente mais amargo que o ideal
- muito mais amargo que o ideal
- moderadamente mais amargo que o ideal
- ligeiramente mais amargo que o ideal
- gosto amargo residual ideal**
- ligeiramente menos amargo que o ideal
- moderadamente menos amargo que o ideal
- muito menos amargo que o ideal
- extremamente menos amargo que o ideal

Comentários: \_\_\_\_\_

4) Agora, por favor, indique na escala abaixo o quanto você gostou ou desgostou **DE UM MODO GERAL** da amostra.

- 9 gostei extremamente
- 8 gostei muito
- 7 gostei moderadamente
- 6 gostei ligeiramente
- 5 não gostei nem desgostei
- 4 desgostei ligeiramente
- 3 desgostei moderadamente
- 2 desgostei muito
- 1 desgostei extremamente

Comentários: \_\_\_\_\_

**Figura 4.3:** Ficha utilizada para a avaliação sensorial dos queijos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. CCS e composição do leite cru e pasteurizado

As contagens de células somáticas do leite para os quatro primeiros processos são apresentadas na Tabela 5.1. Os leites de CCS baixa e alta apresentaram em média CCS < 100.000 cél/ml e > 700.000 cél/ml, respectivamente. As contagens de células somáticas relativas ao 4º processamento foram os valores médios das CCS do grupo de animais selecionados, para a obtenção dos leites de CCS baixa e alta, após ordenha individual (AnexoI).

Estes resultados refletem a obtenção de leite de animais com glândula mamária saudável (CCS baixa), onde as células somáticas são, possivelmente, células normais de descamação do epitélio mamário e, de animais com glândula mamária que apresentam mastite subclínica (CCS alta), nos quais as células somáticas são representadas principalmente por leucócitos (Auldist e Hubble, 1998; Brito, 2002).

**Tabela 5.1:** Contagem de células somáticas do leite utilizado nos processamentos.

<b>Processamento</b>	<b>CCS baixa</b>	<b>CCS alta</b>
1	62.000	559.000
2	67.000	1.041.500
3	99.000	682.500
4	114.860*	857.950*
<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>85.715 ± 25.420</b>	<b>785.238 ± 210.314</b>

\*Valores calculados com base na CCS dos animais selecionados após ordenha e análise individual do leite de cada animal.

O leite cru de CCS alta apresentou pH significativamente maior que o de CCS baixa. Acidez, gordura, densidade, extrato seco total, contagem total de

bactérias e de psicotróficos não foram afetados pela contagem de células somáticas (Tabela 5.2). A contagem total de bactérias dos leites com CCS baixa e alta encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos na IN 51/2002 (Brasil, 2002) para leite cru refrigerado, que é no máximo  $10^6$  UFC/ml. A contagem de psicotróficos do leite cru representou aproximadamente 39 e 45% da contagem total para os leites de CCS baixa e alta.

Observa-se, na Tabela 5.2, que a contagem total de bactérias do leite de CCS alta é aproximadamente 90% menor que do leite de CCS baixa. O mesmo comportamento pode ser observado para a contagem de psicotróficos, que é aproximadamente 65% menor no leite com CCS alta. Segundo Sordillo e Streicher (2002), é possível que fatores antimicrobianos produzidos pelos leucócitos e liberados no leite pelo animal, em resposta ao processo infeccioso, sejam responsáveis pela inibição do crescimento dos microrganismos no leite de CCS alta.

**Tabela 5.2:** Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru de CCS baixa e alta (n=4).

<b>Características</b>	<b>CCS baixa</b>	<b>CCS alta</b>
pH	$6,77 \pm 0,03^b$	$6,88 \pm 0,05^a$
Acidez (°D)	$17,4 \pm 0,7^a$	$16 \pm 1^a$
Gordura (%)	$3,3 \pm 0,6^a$	$3,2 \pm 0,5^a$
Densidade (g/ml)	$1,031 \pm 0,001^a$	$1,0301 \pm 0,0008^a$
EST (%)	$11,9 \pm 0,7^a$	$11,6 \pm 0,7^a$
Contagem Total (UFC/ml)	$7,08 \times 10^{4a}$	$3,72 \times 10^{4a}$
Psicotróficos (UFC/ml)	$2,75 \times 10^{4a}$	$1,62 \times 10^{4a}$

<sup>a,b</sup> Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

Observa-se na Tabela 5.3 que o leite de CCS alta apresentou maior pH e menor acidez que o leite de CCS baixa. Este resultado é condizente com estudos que reportaram o aumento do pH em leites mastíticos (Auldish e Hubble, 1998; Klei

*et al.*, 1998; Munro, Grieve e Kitchen, 1984). As demais características físico-químicas não foram afetadas pela contagem de células somáticas. Nestes mesmos níveis de células somáticas, O'Brien *et al.* (2001) também não encontraram diferença significativa nas porcentagens de gordura, lactose e proteína total de leites de CCS baixa e alta.

O tratamento térmico (68°C/2min) reduziu em 2 ciclos logarítmicos a contagem total de bactérias do leite (Tabelas 5.2 e 5.3). Os leites com CCS baixa e alta atingiram os padrões de qualidade microbiológica estabelecidos pela IN 51/2002 (Brasil, 2002) para leite pasteurizado que são, contagem total de bactérias máxima de  $8,0 \times 10^4$  UFC/ml, contagem de coliformes a 35°C < 0,3 NMP/ml e ausência de salmonela.

**Tabela 5.3:** Características físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado de CCS baixa e alta (n=4).

Características	CCS baixa	CCS alta
pH	6,77 ± 0,03 <sup>b</sup>	6,85 ± 0,04 <sup>a</sup>
Acidez (°D)	17,5 ± 0,7 <sup>a</sup>	16,2 ± 0,6 <sup>b</sup>
Gordura (%)	3,2 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,5 <sup>a</sup>
EST (%)	11,1 ± 0,6 <sup>a</sup>	10,7 ± 0,4 <sup>a</sup>
Proteína (%)	3,2 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,3 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	0,68 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,03 <sup>a</sup>
Lactose* (%)	4,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
Contagem Total (UFC/ml)	3,89 x 10 <sup>2a</sup>	3,54 x 10 <sup>2a</sup>
Coliformes totais (NMP/ml)	< 0,3	< 0,3
Coliformes fecais (NMP/ml)	< 0,3	< 0,3
Salmonela	Ausência em 25 ml	Ausência em 25 ml

<sup>a,b</sup> Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

\*Calculado por diferença

## 5.2. Composição dos queijos

A contagem de células somáticas não afetou significativamente a composição média dos queijos, com exceção do teor de umidade que foi maior nos queijos de CCS alta (Tabela 5.4). A obtenção de queijos com maior umidade, quando se utilizou leite com CCS alta, foi também observada por outros autores para queijo Prato (Arcuri *et al.*, 1990; Mazal, 2005); Cottage (Klei *et al.*, 1998) e Cheddar (Grandisson e Ford, 1986; Politis e NG-Kwai-Hang, 1988).

**Tabela 5.4:** Características físico-químicas dos queijos fabricados a partir de leite de CCS baixa e alta, após 2 dias de fabricação (n=4).

Características	CCS baixa	CCS alta
pH	5,17 ± 0,05 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,05 <sup>a</sup>
Acidez (% ac. láctico)	0,69 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,69 ± 0,09 <sup>a</sup>
Umidade (%)	44 ± 2 <sup>b</sup>	47 ± 3 <sup>a</sup>
Gordura (%)	29 ± 3 <sup>a</sup>	26 ± 3 <sup>a</sup>
Proteína (%)	23 ± 2 <sup>a</sup>	22 ± 2 <sup>a</sup>
Cinzas (%)	3,9 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,0 ± 0,1 <sup>a</sup>
Teor de Sal (%)	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>	1,7 ± 0,2 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

A maior umidade observada em queijos de CCS alta pode ser decorrente do maior pH deste leite. O aumento do pH do leite retarda a ação da renina, aumentando o tempo de coagulação e proporcionando a formação de um coágulo mais fraco e úmido (Fox *et al.*, 2000). Arcuri *et al.* (1990) também observaram maior teor de umidade em queijo Prato fabricado a partir de leite com CCS alta, considerado como tendo CCS > 500.000 cél/ml pelos autores.

