



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

JOVILMA MARIA SOARES DE MEDEIROS

**INCIDÊNCIA DO *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE
COALHO ARTESANAL E QUALIDADE DE NOVAS FORMULAÇÕES**

MOSSORÓ

2020

JOVILMA MARIA SOARES DE MEDEIROS

**INCIDÊNCIA DO *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE
COALHO ARTESANAL E QUALIDADE DE NOVAS FORMULAÇÕES**

Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jean Berg Alves da
Silva

MOSSORÓ

2020

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M488i Medeiros, Jovilma Maria Soares de . Incidência do Staphylococcus aureus na produção de queijo de coalho artesanal e qualidade de novas formulações / Jovilma Maria Soares de Medeiros. - 2020.
88 f. : il.

Orientador: Jean Berg Alves Silva. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2020.

1. Queijo artesanal. 2. Potencial enterotoxigênico. 3. Sal de ervas. 4. Fibra dietética. I. Silva, Jean Berg Alves, orient. II. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JOVILMA MARIA SOARES DE MEDEIROS

**INCIDÊNCIA DO *Staphylococcus aureus* NA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE
COALHO ARTESANAL E QUALIDADE DE NOVAS FORMULAÇÕES**

Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 18/02/2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Jean Berg Alves da Silva
Dr. Médico Veterinário

Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Presidente



Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Lima (UFERSA)
Membro examinador



Profa. Dra. Ana Carla Diógenes Suassuna Bezerra (UFERSA)
Membro examinador



Profa. Dra. Maria Rociene Abrantes (Faculdade Cisne)
Membro examinador



Profa. Dra. Nathália Cristina Cirone Silva (UNICAMP)
Membro examinador

Ao meu avô Geraldo, que nunca mediu esforços para realização dos meus sonhos profissionais e me proporcionou vivenciar o amor fraterno de avô (In Memoriam).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e Divino Pai Eterno, que traçou todo esse caminho que estou percorrendo e nunca me desamparou. A Ele toda glória e louvor sempre e gratidão por tudo que tenho conquistado.

Aos meus pais, Vitória e José Geraldo, que celebram com grande alegria mais essa conquista. Eles que, durante anos, abdicaram de seus sonhos para realizar os meus, são tão merecedores quanto eu de cada vitória.

Ao meu esposo, Pedro Henrique, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, incentivando e torcendo para que tudo desse certo. Que além de um excelente esposo, foi meu amigo, conselheiro e minha fonte de paciência e tranquilidade. A ele todo meu amor e gratidão.

Aos meus sogros, Jussara e Silva Neto, e ao meu cunhado João Paulo, por me acolherem nessa minha nova família e por estarem sempre dispostos a me auxiliar. Por serem minha base sólida de amor e carinho em Mossoró.

Ao meu orientador Jean Berg pelo acolhimento, pela dedicação, pela humanidade. A ele que é um exemplo de professor e guia seus alunos com tranquilidade e compreensão minha gratidão e admiração.

A todos os professores, técnicos de laboratório e funcionários do Núcleo de Geração e Transferência de Tecnologia em Produção Animal do Semiárido (NUTESA) que em toda essa trajetória me auxiliaram generosamente no planejamento e execução desse trabalho.

Aos meus amigos de laboratório (LIPOA) que me auxiliaram de forma essencial na execução desse trabalho. Por estarem sempre dispostos a executar os experimentos, ajudar nas dificuldades, confraternizar e celebrar os bons momentos.

Às minhas amigas de longas datas, Raiza, Bruna, Pérsia e Maíra e às amigas conquistadas em Mossoró, Aline, Danielly e Fernanda, por entenderem minhas ausências e torcerem por meu sucesso.

Aos produtores Marinalva Medeiros e José Ivon por gentilmente me receberem em seus estabelecimentos e me permitirem utilizar seus produtos e modo de produção como objeto de estudo.

À professora Natália Cirone por ter me acolhido em seu laboratório e me permitido adquirir novos conhecimentos, aos alunos e a técnica do Laboratório de Toxinas Bacterianas, por terem feito meus dias em Campinas/SP mais felizes e tranquilos.

Do alto de vossas moradas derramais a chuva nas montanhas, do fruto de vossas obras se farta a terra. Fazeis brotar a relva para o gado, e plantas úteis ao homem, para que da terra possa extrair o pão e o vinho que alegra o coração do homem.

Salmo 103: 13-15

RESUMO

Diante da necessidade de um alimento com qualidade sanitária e nutricional objetivou-se caracterizar *Staphylococcus aureus* presente na produção de queijo de coalho artesanal, bem como a utilização de produtos naturais (ervas e inulina) na elaboração desse produto. Para tanto foram isoladas colônias de *S. aureus* presentes no leite, equipamentos e utensílios utilizados na fabricação, etapas do preparo e o produto final de dois estabelecimentos produtores, totalizando 52 amostras. Foram realizadas a identificação fenotípica das colônias, a pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas, de resistência a antibióticos e a tipagem por *agr typing*, além do teste de sensibilidade a antibióticos. Foram elaborados dois queijos de coalho artesanais. Em uma produção utilizou-se a substituição de cloreto de sódio por ervas nas proporções de 30%, 22,2% e 12,5%. Também foi utilizado leite semidesnatado e integral com adição de 8% de inulina na produção do segundo produto. Nas amostras dos dois queijos fabricados foram analisados o crescimento microbiano, a composição química e parâmetros físicos durante 10 dias de armazenamento refrigerado e realizada análise sensorial. No processo produtivo do queijo de coalho observou-se elevada contaminação (50%) por *S. aureus*, assim como presença de gene produtor de enterotoxina *sea* (19%) e gene *mecA* (45,7%). Os genes dos grupos *agr* estiveram presentes no processo de produção do queijo com maior prevalência do *agr III* (12,7%). Quanto a resistência a antibióticos observou-se resistência múltipla a penicilina, oxacilina, eritromicina e clindamicina em 79% dos isolados. Nas formulações com ervas foi possível reduzir as contagens de estafilococos coagulase positiva (5,64 log UFC/g) até o 5º dia de armazenamento, assim como o teor de sódio e melhorar a aceitação do queijo com a adição de 12,5% de ervas. Em relação a inulina, esta não interferiu no crescimento microbiano e manteve a aceitação sensorial equivalente ao queijo de coalho sem inulina. Nos estabelecimentos onde a produção de queijo de coalho foi analisada encontraram-se cepas de *S. aureus* com potencial enterotoxigênico demonstrando a necessidade de uma fabricação com melhores condições de higiene. Além disso, a adição de ervas pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade microbiológica, que aliada a utilização da inulina melhoram a qualidade nutricional do queijo de coalho.

Palavras-chave: Queijo artesanal. Potencial enterotoxigênico. Sal de ervas. Fibra dietética.

ABSTRACT

In view of the need for food with sanitary and nutritional quality, the objective was to characterize *Staphylococcus aureus* present in the production of artisanal “coalho” cheese, as well as the use of natural products (herbs and inulin) in the preparation of this product. For this purpose, colonies of **S. aureus** present in milk, equipment and utensils used in the manufacture, stages of preparation and the final product of two producing establishments were isolated, totaling 52 samples. Colon phenotypic identification, search for genes encoding enterotoxins, antibiotic resistance and typing by *agr* typing were performed, in addition to antibiotic sensitivity testing. Two artisanal “coalho” cheeses were made. In one production, the substitution of sodium chloride for herbs in the proportions of 30%, 22.2% and 12.5% was used. Semi-skimmed and whole milk was also used with the addition of 8% inulin in the production of the second product. In the samples of the two cheeses manufactured, microbial growth, chemical composition and physical parameters were analyzed during 10 days of cold storage and sensory analysis was performed. In the production process of “coalho” cheese, high contamination (50%) by *S. aureus* was observed, as well as the presence of a gene producing *sea* enterotoxin (19%) and a *mecA* gene (45.7%). The genes of the *agr* groups were present in the cheese production process with a higher prevalence of *agr* III (12.7%). Regarding antibiotic resistance, multiple resistance to penicillin, oxacillin, erythromycin and clindamycin was observed in 79% of the isolates. In herbal formulations it was possible to reduce the counts of coagulase positive staphylococci (5.64 log CFU / g) until the 5th day of storage, as well as the sodium content and improve the acceptance of the cheese with the addition of 12.5% of herbs. In relation to inulin, it didn't interfere with microbial growth and maintained the sensory acceptance equivalent to “coalho” cheese without inulin. In establishments where the production of “coalho” cheese was analyzed, strains of *S. aureus* with enterotoxigenic potential were found, demonstrating the need for manufacturing with better hygiene conditions. In addition, the addition of herbs can be an alternative to improve microbiological quality, which combined with the use of inulin improves the nutritional quality of “coalho” cheese.

Keywords: Artisanal cheese. Enterotoxigenic potential. Herbal salt. Dietary fiber.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO III

- Figura 1 - Crescimento de bactérias mesófilas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 53
- Figura 2 - Crescimento de bactérias halófilas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 53
- Figura 3 - Crescimento de estafilococos coagulase positiva em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 54
- Figura 4 - Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 54
- Figura 5 - Avaliação da acidez (mg ácido láctico/ 100g) durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) dos queijos. CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas) 56
- Figura 6 - Avaliação do pH durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) dos queijos. CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 56
- Figura 7 - Valores médios do parâmetro de cor L^* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 57

- Figura 8 - Valores médios do parâmetro de cor a* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 58
- Figura 9 - Valores médios do parâmetro de cor b* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 58
- Figura 10 - Análise sensorial dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas). 62

CAPÍTULO IV

- Figura 1 - Análise sensorial dos queijos após 2 dias de armazenamento (10 a 12°C). C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina. 81

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1 - Genes pesquisados e seus respectivos primers. 35
- Tabela 2 - Padrões interpretativos do diâmetro de zona de inibição de antibióticos frente a *S. aureus*. 36
- Tabela 3 - Genes e perfil de resistência a antibióticos identificados em *Staphylococcus aureus* isolados da produção de queijo de coalho. 38
- Tabela 4 - Perfil fenotípico de resistência a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas da produção de queijo de coalho artesanal. 40

CAPÍTULO III

- Tabela 1 - Ingredientes e quantidades das quatro formulações de queijo de coalho adicionado de ervas. 50
- Tabela 2 - Efeito da substituição parcial do sal por ervas sobre o perfil de textura de queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). 60
- Tabela 3 - Resultados de composição química dos queijos analisados durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). 61

CAPÍTULO IV

- Tabela 1 - Ingredientes e quantidades utilizados na elaboração dos queijos. 72
- Tabela 2 - Qualidade microbiológica das amostras de queijos (média) com e sem inulina, e com adição desta e redução de gordura durante os dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C). 75
- Tabela 3 - Composição química das amostras de queijo fresco controle, integral e semidesnatado com inulina (média) após 1 dia de armazenamento (10 a 12°C). 77
- Tabela 4 - Avaliação de pH, acidez e cor dos queijos frescos com e sem redução de gordura e adição de inulina nos dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C) 79