### 5.3. Efeito da CCS e do tempo de armazenamento sobre as características dos queijos

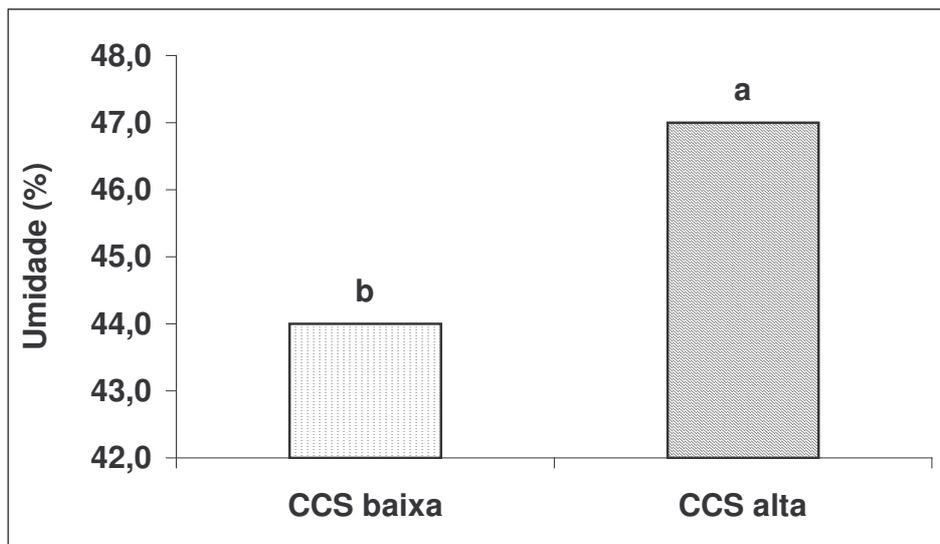
#### 5.3.1. Características físico-químicas

Observa-se na Tabela 5.5 que somente a umidade dos queijos foi significativamente afetada pela CCS do leite. O tempo de armazenamento afetou o pH e Aw, e a interação CCS x tempo de armazenamento não afetou nenhum dos parâmetros avaliados.

**Tabela 5.5:** Análise de Variância para pH, Aw e umidade dos queijos durante o período de armazenamento (n=4).

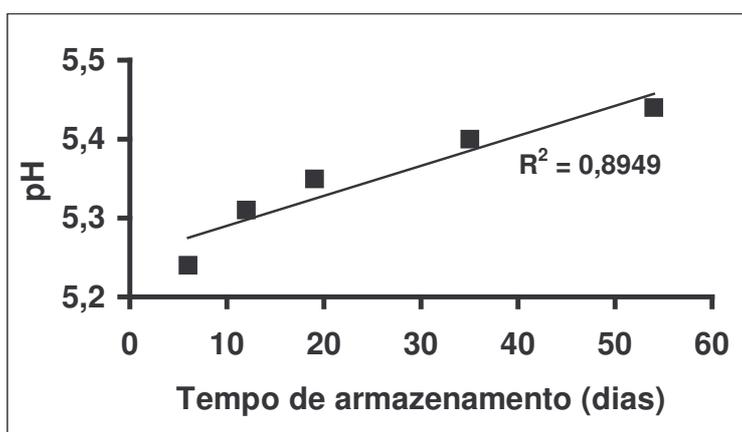
Fator de variação	GL	pH		Aw		Umidade	
		QM	P	QM	P	QM	P
CCS	1	0,0168	0,0626	< 0,0001	0,3932	114,1764	< 0,0001
Tempo	4	0,0463	< 0,0001	0,0002	< 0,0001	0,0391	0,9954
CCS x tempo	4	0,0014	0,8728	< 0,0001	0,8131	0,0670	0,9871
Resíduo	27	0,0045	----	< 0,0001	----	0,8143	----

Os queijos com CCS alta apresentaram maior umidade que os queijos com CCS baixa (Figura 5.1). O pH aumentou e a Aw diminuiu durante o período de armazenamento (Figuras 5.2 e 5.3). O aumento do pH durante a maturação é devido à proteólise, com conseqüente produção de amônia a partir de aminoácidos (Fox *et al.*, 2000).

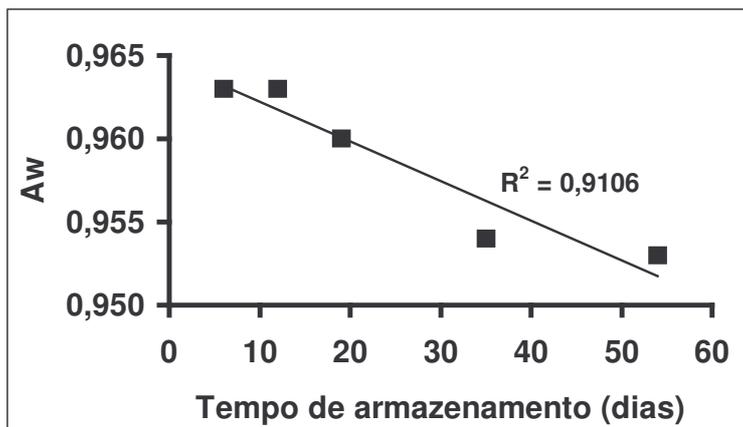


**Figura 5.1:** Média da umidade dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento.

Os queijos foram embalados a vácuo e a umidade permaneceu constante durante o armazenamento. Assim, a diminuição na  $A_w$ , que foi observada neste experimento, ocorreu, possivelmente, devido à dissolução do sal na umidade e pela hidrólise de proteínas em peptídeos e aminoácidos, e triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. Para cada ligação peptídica ou éster hidrolisada, uma molécula de água é adicionada (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2000).



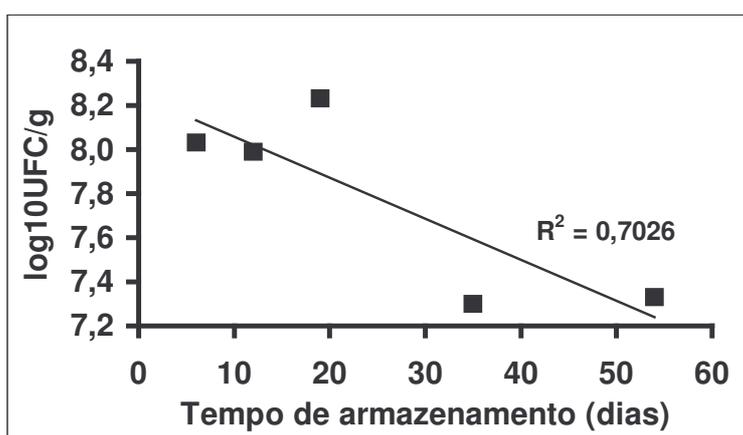
**Figura 5.2:** Comportamento do pH dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento ( $y = 0,0038x + 5,2523$ ).



**Figura 5.3:** Comportamento da Aw dos queijos de CCS baixa e alta ao longo do tempo de armazenamento ( $y = -0,0002x + 0,9646$ ).

### 5.3.2. Características microbiológicas

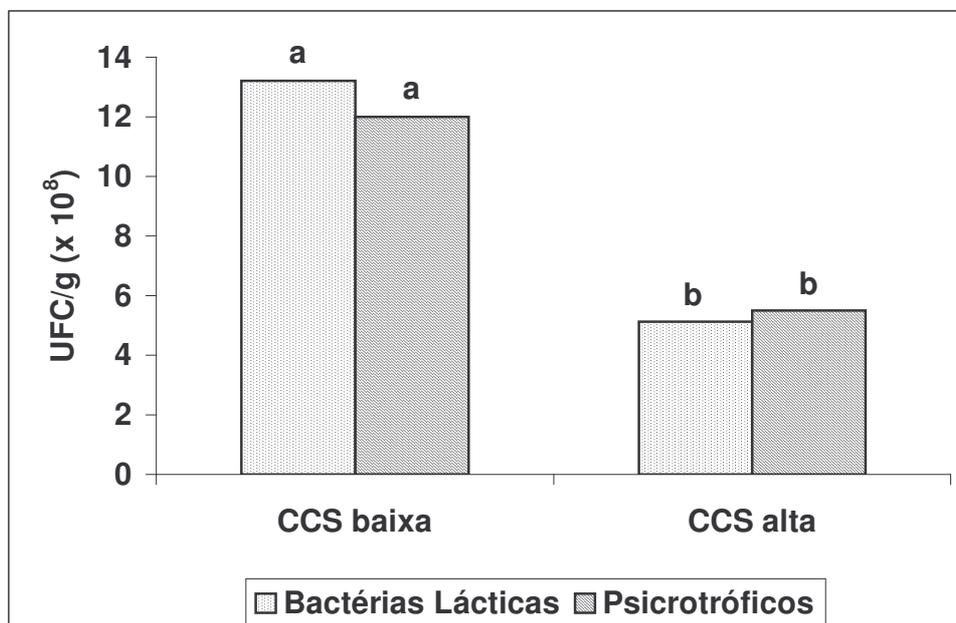
A contagem total de bactérias não foi afetada pela CCS e nem pela interação CCS x tempo de armazenamento (Tabela 5.6). Entretanto, ela foi significativamente afetada pelo tempo, e diminuiu 1 ciclo logarítmico durante o armazenamento (Figura 5.4).