Tabela 5 - Análise do perfil de textura dos queijos com substituição de 80 gordura por inulina nos dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFC/g	Unidades formadoras de colônias por grama
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Kg	Quilograma
G	Gramma
ml	Mililitro
cm ²	Centímetros ao quadrado
Rpm	Rotações por minuto
PCR	Reação em cadeia da polimerase
CBMEG	Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética
µl	Micro litro
mM	Milimolar
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Pb	Pares de bases
Mg	Microgramas
UFC/ml	Unidades formadoras de colônias por mililitro
Mm	Milímetros
UFC/cm ²	Unidades formadoras de colônias por centímetro quadrado
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a metilicina
TET	Tetraciclina
PEN	Penicilina
OXA	Oxacilina
CEF	Cefoxitina
ERI	Eritromicina
CLI	Clindamicina
GEN	Gentamicina
CLO	Cloranfenicol
TOB	Tobramicina
CC	Queijo sem adição de ervas
CH 12,5	Queijo com 12,5% de ervas no sal
CH 22,2	Queijo com 22,2% de ervas no sal
CH 30	Queijo com 30% de ervas no sal

L	Litro
pH	Potencial hidrogeniônico
N	Normal
UERN	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Kcal/g	Quilocalorias por grama
NMP	Número mais provável
Cm	Centímetro
C	Queijo controle
II 8%	Queijo com leite integral e 8% de inulina
SI 8%	Queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus celsius
%	Porcentagem
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
®	Marca registrada
L*	Luminosidade
a*	Teor de vermelho
b*	Teor de amarelo

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1.1	Introdução	19
1.2	Objetivos	21
1.2.1	Objetivo geral	21
1.2.2	Objetivos específicos	21
1.3	Revisão bibliográfica	22
1.3.1	Definição e características do queijo de coalho	22
1.3.2	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> e fatores de virulência	23
1.3.3	Sal com ervas	24
1.3.4	Características e aplicações da inulina	25
	Referências	26
2	CAPÍTULO II: <i>Staphylococcus aureus</i> RESISTENTE A METICILINA, PRODUTOR DE ENTEROTOXINAS ISOLADOS DA PRODUÇÃO DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL	30
2.1	Resumo	31
2.2	Introdução	31
2.3	Material e métodos	33
2.3.1	Obtenção das amostras e identificação fenotípica dos isolados	33
2.3.2	Identificação e caracterização molecular dos isolados	34
2.3.3	Caracterização fenotípica da resistência a antibióticos	35
2.4	Resultados e discussão	36
2.5	Conclusão	42
	Referências	42
3	CAPÍTULO III: UTILIZAÇÃO DE SAL COM MIX DE ERVAS EM QUEIJO FRESCO	46
3.1	Resumo	47
3.2	Introdução	47
3.3	Material e métodos	49
3.3.1	Elaboração dos queijos	49
3.3.2	Elaboração do sal com ervas e adição aos queijos	49
3.3.3	Qualidade microbiológica durante armazenamento	50
3.3.4	Características físicas, cor e perfil de textura durante armazenamento ..	50

3.3.5	Composição dos queijos	51
3.3.6	Análise sensorial	52
3.3.7	Análise estatística	52
3.4	Resultados e discussão	52
3.4.1	Qualidade microbiológica durante armazenamento	52
3.4.2	Aspectos físicos, cor e perfil de textura durante armazenamento	55
3.4.3	Composição química	60
3.4.4	Análise sensorial	62
3.5	Conclusão	64
	Referências	64
4	CAPÍTULO IV: APLICAÇÃO DE INULINA EM QUEIJO FRESCO COM TEOR DE GORDURA ELEVADO: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL	68
4.1	Resumo	69
4.2	Introdução	69
4.3	Material e métodos	71
4.3.1	Produção dos queijos	71
4.3.2	Análises microbiológicas	72
4.3.3	Análises físico-químicas	73
4.3.4	Análise sensorial	74
4.3.5	Análise estatística	74
4.4	Resultados e discussão	74
4.4.1	Qualidade microbiológica da matéria-prima e dos queijos	74
4.4.2	Composição química e parâmetros físicos nos queijos	76
4.4.3	Análise sensorial	81
4.5	Conclusão	82
	Referências	82
	Apêndices	86

1 CAPÍTULO 1: CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O queijo de coalho é um produto derivado do leite, tradicional da região Nordeste do Brasil, sendo caracterizado por uma massa semidura e semicozida, de cor branca amarelada, elaborado, geralmente, com leite cru. É um laticínio de importância socioeconômica, sendo a fonte de renda de muitas famílias nordestinas, além de se traduzir como um elemento de identidade cultural do Nordeste brasileiro (BRUNO et al., 2017).

Durante a fabricação de queijo de coalho, quando não respeitadas as boas práticas de fabricação, pode haver crescimento microbiano e alterações em suas características organolépticas, sendo observado crescimento de diversas espécies bacterianas, inclusive patogênicas, que podem significar riscos à saúde do consumidor (SOUSA JUNIOR et al., 2015). Como forma de eliminar a flora microbiana tem-se a pasteurização do leite, utilizado como matéria-prima do queijo de coalho, sendo uma etapa indispensável para efetiva fabricação do queijo, objetivando manter o alimento apto a consumo durante seu armazenamento (SILVA et al., 2017).

Entre os microrganismos contaminantes do queijo de coalho *Staphylococcus aureus* se destaca por ser um dos microrganismos implicados na contaminação desse queijo, representando um risco por sua habilidade de produzir toxinas, quando em condições ambientais adequadas. Estudos têm mostrado a presença de *S. aureus* em amostras de queijo de coalho artesanais, assim como a presença de genes codificadores de enterotoxinas, em especial das denominadas não clássicas, além da detecção de variadas espécies de estafilococos coagulase negativa (ANDRADE et al., 2019). Além da produção de toxinas termorresistentes, cepas de *S. aureus* têm sido apontadas como resistentes a diversos antibióticos, como penicilina, oxacilina e tetraciclina, podendo transferir esses genes a outros microrganismos potencialmente patogênicos (ROSA et al., 2015).

Uma das formas de inibição do crescimento microbiano é a adição do cloreto de sódio ao queijo de coalho durante o processo de produção, além de ser fundamental para o sabor do produto. No entanto, em queijeiras de pequeno porte a quantidade adicionada não apresenta padronização, tornando esse produto uma fonte de sódio importante na alimentação. Diante disso, vê-se necessária a redução do sódio nesse alimento, uma vez que o consumo excessivo de sódio pode estar relacionado ao desenvolvimento de doenças

crônicas não transmissíveis (LIMA et al., 2017). A adição de ervas aos alimentos é vista como uma alternativa para redução no teor de sódio, manutenção das características sensoriais e aumento da vida de prateleira (BINATTI et al., 2016). A utilização de compostos extraídos das ervas foi estudada sobre microrganismos como *S. aureus* e *Bacillus cereus*, sendo comprovada a ação inibitória de compostos do orégano e sua viabilidade como um antimicrobiano natural (POMBO et al., 2018).

Ainda no contexto de alimentos saudáveis, há uma preocupação atual para o consumo de alimentos com baixo teor de gordura. Variedades de queijos têm sido estudadas com redução de gordura e substituição desta por fibras, como a inulina, alcançando resultados satisfatórios de aceitação (NICOLETTI et al., 2016). A inulina é uma fibra solúvel que por suas propriedades emulsificantes e adoçantes proporcionam a sua utilização como substituta de açúcar e gordura em alimentos, sem incremento calórico, sendo uma alternativa na reformulação de produtos, tornando-os mais saudáveis e igualmente aceitáveis (LÓPEZ-CASTEJÓN et al., 2019).

O queijo de coalho é um produto de grande aceitação no Rio Grande do Norte, assim como em vários estados no Nordeste brasileiro, apresentando tendência a comercialização em todo território nacional, principalmente em virtude da utilização do Selo Arte, entretanto a sua fabricação artesanal pode proporcionar condições higiênicas insatisfatórias. Diante da procura incessante, pela população, por produtos mais saudáveis e seguros, vê-se a importância de se avaliar o processo tradicional do queijo de coalho e elaborar novas formulações com adição de ingredientes naturais (ervas e inulina), visando avaliar a aceitação desse produto por seu mercado consumidor.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a presença do *Staphylococcus aureus* no processo produtivo do queijo de coalho, assim como propor novas formulações do queijo com menores teores de sódio e gordura.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar e isolar *S. aureus* na cadeia produtiva do queijo de coalho;
- Identificar os genes codificadores da produção de enterotoxinas clássicas, assim como dos genes de resistência a antibióticos;
- Determinar a presença dos grupos *agr* nos isolados;
- Avaliar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana dos isolados;
- Analisar a qualidade microbiológica de queijos com substituição parcial do cloreto de sódio por ervas e com substituição parcial da gordura por inulina;
- Determinar a composição química e os parâmetros físicos das novas formulações de queijo;
- Avaliar a aceitação sensorial das novas formulações.

1.3 Revisão bibliográfica

1.3.1 Definição e características do queijo de coalho

O queijo de coalho, em sua descrição mais ampla, pode ser definido como o produto elaborado através da coagulação do leite, com uso de coalho ou outras enzimas coagulantes, sendo ainda permitido o uso de bactérias lácteas selecionadas. É um queijo de massa cozida ou semicozida, que apresenta cor branco amarelada, odor e sabor ácidos e levemente salgado. O produto final pode apresentar ou não pequenas olhaduras e deve ser comercializado com o prazo de 10 dias de fabricação (BRASIL, 2001). É um produto tipicamente brasileiro, bastante consumido e apreciado na região Nordeste do Brasil. Em pequenas propriedades sua fabricação é artesanal, sendo uma fonte de renda para muitas famílias nordestinas (SANTOS et al., 2011).

Entre os produtores, destacam-se os de pequeno porte que não conseguem comercializar sua produção de leite para os grandes laticínios. A produção do queijo de coalho é mais expressiva nos estados do Rio Grande do Norte, Pernambuco, Ceará e Paraíba (SILVA et al., 2012). A produção de alimentos artesanais, como o queijo de coalho, ganhou destaque e possibilidade de comercialização a nível nacional a partir da publicação do Decreto nº. 9.918, de 18 de julho de 2019, que estabeleceu a utilização do Selo Arte pelos produtos de origem animal produzidos de forma artesanal, permitindo que estes sejam reconhecidos e comercializados em todo o território nacional (BRASIL, 2019), sendo assim uma forma de comercialização e disseminação desse produto regional para o território brasileiro.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho, esse produto deve ser elaborado com leite submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, que assegure a inocuidade do produto (BRASIL, 2001). Entretanto, produzido de forma artesanal na maioria dos estabelecimentos, é geralmente fabricado com leite cru e sem os devidos cuidados de higiene (MAMEDE et al., 2010; SOUSA et al., 2014). Essa forma de fabricação artesanal, utilizando leite cru, foi regulamentada a partir da Lei 10.230, de 07 de agosto de 2017, que define o queijo artesanal como aquele produzido com leite integral, fresco e cru, respeitando os métodos tradicionais, culturais e regionais de fabricação. No entanto, para fabricação desse queijo, diversas condições de higiene devem ser preconizadas, visando assegurar a qualidade do produto fabricado (RIO GRANDE DO NORTE, 2017).