**Figura 5.4:** Comportamento da contagem total de bactérias em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento ( $y = -0,0186x + 8,2447$ ).

Como neste trabalho, outros autores também observaram a diminuição da contagem total de bactérias durante a maturação de diferentes queijos. Após 63 dias de maturação do queijo Canestrato Pugliese, Albenzio *et al.* (2001) observaram a redução de 1 ciclo logarítmico na contagem total de bactérias. Trabalhando com queijo Prato, Valle *et al.* (1992) observaram declínio da população de mesófilos de  $3,9 \times 10^8$  UFC/g para  $3,3 \times 10^6$  UFC/g após 2 meses de maturação. Resultados semelhantes foram encontrados por Gobetti *et al.* (1997) em queijo Taleggio. Os autores observaram a diminuição da contagem total de bactérias em 3 ciclos logarítmicos após 42 dias de maturação.

Em relação aos grupos específicos de microrganismos avaliados, verificou-se que a CCS afetou as contagens de bactérias lácticas e de psicotróficos nos queijos (Tabela 5.6). Observa-se na Figura 5.5 que queijos com CCS baixa apresentaram, em média, maior contagem de bactérias lácticas e de psicotróficos.

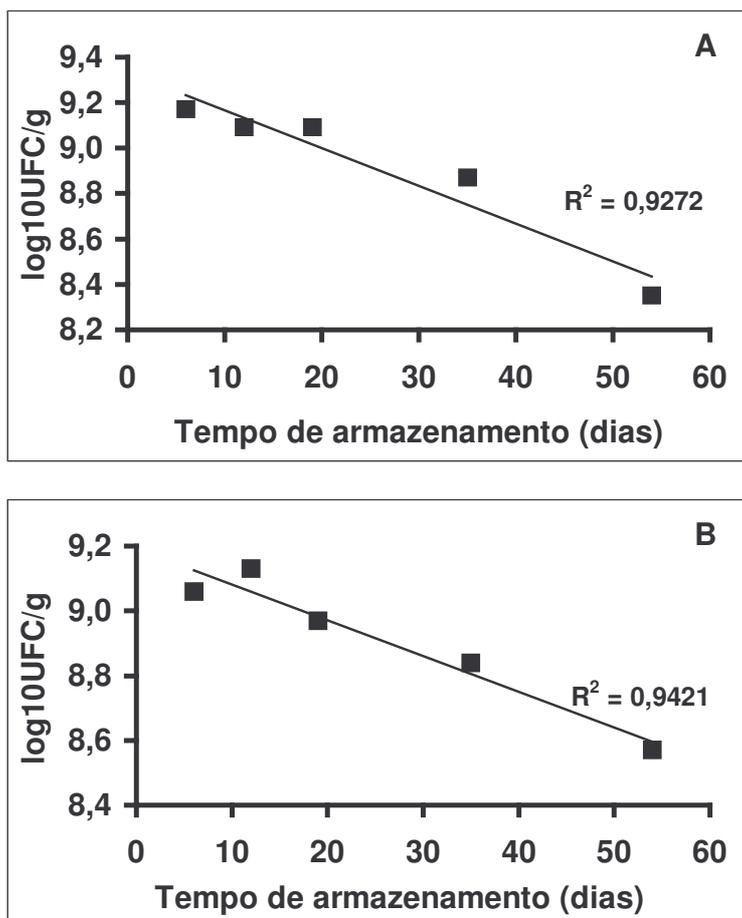


**Figura 5.5:** Média das contagens de bactérias lácticas e psicotróficos em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento.

**Tabela 5.6:** Análise de variância para contagem total, bactérias lácticas, bolores e leveduras e psicrotróficos dos queijos durante o período de armazenamento (n=4).

Fator de variação	Contagem Total			Bactérias Lácticas		Bolores e Leveduras		Psicrotróficos	
	GL	QM	P	QM	P	QM	P	QM	P
CCS	1	0,6786	0,2521	1,6892	< 0,0001	1,3396	0,1511	1,1391	0,0044
Tempo	4	1,4935	0,0354	0,8963	< 0,0001	3,4905	0,0019	0,3952	0,0240
CCS x tempo	4	0,0740	0,9617	0,1674	0,1126	0,3304	0,7088	0,1891	0,2032
Resíduo	27	0,4955	----	0,0808	----	0,6137	----	0,1182	----

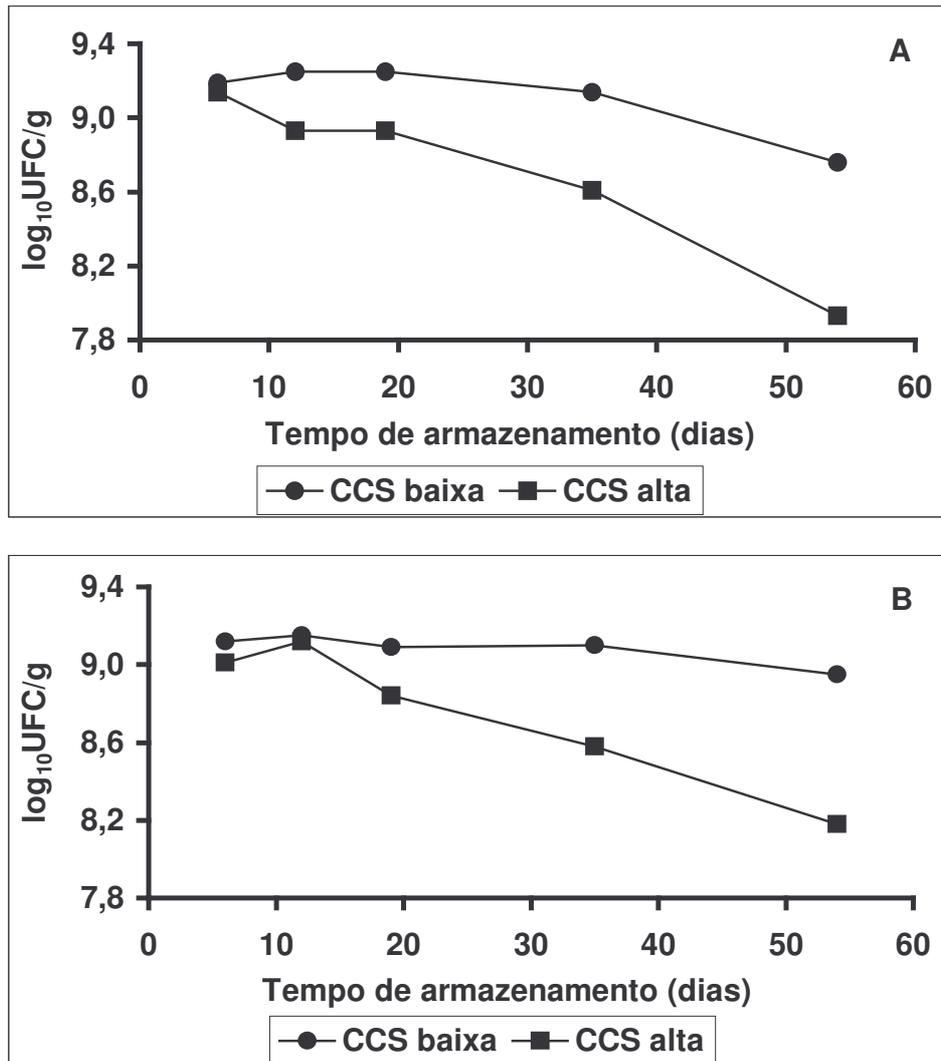
Da mesma forma que para a contagem total de bactérias, o tempo também afetou as contagens de bactérias lácticas e psicotróficos, sendo que estas diminuíram significativamente ao longo do período de armazenamento (Figura 5.6).



**Figura 5.6:** (A) Comportamento da contagem de bactérias lácticas ( $y = -0,0166x + 9,3322$ ) e (B) de psicotróficos ( $y = -0,011x + 9,1922$ ), durante o período de armazenamento.

Embora a interação CCS x tempo de armazenamento não tenha afetado significativamente as contagens de bactérias lácticas e psicotróficos, observa-se na Figura 5.7 que queijos fabricados a partir de leite com CCS baixa sempre apresentaram maiores contagens destes microrganismos, e assim permaneceram

durante todo o período de armazenamento. Queijos fabricados a partir de leite de CCS baixa tiveram uma redução de 1 ciclo logarítmico na contagem de bactérias lácticas, enquanto os queijos de CCS alta apresentaram uma redução de 2 ciclos logarítmicos durante o período de armazenamento.



**Figura 5.7:** (A) Contagem de bactérias lácticas e (B) Contagem de psicrotróficos, em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento.