A pasteurização do leite pode ser definida como o emprego adequado do calor sobre o produto, que tem a função de eliminar por completo a flora microbiana patogênica, sem causar modificação nas características físico-químicas e organolépticas do leite. Esse processo pode ser realizado de forma rápida, quando o leite é aquecido de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, como também pode ser de forma lenta, onde o leite é aquecido de 62 a 65°C por 30 minutos (BRASIL, 2017). De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite Pasteurizado em estabelecimentos de pequeno porte é permitido o uso da pasteurização lenta, quando tem-se por objetivo a produção de derivados lácteos, como os queijos (BRASIL, 2018). A pasteurização é o processo mais utilizado para garantir a qualidade e segurança do leite, através da redução do número de microrganismos, tendo como objetivo produzir leite seguro para consumo humano e com qualidade para a produção de derivados (MANIK et al., 2004; BRANDT et al., 2011).

1.3.2 Contaminação por *Staphylococcus aureus* e fatores de virulência

Entre os microrganismos contaminantes de alimentos, *Staphylococcus* spp. apresenta como habitat o homem e animais, sendo encontrado na pele, mucosas e glândulas, sendo assim sua presença no alimento sugere que a matéria-prima procede de condições precárias de higiene ou que sua manipulação foi realizada de forma inadequada (LIMA; FOGAÇA, 2019).

Entre os derivados do leite, os queijos, produzidos com leite cru e em condições inadequadas de higiene, apresentam elevada prevalência de contaminação por *S. aureus*. Em estudo realizado com queijo de coalho artesanal produzido no Rio Grande do Norte, foi possível observar contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do permitido em legislação (5×10^2 UFC/g) em todas as amostras analisadas, demonstrando as condições de higiene impróprias desses produtos (PEREIRA et al., 2017).

Além da presença e elevadas contagens, para *S. aureus* deve-se levar em consideração a possibilidade de as cepas serem enterotoxigênicas, uma vez que as toxinas produzidas são as responsáveis pela manifestação dos sintomas característicos das doenças transmitidas por alimentos. Na literatura foram descritos 21 tipos de enterotoxinas estafilocócicas, sendo algumas de maior prevalência, denominadas clássicas (*sea, seb, sec, sed, see*), e as demais denominadas não clássicas (CRETENET et al., 2011).

As enterotoxinas descritas, até o momento são: *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, selk, sell, selm, seln, selo, selp, ser, ses, set, selu e selv*. Todas as enterotoxinas apresentam atividade superantigênica, enquanto as *sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, ser, ses* e *set* são eméticas. As enterotoxinas que não são eméticas ou não tiveram essa atividade verificada são denominadas genericamente de “enterotoxina do tipo estafilocócica” (CRETENET et al., 2011).

Estudos realizados com queijo de coalho têm demonstrado a presença de cepas de *S. aureus* portadoras de genes responsáveis pela produção de enterotoxinas e genes de resistência a antibióticos, o que sugere um risco potencial de transmissão de doença alimentar (PEREIRA et al., 2018).

O aumento das doenças transmitidas por alimentos associados a resistência microbiana tem levantado discussões acerca da temática, uma vez que limita as opções terapêuticas, sendo um grave problema de saúde pública (EVANGELISTA-BARRETO, 2016). Cepas de *S. aureus* podem carregar genes de resistência a antibióticos, incluindo *blaZ*, que confere resistência a fármacos da classe dos β -lactâmicos não estáveis e *mecA*, que causa resistência a outros fármacos como oxacilina e meticilina. A capacidade de propagar essa resistência a outros microrganismos confere ao *S. aureus* uma maior preocupação quando presente nos alimentos (ARAGÃO et al., 2019).

Em amostras como leite cru, queijo e iogurte observou-se *S. aureus* resistentes a penicilina, oxacilina, clindamicina, eritromicina, cefoxitina e gentamicina, sugerindo que o consumo desses alimentos pode ser um risco de contaminação ao consumidor e aponta a necessidade de tratamento térmico para o leite, a atenção para o uso indiscriminado de antimicrobianos nos animais e correta manipulação dos produtos (JAMALI et al., 2015).

1.3.3 Sal com ervas

No contexto da alimentação saudável enfatiza-se não apenas a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos, como também a preocupação atual com a ingestão adequada e moderada dos nutrientes, entre eles o sódio (NILSON; JAIME; RESENDE, 2012). A reformulação dos produtos com redução e substituição de ingredientes, como cloreto de sódio, se apresenta como alternativa à elaboração de produtos mais aceitos pelos consumidores mais exigentes (NASCIMENTO et al., 2007). Além da qualidade microbiológica a população atual tem se preocupado também com a qualidade sensorial dos alimentos que chegam a sua mesa, estando mais preocupada com aspectos sensoriais

como sabor, odor, cor e viscosidade, além da própria composição do produto e de suas características nutricionais (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Os produtos lácteos são responsáveis pela ingestão de pelo menos 11% do total de sódio consumido pela população americana, o que demonstra a relevância do queijo como uma importante fonte de sódio na alimentação (CRUZ et al., 2011). Essa ingestão excessiva de sódio na alimentação pode ocasionar diversos problemas à saúde humana e, diante disso, os órgãos governamentais estão se empenhando em estabelecer metas de redução do consumo de sal e alternativas para a sua utilização nos alimentos (ISRAR et al., 2016).

Além do efeito benéfico da redução do teor de sódio aos produtos, a substituição do cloreto de sódio por especiarias tem sido estudada pelo efeito inibitório desses ingredientes aos microrganismos. As ervas apresentam, como produtos do seu metabolismo secundário, substâncias capazes de inibir o crescimento microbiano, apresentando a vantagem de substituir o efeito de aditivos químicos utilizados para conservar os alimentos. Consideradas conservantes naturais seguros para o consumo humano, sua adição a alimentos pode favorecer a vida útil sem a necessidade de utilização de compostos químicos (TRAJANO et al., 2009; JUNEJA et al, 2012).

Em produtos lácteos, como os queijos, as ervas podem ser adicionadas com a finalidade de inibir o crescimento de microrganismos, através da ação antimicrobiana dos compostos fenólicos existentes nas ervas, além de agregar sabor e características sensoriais únicas (EL-SAYED; YOUSSEF, 2019). Além de apresentarem ação antimicrobiana a adição de ervas como, como manjeriço, pode proporcionar melhores características nutricionais nos queijos, por tornarem esse alimento um meio de consumo de compostos antioxidantes e, assim, melhorar o teor nutricional (CAROCHO et al., 2017).

1.3.4 Características e aplicações da inulina

No contexto nutricional, vem ganhando foco no mercado os alimentos funcionais, sendo estes os produtos alimentares que contêm em sua composição componentes biologicamente ativos que promovem efeitos importantes no organismo (SILVA; BERALDO; DEMATEL, 2009). Dessa forma os alimentos funcionais podem ser definidos como aqueles capazes de apresentar propriedade que resulte na prevenção ou

na redução do risco de desenvolver doenças, além da sua função principal de fornecer nutrientes (ARIAS-ARANDA; ROMEROSA-MARTINÉZ, 2010).

Dentre os alimentos funcionais estudados destacam-se os prebióticos que são componentes alimentares com atividade bifidogênica, capazes de estimular a atividade e/ou o crescimento de algumas bactérias do intestino (FUCHS et al., 2005). Entre os prebióticos utilizados na indústria de alimentos destaca-se a inulina, que é um carboidrato de reserva presente em milhares de vegetais, sendo utilizada como substituto ao açúcar ou a gordura, não resultando em incremento calórico (TONELI et al., 2008). A adição de inulina a queijos vem sendo avaliada e em variedades de queijo fresco cremoso tem apresentando boa aceitação sensorial, além de agregar propriedades funcionais ao produto (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2008).

A inulina é um ingrediente que apresenta ampla utilização, além de inúmeros benefícios para a saúde, dentre eles o aumento da absorção de minerais, como cálcio, magnésio e ferro, a promoção do crescimento da flora do trato digestivo, regulação de hormônios relacionados ao apetite, estimulação do sistema imunológico, entre outras diversas ações. Além disso, pode ser utilizada no preparo de alimentos de baixo teor calórico para diabéticos, sendo usado como substituto do açúcar, utilizada como substituto de gordura, como prebiótico e como uma fonte de fibra para enriquecer alimentos (SHOAIB et al., 2016).

A utilização da inulina como substituto da gordura em produtos lácteos se apresenta como uma alternativa promissora para elaboração de derivados com melhor teor nutricional. O emprego da inulina como substituto da gordura do leite em um produto análogo ao queijo processado resultou em melhores características sensoriais (SOŁOWIEJ et al., 2015).

Referências

ANDRADE, A. P. C. et al. Diversity of *Staphylococcus* coagulase-positive and negative strains of coalho cheese and detection of enterotoxin encoding genes. **Boletim do CEPPA**, v. 36, n. 1, p. 1-9, 2019.

ARAGÃO, B. B. et al. Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 8, p. 6923-6927, 2019.

ARIAS-ARANDA, D.; ROMEROSA-MARTINÉZ, M. M. Innovation in the functional foods industry in a peripheral region of the European Union: Andalusia (Spain). **Food Policy**, v. 35, p. 240-246, 2010.

- BINATTI, T. T. et al. Ação antimicrobiana de especiarias sobre o desenvolvimento bacteriano. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 260/261, 2016.
- BRANDT, L. V. et al. Adequacy of current pasteurization standards to inactivate *Mycobacterium paratuberculosis* in milk and phosphate buffer **International Dairy Journal**, v. 21, p. 295-304, 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº. 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p.3, 30 de março, 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.918, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre o processo de fiscalização de produtos alimentícios de origem animal produzidos de forma artesanal. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 19 de julho de 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 30 de novembro, 2018.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, p. 5-8, 16 de julho, 2001.
- BRUNO, L. M. et al. Wild *Lactobacillus* strains: Technological characterisation and design of Coalho cheese lactic culture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-11, 2017.
- BURITI, F. C. A. et al. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.
- CAROCHO, M. et al. Utilização de plantas como ingredientes bioativos e aditivos naturais em queijo de ovelha. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, p. 321-328, 2017.
- CRETENET, M. et al. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recente advances to face new challenges. **Dairy Science & Technology**, v. 91, p. 127-150, 2011.
- CRUZ, A. G. et al. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, p. 276-291, 2011.
- EL-SAYED, S. M.; YOUSSEF, A. M. Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. **Heliyon**, v. 5, n. 6, 2019.
- EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 55-67, 2016.
- FUCHS, R. H. B. et al. “Iogurte” de soja suplementado com oligofrutose e inulina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 1, p. 175-181, 2005.