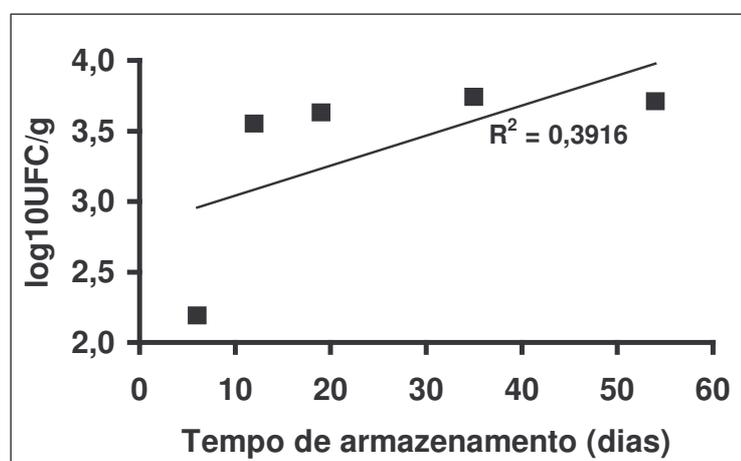
No leite cru de CCS alta, a presença de fatores antimicrobianos, produzidos pelos leucócitos, pode inibir o desenvolvimento dos microrganismos presentes após a ordenha (Sordillo e Streicher, 2002). Estes mesmos fatores antimicrobianos também podem ser responsáveis pela menor contagem e pelo comportamento das bactérias lácticas nos queijos produzidos com este leite. Segundo Lindmark-Månsson *et al.* (2000) fatores antimicrobianos podem prolongar o tempo de fermentação em leite de CCS alta em 2 a 4 horas, retardando o abaixamento do pH e, conseqüentemente, influenciando negativamente na qualidade dos produtos lácteos fermentados.

Outra hipótese para a menor contagem de bactérias lácticas em queijos fabricados com leite de CCS alta é a fagocitose das células da cultura pelos leucócitos. Okello-Uma e Marshall (1986) observaram em microscópio a fagocitose de células de *Lactobacillus acidophilus* por leucócitos em leite de CCS alta utilizado para produção de leite fermentado. Os autores concluíram que o microrganismo não produziu ácido eficientemente devido à presença de fatores antimicrobianos que aumentaram a atividade fagocítica dos leucócitos polimorfonucleados presentes no leite de CCS alta. Arcuri *et al.* (1990) também encontraram redução da atividade ácido-láctica da cultura em leite de CCS alta, atribuindo o efeito à fagocitose das bactérias do fermento e a fatores antimicrobianos presente neste leite.

Neste experimento, a redução na contagem de psicotróficos foi de 1 ciclo logarítmico. A diminuição de microrganismos psicotróficos ao longo da maturação também foi observada por Arenas *et al.* (2004) em queijo Genestoso. Os microrganismos psicotróficos são provenientes da contaminação do leite através de equipamentos de ordenha, água, solo e ar e, produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes, que podem influenciar na qualidade dos produtos lácteos (Santana *et al.*, 2001; Santos e Fonseca, 2001). Em queijos, sua presença é atribuída à contaminação durante o processamento podendo produzir defeitos de qualidade como sabor amargo (Sørhaug e Stepaniak, 1997).

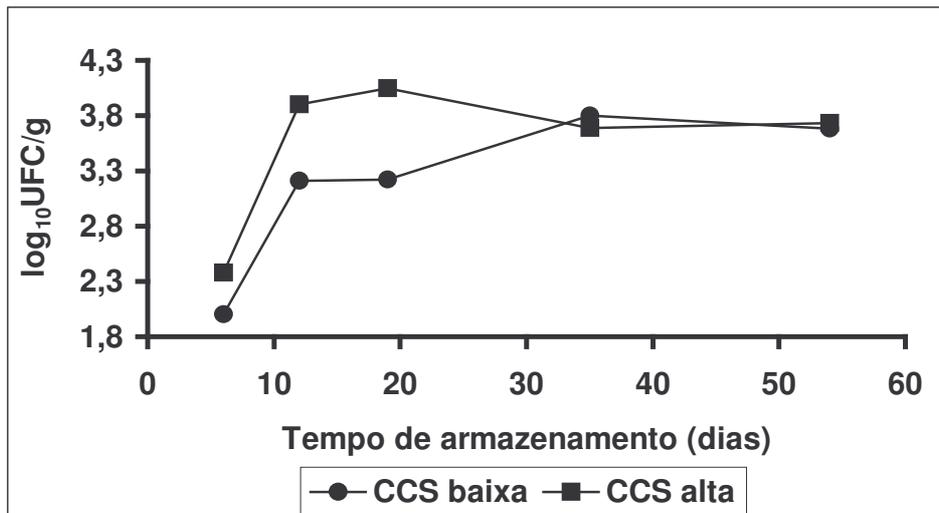
A maior contagem de psicotróficos nos queijos de CCS baixa sugere que estes microrganismos contribuem com maior produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas neste tipo de queijo, o que pode favorecer o processo de maturação e, conseqüentemente, o desenvolvimento de sabor e textura do produto.

A contagem de bolores e leveduras não foi afetada pela CCS (Tabela 5.6). Entretanto, a contagem destes microrganismos aumentou significativamente durante o período de armazenamento (Figura 5.8).



**Figura 5.8:** Comportamento da contagem de bolores e leveduras, ao longo do período de armazenamento ( $y = 0,0213x + 2,8274$ ).

Como para bactérias lácticas e psicotróficos, a interação CCS x tempo de armazenamento também não afetou significativamente a contagem de bolores e leveduras. Porém, observa-se na Figura 5.9 que até o 35º dia de maturação os queijos com CCS alta apresentaram maior número de bolores e leveduras. Por possuírem atividade proteolítica e lipolítica, estes microrganismos podem contribuir para o desenvolvimento de sabor durante a maturação, entretanto, também podem causar a deterioração do produto (Arenas *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2000; Manolopoulou *et al.*, 2003; Marino, Maifreni e Rondinini, 2003; Viljoen, 2001).



**Figura 5.9:** Contagem de bolores e leveduras, em queijos de CCS baixa e alta, durante o período de armazenamento.

Em resumo, quando se compara os grupos específicos de microrganismos avaliados observa-se: os queijos com CCS baixa apresentaram maior número de bactérias lácticas e psicotróficos e menor número de bolores e leveduras; os queijos de CCS alta apresentaram menor número de bactérias lácticas e psicotróficos e maior número de bolores e leveduras. Estes 3 grupos de microrganismos contribuem com proteases e lipases que participam do processo de maturação. As diferenças observadas neste experimento podem resultar em características de sabor e textura diferentes para os queijos de CCS baixa e alta.

Com relação ao aspecto de segurança do produto, controlado através das contagens de *Salmonella*, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Listeria monocytogenes* e à qualidade higiênica dos processos, controlada através das contagens de coliformes totais e fecais, observa-se na Tabela 5.7 que os queijos obtidos de leite com CCS baixa e alta atendem ao padrão estabelecido pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos – RDC Nº 12/2001 (Brasil, 2001). De acordo com este regulamento, queijos de média umidade como o Prato devem apresentar ausência de *Salmonella* e *Listeria*

*monocytogenes* em 25g do produto e contagens máximas de  $10^3$ /g de produto para coliformes fecais e *Staphylococcus* coagulase positiva.

O queijo de CCS alta do Processo 2, diferente dos demais, apresentou uma contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva de  $7,5 \times 10^2$  UFC/g no primeiro dia de análise, mas ainda atendendo ao padrão estabelecido na legislação. Entretanto, esta contagem diminuiu ao longo da maturação, igualando-se aos demais resultados.

Marino, Maifreni e Rondinini (2003) encontraram baixos níveis de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo Montasio, com a diminuição desses microrganismos ao longo do tempo de maturação. Os autores atribuem este comportamento ao efeito inibitório do baixo pH no produto. Resultados semelhantes foram observados por Albenzio *et al.* (2001) em queijo Canestrato Pugliese. Manolopoulou *et al.* (2003) relata não ter detectado *Salmonella*, *Listeria* sp. e *S. aureus* durante todo o período de maturação do queijo Feta.

Os resultados para as contagens de coliformes totais e fecais (Tabela 5.7) indicam pequenas variações entre amostras. Estas contagens diminuíram rapidamente durante a maturação, provavelmente devido ao ambiente hostil do produto, que apresenta baixo pH, falta de oxigênio e de carboidrato fermentável.

As bactérias lácticas adicionadas na forma de fermento são, em geral, mais resistentes ao pH que a maioria dos patógenos e contaminantes. Desta forma, a utilização de culturas lácticas no processo de fabricação do queijo auxilia na garantia da segurança microbiológica do produto, inibindo o desenvolvimento de coliformes e demais patógenos que possam estar presentes no queijo. Diversos autores relataram a rápida diminuição da contagem de coliformes totais e fecais em diferentes queijos, como Parmigiano Reggiano (Coppola *et al.*, 2000), Canestrato Pugliese (Albenzio *et al.*, 2001), Feta (Manolopoulou *et al.*, 2003) e Montasio (Marino, Maifreni e Rondinini, 2003).

**Tabela 5.7:** Contagens de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes totais e fecais dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento.

Processo	Tempo de maturação (dias)	Listeria (UFC/25g)		Salmonella (UFC/25g)		Estafilococos (UFC/g)		Coliformes Totais (NMP/g)		Coliformes Fecais (NMP/g)	
		Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo	Queijo
		CCS	CCS	CCS	CCS	CCS	CCS	CCS	CCS	CCS	CCS
		Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta	Baixa	Alta
1	6	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	≥1100	≥1100	15	< 3
	35	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	460	93	< 3	< 3
	54	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	93	23	< 3	< 3
2	6	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	7,5x10 <sup>2</sup>	≥1100	≥1100	23	< 3
	35	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	≥1100	1100	< 3	< 3
	54	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	240	460	< 3	< 3
3	6	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	1100	≥1100	43	7
	35	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	1100	460	< 3	< 3
	54	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	1100	240	< 3	< 3
4	6	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	≥1100	≥1100	4	23
	35	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	≥1100	93	9	9
	54	ausência	ausência	ausência	ausência	< 1x10 <sup>2</sup>	< 1x10 <sup>2</sup>	240	75	9	9

## 5.4. Análise Sensorial

### 5.4.1. Caracterização dos queijos

Os queijos de CCS baixa e alta utilizados na realização da análise sensorial apresentaram composição típica de queijo Prato e foram semelhantes aos avaliados nos processamentos anteriores quanto às características físico-químicas (Tabela 5.8) e microbiológicas (Tabela 5.9). Os queijos de CCS baixa deste processamento, como nos anteriores, apresentaram maior contagem de bactérias lácticas e de psicrotróficos que os queijos de CCS alta. Além disso, estes queijos também atendem aos padrões microbiológicos de segurança alimentar que estabelecem ausência de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*, contagem máxima de  $10^3$  NMP/g para coliformes fecais e  $10^3$  UFC/g para estafilococos (Brasil, 2001).

**Tabela 5.8:** Características físico-químicas, após 2 dias de fabricação, dos queijos de CCS baixa e alta (n=1).

Características	CCS baixa	CCS alta
pH	5,27	5,21
Acidez (% ac. láctico)	0,54	0,64
Umidade (%)	41,4	43,6
Gordura (%)	31,5	29,8
Proteína (%)	21,7	22,0
Cinzas (%)	3,63	3,82
Teor de Sal (%)	1,38	1,47

**Tabela 5.9:** Características microbiológicas, após 7 dias de fabricação, dos queijos de CCS baixa e alta (n=1).

<b>Características</b>	<b>CCS baixa</b>	<b>CCS alta</b>
Contagem total (UFC/g)	$2,95 \times 10^8$	$8,95 \times 10^6$
Bactérias Lácticas (UFC/g)	$1,74 \times 10^9$	$7,65 \times 10^8$
Bolores e Leveduras (UFC/g)	$5,30 \times 10^3$	$3,50 \times 10^4$
Psicrotróficos (UFC/g)	$1,73 \times 10^9$	$7,50 \times 10^8$
Estafilococos (UFC/g)	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
<i>Listeria monocytogenes</i>	Aus. em 25g	Aus. em 25g
<i>Salmonella</i>	Aus. em 25g	Aus. em 25g
Coliformes Totais (NMP/g)	$> 1100$	$> 1100$
Coliformes Fecais (NMP/g)	$< 3$	4

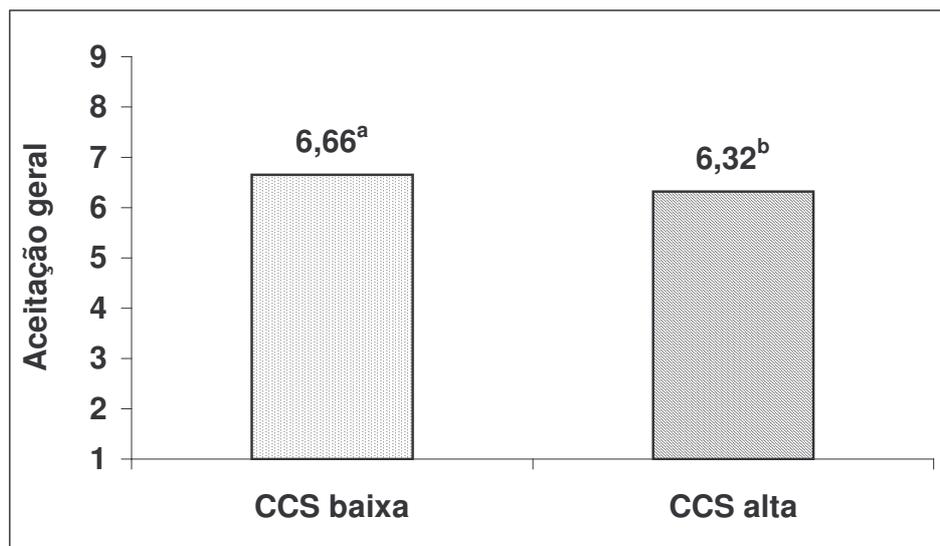
#### 5.4.2. Avaliação sensorial dos queijos

A aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta foi avaliada através de escala hedônica de 9 pontos após 7, 21, 34, 48 e 61 dias de armazenamento. Os resultados indicaram que a contagem de células somáticas, o tempo de armazenamento, bem como a interação dos dois fatores, afetaram significativamente a aceitação geral dos queijos (Tabela 5.10).

**Tabela 5.10:** Análise de variância para aceitação geral.

<b>Fonte de Variação</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>P</b>
<b>CCS</b>	1	14,45	0,0151
<b>Tempo</b>	4	16,07	$< 0,0001$
<b>CCS x tempo</b>	4	30,64	$< 0,0001$
<b>Resíduo</b>	490	2,43	-----

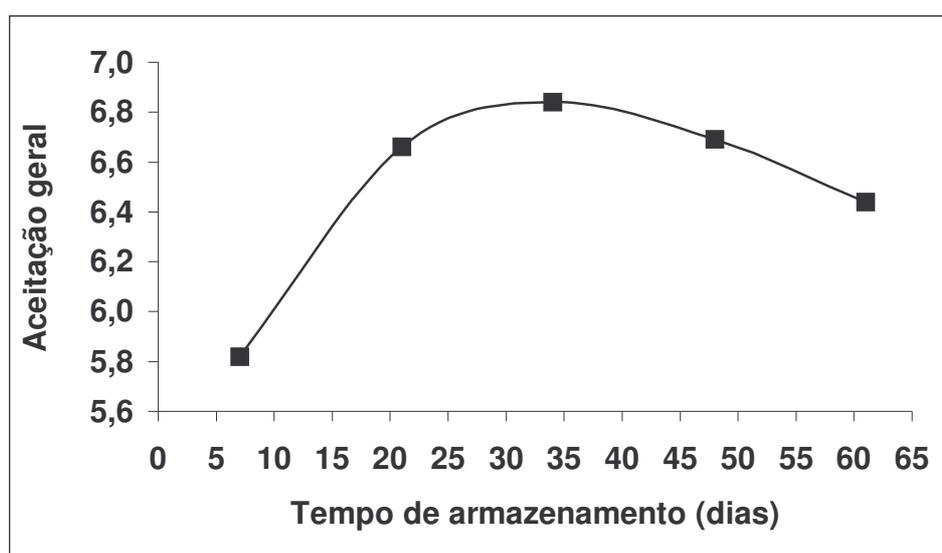
Os queijos de CCS alta apresentaram médias significativamente menores, indicando sua menor aceitação pelo consumidor quando comparado ao queijo de CCS baixa (Figura 5.10). As notas obtidas para a aceitação geral dos dois queijos encontraram-se entre as faixas de gostei ligeiramente (nota 6) e gostei moderadamente (nota 7).



**Figura 5.10:** Média de aceitação dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente.

Quando se avaliou o efeito do tempo de armazenamento sobre a aceitação geral dos queijos, independente da CCS (Figura 5.11), observou-se que a aceitação do produto refletiu a evolução da maturação dos queijos. Observa-se na Figura 5.11 que até 20 dias após o processamento a aceitação geral dos produtos aumenta progressivamente, chegando ao seu ápice de qualidade quando o produto está pronto para ser colocado no mercado, já que o queijo Prato deve ser maturado por no mínimo 25 dias (Brasil, 1997). Após 35 dias de fabricação, a aceitação geral dos queijos começa a diminuir, indicando a perda de qualidade do produto. Esta tendência se acentuou 48 dias após a fabricação dos queijos.