- ISRAR, T. et al. Salt reduction in baked products: Strategies and constraints. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 98-105, 2016.
- JAMALI, H. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk and dairy products. **Food Control**, v. 54, p. 383-388, 2015.
- JUNEJA, V. K. et al. Novel Natural Food Antimicrobials. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, p. 381-403, 2012.
- LIMA, I. M.; FOGAÇA, L. C. S. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em Queijos Minas Padrão Comercializados no Município de Vitória da Conquista – Bahia. **Id on Line Revista Multidisciplinar e de Psicologia**, v. 13, n. 43, p. 819-827, 2019.
- LIMA, J. L. S. et al. Perfil do consumidor e determinação de Cloreto de Sódio em queijo artesanal. **Revista Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 36, p. 35-44, 2017.
- LÓPEZ-CASTEJÓN, M. L. et al. Characterization of prebiotic emulsions stabilized by inulin and β -lactoglobulin. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 382-393, 2019.
- MAMEDE, M. E. O. et al. Estudo das características sensoriais e da composição química do queijo de coalho industrializado. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 3, p. 364-70, 2010.
- MANIK, M. H. et al. Modelling and Optimisation of Milk Pasteurisation Processes. **Computer-Aided Process Engineering**, Lisbon, v. 18, p. 955-960, 2004.
- NASCIMENTO, R. et al. Substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio: influência sobre as características físico-químicas e sensoriais de salsichas. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 297-302, 2007.
- NICOLETTI, G. et al. Desenvolvimento de queijo tipo cottage sem lactose com adição de fibras e redução de sódio e gordura. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 186-196, 2016.
- NILSON, E. A. F.; JAIME, P. C.; RESENDE, D. O. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para redução do teor de sódio em alimentos processados. Informe Técnico, **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 32, n. 4, p. 287-292, 2012.
- PEREIRA, C. T. M. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 1957-1968, 2018.
- PEREIRA, T. M. F. et al. *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 2, p. 358-361, 2017.
- POMBO, J. C. P. et al. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 25, n. 2, p. 108-117, 2018.
- RIO GRANDE DO NORTE. Lei nº 10.230, de 07 de agosto de 2017. Dispõe sobre a produção e a comercialização de queijos e manteiga artesanais do Rio Grande do Norte – Lei Nivardo Melo. **Diário Oficial do Estado**, 08 de agosto de 2017.
- ROSA, D. L. S. O. et al. Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2015.

SANTOS, B. M. et al. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e leite de vaca. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011.

SHOAIB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 444-454, 2016.

SILVA, F. R. et al. Conservação e controle de qualidade de queijos: Revisão. **Pubvet**, v. 11, n. 4, p. 333-341, 2017.

SILVA, M. B. L.; BERALDO, J. C.; DEMATEI, L. R. Efeito da adição da farinha de linhaça na aceitação sensorial de bolo de chocolate. **Enciclopédia Bioesfera**, Goiânia, v. 5, n. 8, p. 2-6, 2009.

SILVA, R. A. et al. Can artisanal “Coalho” cheese from Northeastern Brazil be used as a functional food? **Food Chemistry**, v. 135, p. 1533-1538, 2012.

SOŁOWIEJ, B. et al. The effect of fat replacement by inulin on the physicochemical properties and microstructure of acid casein processed cheese analogues with added whey protein polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 1-11, 2015.

SOUSA JÚNIOR, D. L. et al. Análise bacteriológica de queijos tipo coalho comercializados no município de Crato, Ceará. **Revista Interfaces**, v. 3, n. 8, p. 1-4, 2015.

SOUZA, A. Z. B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 81, n. 1, p. 30-35, 2014.

TONELI, J. T. C. L. et al. Efeito da umidade sobre a microestrutura da inulina em pó. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.1, p. 122-131, 2008.

TRAJANO, V. N. et al. Propriedade antibacteriana de óleos essenciais de especiarias sobre bactérias contaminantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 542-545, 2009.

VIDAL-MARTINS, A. M. C. et al. Evolução do índice proteolítico e do comportamento reológico durante a vida de prateleira de leite UAT/UHT. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 698-704, 2005.

**2 CAPÍTULO II: *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA,
PRODUTOR DE ENTEROTOXINAS ISOLADOS DA PRODUÇÃO
DO QUEIJO DE COALHO ARTESANAL**

2.1 Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a presença de *Staphylococcus aureus* na produção do queijo de coalho artesanal, assim como o perfil fenotípico das cepas, fatores de virulência e perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Para tanto, foram coletadas amostras das etapas de fabricação do queijo de coalho em duas queijarias artesanais. Nas 52 amostras coletadas foram isoladas colônias típicas de *Staphylococcus* spp. Foi realizada a identificação fenotípica dos isolados e posteriormente a extração de DNA das cepas para identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. além de sequenciamento. Nas cepas positivas para *S. aureus* foram pesquisados os genes codificadores para produção de enterotoxinas, os genes de resistência a antibióticos e a tipagem por *agr typing*, como também o teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de disco-difusão. Em 33 (63%) amostras observaram-se contagens de Estafilococos coagulase positiva acima de 5 log UFC. Dos isolados obtidos 50% (105) foram positivos para *S. aureus* e nestes foi observado maior presença do gene produtor da enterotoxina *sea* (19%), elevada incidência do gene *mecA* (45,7%) e do grupo *agr* III (12,7%). Em relação a resistência antimicrobiana das cepas observou-se resistência múltipla a penicilina, oxacilina, eritromicina e clindamicina em 83 (79%) isolados. Observou-se elevada contaminação durante o processo produtivo do queijo de coalho artesanal com um potencial enterotoxigênico das cepas isoladas, demonstrando a preocupação com a qualidade do queijo de coalho artesanal produzido.