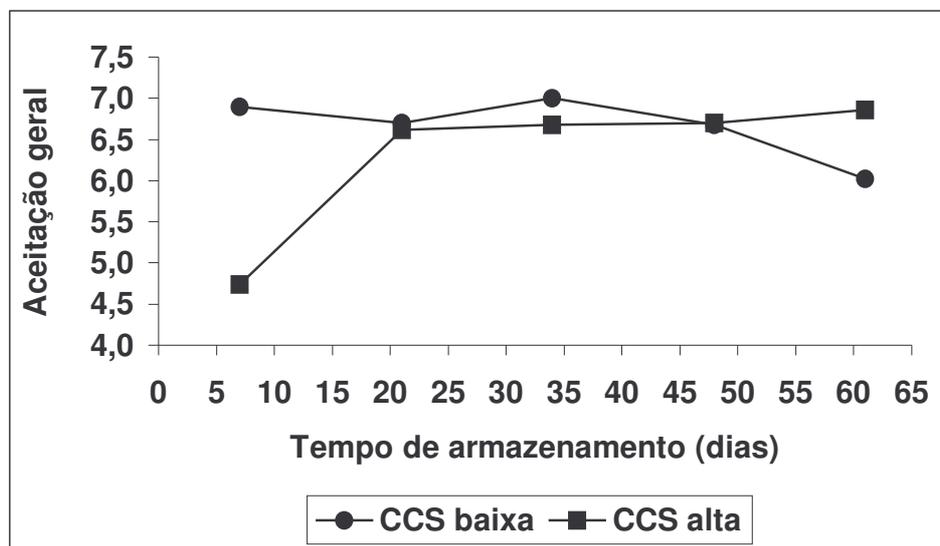
Este comportamento reflete o desenvolvimento esperado da maturação de queijos. Após a fabricação, o queijo é insípido e de textura borrachenta. A hidrólise da  $\alpha_{s1}$ -caseína pelo coalho residual retido na massa e pela plasmina promove a mudança da textura na matriz protéica, proporcionando o amaciamento do queijo. Os produtos desta hidrólise são pequenos peptídeos e aminoácidos, precursores dos compostos que contribuirão para o sabor do produto (Fox *et al.*, 2000; McSweeney, 2004).



**Figura 5.11:** Evolução média da aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta durante 61 dias de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente.

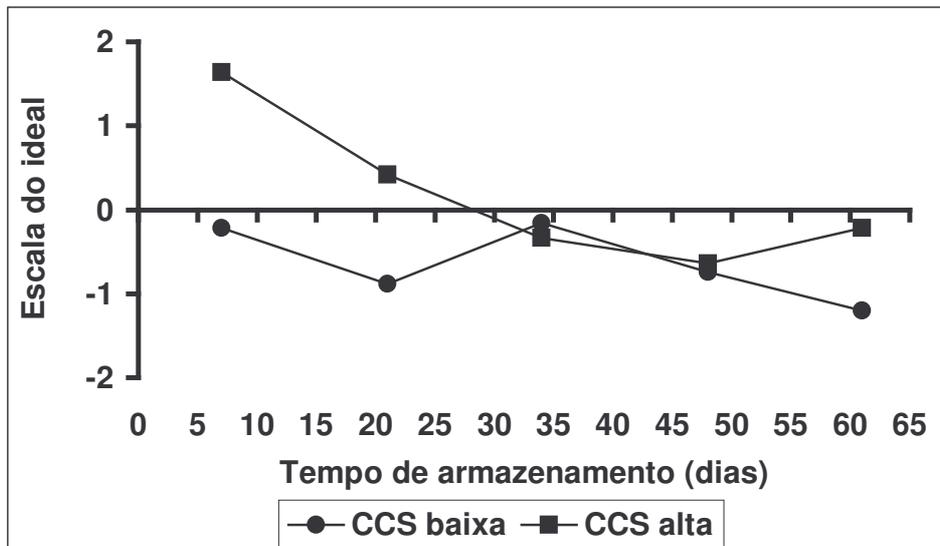
A avaliação da aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta durante o armazenamento é apresentada na Figura 5.12. Observa-se que no período de maior possibilidade de consumo do produto, 25 a 50 dias após a fabricação, os queijos apresentaram aceitação geral muito semelhante. Entretanto, antes e após este período a aceitação dos produtos foi diferente. A avaliação sensorial dos atributos firmeza, sabor e gosto residual amargo (Figuras 5.13, 5.14 e 5.15), através da escala do ideal ao longo do tempo de armazenamento, pode dar

indicações sobre a avaliação da aceitação geral do produto antes do 20º e após o 50º dia de fabricação.

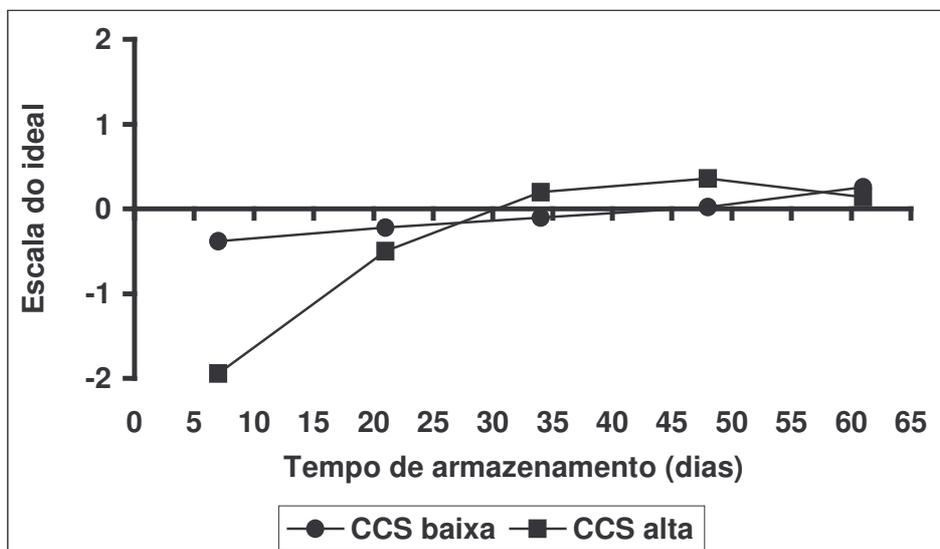


**Figura 5.12:** Aceitação geral dos queijos de CCS baixa e alta durante o período de armazenamento. (1) Desgostei extremamente; (5) Nem gostei, nem desgostei; (9) Gostei extremamente.

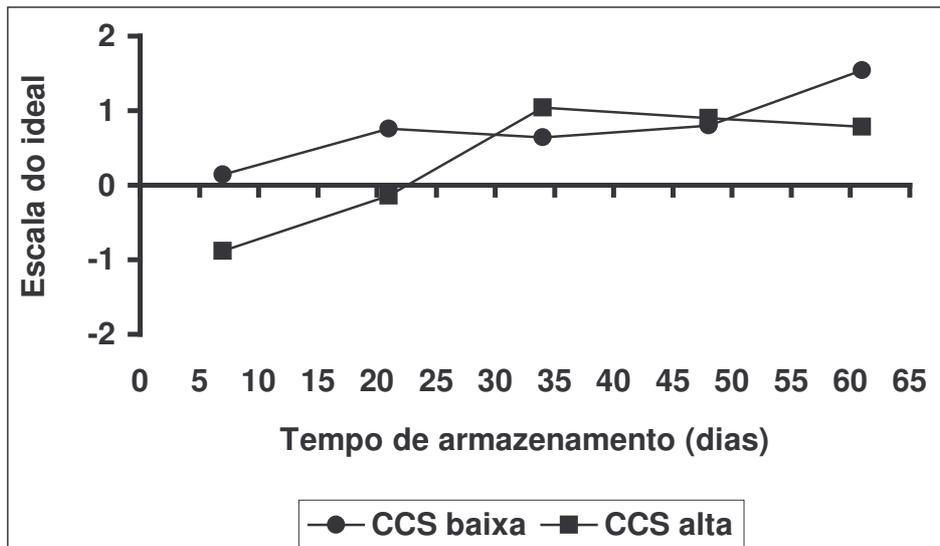
Observa-se nas Figuras 5.13, 5.14 e 5.15 que no período de 20 a 50 dias após a fabricação os provadores atribuíram valores muito próximos para os atributos firmeza, sabor e gosto residual amargo dos queijos. Estes valores foram especialmente próximos após 34 dias de fabricação, indicando que os queijos de CCS baixa e alta eram muito semelhantes quanto a estes atributos. Entretanto, antes de 20 dias de armazenamento, os queijos de CCS alta apresentaram-se mais firmes e com sabor menos intenso que o ideal, enquanto os queijos de CCS baixa apresentaram firmeza e sabor muito próximos ao ideal (zero). Este fato, e possivelmente a comparação inevitável entre as duas amostras feita pelos provadores não treinados no momento da avaliação sensorial, podem ser responsáveis pela aceitação geral tão diferente entre os queijos de CCS baixa (nota 6,9) e alta (nota 4,74) antes de 20 dias de armazenamento (Figura 5.12).



**Figura 5.13:** Avaliação sensorial da firmeza durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais firme que o ideal; (0) Firmeza ideal; (-4) Extremamente menos firme que o ideal.



**Figura 5.14:** Avaliação sensorial do sabor durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais intenso que o ideal; (0) Sabor ideal; (-4) Extremamente menos intenso que o ideal.



**Figura 5.15:** Avaliação sensorial do gosto residual (amargo) durante o período de armazenamento utilizando escala do ideal. (4) Extremamente mais amargo que o ideal; (0) Gosto amargo residual ideal; (-4) Extremamente menos amargo que o ideal.

Após 50 dias de fabricação, observa-se que o queijo com CCS baixa teve uma redução na sua aceitação, não observada para o queijo com CCS alta (Figura 5.12). A menor aceitação geral do queijo com CCS baixa após 50 dias de fabricação se deve, possivelmente, à menor firmeza (Figura 5.13) e ao maior gosto residual amargo (Figura 5.15) percebido pelos provadores na avaliação destes atributos pela escala do ideal neste período.

## **6. CONCLUSÕES**

As características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e pasteurizado não foram afetadas pela CCS, exceto o pH que foi significativamente maior nos leites de CCS alta.

Os queijos de CCS alta apresentaram maior umidade quando comparados aos queijos de CCS baixa. As demais características físico-químicas dos queijos não foram influenciadas pela CCS.

Os queijos de CCS baixa apresentaram maior contagem de bactérias lácticas e psicrotóxicos, as quais diminuíram ao longo do tempo para ambos os produtos.

A contagem total de bactérias diminuiu ao longo do tempo de maturação, enquanto a contagem de bolores e leveduras aumentou. A CCS não afetou a contagem total de bactérias e de bolores e leveduras.

A avaliação sensorial indicou que os queijos de CCS baixa apresentaram maior aceitação geral por parte dos provadores.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBENZIO, M.; CORBO, M. R.; REHMAN, S. U.; FOX, P. F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1/2, p. 35-48, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard methods for the examination of dairy products**. 16.ed. Washington, 1992a.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3.ed. Washington, 1992b.

ARCURI, E. F.; VARGAS, O. L.; SOUZA, H. M. de.; SANTOS, E. C. dos.; CARVALHO, A. F. Conseqüências de diferentes níveis de células somáticas no leite sobre a qualidade do queijo Prato. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 45, n. 267-272, p. 68-76, 1990.

ARENAS, R.; GONZÁLEZ, L.; BERNARDO, A.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Microbiological and physico-chemical changes in Genestoso cheese, a Spanish acid curd variety, throughout ripening. **Food Control**, v. 15, n. 4, p. 271-279, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIA DE QUEIJOS (ABIQ) **Produção de queijos no Brasil**. Mensagem recebida por [luesper@fea.unicamp.br](mailto:luesper@fea.unicamp.br) em 19 nov. 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of AOAC international**. 16.ed. Washington, 1995. v. 1-2.

AULDIST, M. J.; HUBBLE, I. B. Effects of mastitis on raw milk and dairy products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 1, p. 28-36, 1998.

AULDIST, M. J.; COATS, S.; SUTHERLAND, B. J.; MAYES, J. J.; MCDOWELL, G. H.; ROGERS, G. L. Effects of somatic cell count and stage of lactation on raw milk composition and the yield and quality of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 63, n. 2, p. 269-280, 1996.

BASTIAN, E. D.; BROWN, R. J. Plasmin in milk and dairy products: an update. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 5, p. 435-457, 1996.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e o Regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel**: aprovado pela Instrução Normativa N° 51 de 18/09/2002. Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=8932>>. Acesso em: 18 set. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos:** aprovado pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144>>. Acesso em: 18 set. 2004.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Produção brasileira de queijos sob inspeção federal – 2000.** Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/04industria/tabela04.04.php>>. Acesso em: 15 out. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato:** aprovado pela Portaria N° 358 de 04/09/1997. Disponível em: <<http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1231>>. Acesso em: 15 out. 2004.

BRITISH STANDARDS INSTITUTION. **Determination of fat content of milk and milk products (Gerber methods). Methods.** London: British Standards Institution, 1989. 12p.

BRITO, J.R.F. Células somáticas no leite: uma revisão. **CBQL em Revista**, v. 1, n. 2, 2002. Disponível em: <<http://www.cbql.com.br/revista/n2/leite2.htm>>. Acesso em: 7 out. 2004.

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

COONEY, S.; TIERNAN, D.; JOYCE, P.; KELLY, A. Effect of somatic cell count and polymorphonuclear leucocyte content of milk on composition and proteolysis during ripening of Swiss-type cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 2, p. 301-307, 2000.

COPPOLA, R.; NANNI, M.; IORIZZO, M.; SORRENTINO, A.; SORRENTINO, E.; CHIAVARI, C.; GRAZIA, L. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of ripening. **Lait**, v. 80, n. 5, p. 479-490, 2000.

COULON, J. B.; DELACROIX-BUCHET, A.; MARTIN, B.; PIRISI, A. Relationships between ruminant management and sensory characteristics of cheeses: a review. **Lait**, v. 84, n. 3, p. 221-241, 2004.

CRUDDEN, A.; FOX, P. F.; KELLY, A. L. Factors affecting the hydrolytic action of plasmin in milk. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 305-313, 2005.

DEETH, H. C. Lipolysis in milk and dairy products – A research journey. **Food Australia**, v. 54, n. 10, p. 433-436, 2002.

FARKYE, N.; FOX, P. F. Contribution of plasmin to Cheddar cheese ripening: effect of added plasmin. **Journal of Dairy Research**, v. 59, n. 2, p. 209-216, 1992.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P.L.H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 2000. 587p.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H.; LYNCH, C. M. Significance of non-starter lactic acid bacteria in cheddar cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 53, n. 2, p. 83-89, 1998.

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

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 215-222, 2003.

GOBETTI, M.; LOWNEY, S.; SMACCHI, E.; BATTISTOTTI, B.; DAMIANI, P.; FOX, P. F. Microbiology and biochemistry of Taleggio cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 2, n. 8/9, p. 509-517, 1997.

GRANDISSON, A. S.; FORD, G. D. Effects of variations in somatic cell count on the rennet coagulation properties of milk and on the yield, composition and quality of Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 53, n. 4, p. 645-655, 1986.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 7, p. 2103-2112, 1994.

KLEI, L.; YUN, J.; SAPRU, A.; LYNCH, J.; BARBANO, D.; SEARS, P.; GALTON, D. Effects of milk somatic cell count on Cottage cheese yield and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1205-1213, 1998.

LE ROUX, Y.; LAURENT, F.; MOUSSAOUI, F. Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. **Veterinary Research**, v. 34, n. 5, p. 629-645, 2003.

LINDMARK-MÅNSSON, H.; SVENSSON, U.; PAULSSON, M.; ALDÉN, G.; FRANK, B.; JOHNSON, G. Influence of milk components, somatic cells and supplemental zinc on milk processability. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 7, p. 423-433, 2000.

MA, Y.; BARBANO, D. M.; GALTON, D. M.; RUDAN, M. A.; BOOR, K. J. Effects of somatic cell count on quality and shelf-life of pasteurized fluid milk. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 264-274, 2000.

MACHADO, P. F.; PEREIRA, A. R.; SARRÍES, 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.

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

MARA, O.; ROUPIE, C.; DUFFY, A.; KELLY, A. L. The curd-forming properties of milk as affected by the action of plasmin. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 9, p. 807-812, 1998.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; RONDININI, 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.

MAZAL, G. **Efeito da contagem de células somáticas do leite na fabricação do queijo Prato**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos/Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

McSWEENEY, P. L. H. Biochemistry of cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 2/3, p. 127-144, 2004.

McSWEENEY, P. L. H. The flavour of milk and dairy products: III. Cheese: taste. **International Journal of Dairy Technology**, v. 50, n. 4, p. 123-128, 1997.

MUNRO, G. L.; GRIEVE, P. A.; KITCHEN, B. J. Effects of mastitis on milk yield, milk composition, processing properties and yield and quality of milk products. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 39, n. 1, p. 7-16, 1984.

O'BRIEN, B.; MEANEY, W. J.; McDONAGH, D.; KELLY, A. Influence of somatic cell count and storage interval on composition and processing characteristics of milk from cows in late lactation. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 3, p. 213-218, 2001.

OKELLO-UMA, I.; MARSHALL, V. M. E. Influence of mastitis on growth of starter organisms used for the manufacture of fermented milks. **Journal of Dairy Research**, v. 53, n. 4, p. 631-637, 1986.

OLIVEIRA, C. A. F.; FERNANDES, A. M.; CUNHA NETO, O. C.; FONSECA, L. F. L.; SILVA, E. O. T.; BALIAN, S. C. Composition and sensory evaluation of whole yogurt produced from milk with different somatic cell counts. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 57, n. 3, p. 192-196, 2002.

OLIVEIRA, J. S. **Queijo: Fundamentos Tecnológicos**. São Paulo: Ícone, 1986. 146p.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Health products and Food Branch. Isolation of Listeria monocytogenes from all food and environmental samples**. MFHB-30, January, 2001.

POLITIS, I.; NG-KWAI-HANG, K. F. Effects of somatic cell count and milk composition on cheese composition and cheese making efficiency. **Journal of Dairy Science**, v. 71, n. 7, p. 1711-1719, 1988.

RICHARDSON, G. H. **Standard Methods for Examination of Dairy Products**. Washington: American Public Health Association, 1985. 412 p.

SANTANA, E. H. W.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F.; MORAES, L. B.; GUSMÃO, V. V.; PEREIRA, M. S. Contaminação do leite em diferentes pontos do processo de produção: I. Microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 22, n. 2, p. 145-154, 2001.

SANTOS, M. V.; MA, Y.; BARBANO, D. M. Effect of somatic cell count on proteolysis and lipolysis in pasteurized fluid milk during shelf-life storage. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 8, p. 2491-2503, 2003.

SANTOS, M. V.; FONSECA, L. F. L. da. Importância e efeito de bactérias psicrotróficas sobre a qualidade do leite. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 13-19, 2001.

SORDILLO, L. M.; STREICHER, K. L. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. **Journal of Mammary Gland and Neoplasia**, v. 7, n. 2, p. 135-146, 2002.

SØRHAUG, T.; STEPANIAK, L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: quality aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 8, n. 2, p. 35-40, 1997.

SRINIVASAN, M.; LUCEY, J. A. Effects of added plasmin on the formation and rheological properties of rennet-induced skim milk gels. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 5, p. 1070-1078, 2002.

VALLE, J. L. E.; MORENO, I.; VAN DENDER, A. G. F.; SOUZA, G. Evolução da microbiota láctica do queijo Prato conservado a temperaturas de subcongelamento. **Coletânea ITAL**, v. 22, n. 1, p. 83-91, 1992.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1/2, p. 37-44, 2001.

WATKINSON, P.; COKER, C.; CRAWFORD, R.; DODDS, C.; JOHNSTON, K.; McKENNA, A.; WHITE, N. Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 4-7, p. 455-464, 2001.

WELTHAGEN, J. J.; VILJOEN, B. C. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 185-194, 1998.

# **ANEXO I**

### Análise individual da CCS e da composição do leite para seleção das vacas

Os Quadros 1, 2 e 3 são um exemplo das planilhas utilizadas na seleção dos animais e cálculos realizados para a obtenção dos leites de CCS baixa e alta.

**Quadro 1:** Avaliação individual da composição e da CCS dos leites

Tipo	Data Análise	Amostra	Brinco	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose (%)	Sólidos (%)	CCS x 10 <sup>3</sup> cél/ml
A	28/03/05	8	466	2,1300	2,4800	4,5000	10,1700	4
A	28/03/05	2	478	2,7700	2,3900	3,8300	9,7400	5
A	28/03/05	1	29	2,3200	2,7100	4,3800	10,3600	5
A	28/03/05	11	450	2,1400	2,6500	4,2900	9,9900	6
A	28/03/05	24	559	2,2700	3,0500	4,6000	10,9000	16
A	28/03/05	27	361	1,8200	2,5500	4,5800	10,0100	25
A	28/03/05	7	534	2,0400	2,8700	4,5600	10,4700	35
A	28/03/05	17	581	1,8300	3,0500	4,4400	10,1900	43
A	28/03/05	39	566	3,0800	2,3300	3,9000	10,1400	53
A	28/03/05	9	465	2,0400	2,5500	4,1100	9,5400	55
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>26</b>	<b>564</b>	<b>2,7800</b>	<b>3,2100</b>	<b>4,5900</b>	<b>11,5500</b>	<b>55</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>33</b>	<b>523</b>	<b>2,4100</b>	<b>2,5900</b>	<b>4,3000</b>	<b>10,2500</b>	<b>56</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>25</b>	<b>549</b>	<b>2,4100</b>	<b>2,7100</b>	<b>4,2400</b>	<b>10,2400</b>	<b>60</b>
A	28/03/05	30	535	2,1800	2,6900	4,3400	10,1400	68
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>34</b>	<b>548</b>	<b>2,3800</b>	<b>2,8400</b>	<b>4,3900</b>	<b>10,5400</b>	<b>68</b>
A	28/03/05	15	532	2,6100	2,5800	4,4900	10,7400	69
A	28/03/05	37	580	2,8800	2,5200	3,9800	10,1900	72
A	28/03/05	41	460	1,9300	2,5000	4,3700	9,7700	72
A	28/03/05	3	540	1,9700	3,8100	4,5700	11,1200	82
A	28/03/05	20	543	2,0100	3,7800	4,4600	10,9800	86
A	28/03/05	6	512	1,8400	2,9300	4,4700	10,1600	96
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>23</b>	<b>556</b>	<b>3,3800</b>	<b>3,2400</b>	<b>4,4400</b>	<b>11,9700</b>	<b>104</b>
A	28/03/05	14	568	2,6200	2,3400	4,2700	10,2200	113
A	28/03/05	21	531	2,2400	3,2400	4,4400	10,7600	120
A	28/03/05	22	570	2,2100	2,7800	3,9500	9,6300	122
A	28/03/05	28	567	2,4200	2,5900	3,9900	9,7900	122
A	28/03/05	18	569	2,1200	2,7300	3,9700	9,5400	155
A	28/03/05	4	342	2,0200	2,6200	4,0100	9,4200	172
A	28/03/05	5	376	2,1500	2,8800	4,4000	10,3500	174
A	28/03/05	36	546	2,2700	2,7800	4,2500	10,1700	180
A	28/03/05	35	501	3,6800	3,0600	4,4900	12,2100	199
A	28/03/05	13	545	2,3300	2,8100	4,6100	10,8000	211
A	28/03/05	29	563	3,5200	3,0800	4,3100	11,8000	212
A	28/03/05	31	411	2,8800	2,8300	3,8600	10,2500	217
A	28/03/05	16	575	3,5700	2,3800	4,0300	10,8800	238
A	28/03/05	42	390	1,9100	2,6900	3,6900	8,8600	289
A	28/03/05	10	560	3,4900	2,5100	3,9500	10,7700	307
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>12</b>	<b>579</b>	<b>2,0200</b>	<b>2,8500</b>	<b>4,5200</b>	<b>10,3700</b>	<b>343</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>32</b>	<b>565</b>	<b>2,7700</b>	<b>2,6800</b>	<b>4,1600</b>	<b>10,4700</b>	<b>369</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>40</b>	<b>572</b>	<b>2,3700</b>	<b>3,0800</b>	<b>4,4900</b>	<b>10,8700</b>	<b>416</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>43</b>	<b>21</b>	<b>2,9500</b>	<b>3,1600</b>	<b>4,1000</b>	<b>10,9400</b>	<b>775</b>
<b>A</b>	<b>28/03/05</b>	<b>19</b>	<b>555</b>	<b>2,5300</b>	<b>2,7700</b>	<b>4,1500</b>	<b>10,2800</b>	<b>2000</b>
A	28/03/05	38	440	1,0000	2,8500	3,5000	7,7300	6578

**Quadro 2:** Seleção das vacas com CCS alta

<b>Seleção de vacas - CCS alta</b>				
<b>Brinco</b>	<b>Produção (litros)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>CCS x 10<sup>3</sup> cél/ml</b>
579	10,00	2,0200	2,8500	343
565	10,00	2,7700	2,6800	369
572	12,20	2,3700	3,0800	416
21	12,00	2,9500	3,1600	775
555	17,00	2,5300	2,7700	2000
	<b>61,2</b>	<b>2,54</b>	<b>2,91</b>	<b>866,71</b>

**Quadro 3:** Seleção das vacas com CCS baixa

<b>Seleção de vacas - CCS baixa</b>				
<b>Brinco</b>	<b>Produção (litros)</b>	<b>Gordura (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>CCS x 10<sup>3</sup> cél/ml</b>
564	12	2,7800	3,2100	55
523	16	2,4100	2,5900	56
549	13	2,4100	2,7100	60
556	10	3,3800	3,2400	104
548	10	2,3800	2,8400	68
	<b>61</b>	<b>2,64</b>	<b>2,89</b>	<b>66,49</b>