Palavras-chave: queijo artesanal; estafilococos coagulase positiva; potencial enterotoxigênico.

2.2 Introdução

Staphylococcus aureus é um coco gram-positivo frequentemente isolado do leite, de equipamentos e utensílios, sendo o leite uma das formas de contaminação por esse microrganismo na cadeia de produção dos derivados lácteos (JOHLER et al., 2018). A elevada incidência desta bactéria, principalmente de cepas enterotoxigênicas, em leite e produtos derivados é considerada um risco à saúde dos consumidores, além de causar prejuízos econômicos, em virtude de perdas na produção e comercialização (AHMED et al., 2019).

Entre os derivados lácteos, os queijos são relatados como produtos frequentemente contaminados por cepas de *S. aureus* produtores de toxinas e portadoras de genes de resistência a antibióticos, por sua grande manipulação na fabricação. A transmissão de resistência a antibióticos por alimentos é um problema de saúde global e pode identificar as condições inadequadas de fabricação de queijos (CAN; ÇELIK, 2012). Em queijos frescos, como o de coalho, a presença de gene de resistência a antibióticos em 42,6% de amostras, assim como resistência a oxacilina em 7,4%, demonstram o risco do consumo desse produto e sua condição precária de fabricação (ARAGÃO et al., 2019).

Surtos de toxinfecções alimentares têm sido relatados, relacionando a ingestão de toxinas estafilocócicas a partir de leite cru e queijos artesanais (JOHLER et al., 2015). Na indústria de processamento de alimentos a preocupação da presença de *S. aureus* é devida principalmente aos seus fatores de virulência (XING et al., 2016). As enterotoxinas estafilocócicas podem ser produzidas por até 50% das cepas de *S. aureus*, dessas toxinas as denominadas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) são responsáveis por até 95% dos surtos de intoxicação alimentar, e as demais toxinas pelos 5% restantes (BABIC et al., 2018).

Outro importante problema na contaminação dos alimentos é a incidência de bactérias multirresistentes que tem aumentado expressivamente em todo o mundo, sendo uma ameaça à saúde pública. Esses patógenos que apresentam resistência à múltiplas drogas podem causar sérios danos à saúde humana e animal e possuem difícil tratamento. Entre os patógenos de relevância clínica e industrial está *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (ETET et al., 2016). Resistência de *S. aureus* isolados de leites bovinos, caprinos e ovinos à penicilina (PEN), clindamicina (CLI), tetraciclina (TET) e gentamicina (GEN), além de cepas apresentando resistência a um ou mais antibióticos foram reportados por Obaidat et al. (2018).

Staphylococcus aureus foi o terceiro patógeno mais comum em casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos de 2009 e 2018, estando o leite e os derivados entre os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos alimentares (ANVISA, 2019). Em queijos artesanais, elaborados com leite cru, a presença de *S. aureus* em contagens acima do permitido, assim como a presença de enterotoxinas, apontam para o risco potencial à saúde pública (FERREIRA et al., 2016). Considerando toda a problemática envolvida na elaboração de queijos artesanais e o risco de contaminação nesse produto, o objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de

Staphylococcus aureus em toda a linha de produção do queijo de coalho, assim como realizar a caracterização molecular dos isolados e determinar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Obtenção das amostras e identificação fenotípica dos isolados

Foram realizadas duas coletas em duas queijarias, nos municípios de São José do Seridó e Caicó, no Estado do Rio Grande do Norte, sendo os locais produtores de queijo de coalho artesanal. Os estabelecimentos eram de pequeno porte e produziam em torno de 30 Kg/dia de queijo. Durante as visitas foram coletadas amostras provenientes de todas as etapas de fabricação, desde a matéria-prima (leite; duas amostras por local), equipamentos (tanque e lira; duas amostras de cada por local), utensílios (forma e embalagem; duas amostras de cada por local), etapas do preparo (massa coagulada, semicozida e salgada; duas amostras de cada por local), até o produto final (queijo; 10 amostras por local), totalizando 52 amostras.

Para análise microbiológica foram pesados, de forma asséptica, 25 g de queijo e das massas coagulada, dessorada e salgada e 25 ml de leite que foram transferidos para sacos plásticos estéreis, aos quais foram adicionados 225 ml de água peptonada tamponada para homogeneização em “Stomacher” durante 2 minutos, onde obteve-se a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram realizadas as demais diluições até 10^{-4} . Para os equipamentos utilizou-se um molde estéril de 10 cm^2 para delimitar a área e segurando o molde foi aplicado o *swab* em movimentos para direita, esquerda, limite superior e inferior. Após as coletas os *swabs* foram acondicionados em tubos contendo 9 ml de água peptonada tamponada estéril, sendo essa a diluição 10^0 , a partir da qual foram feitas as demais diluições até 10^{-3} . Após as diluições, as amostras foram submetidas a contagem de *Staphylococcus* spp. utilizando a metodologia descrita pela *American Public Health Association* (DOWNES; ITO, 2001).

A partir de cada amostra foram isoladas cinco colônias suspeitas, de cor negra e com halos, repicadas em BHI (Brain Heart Infusion) ágar inclinado que foram transportadas ao Laboratório de Toxinas Bacterianas, na Universidade Estadual de Campinas, Campinas/São Paulo. Nesses isolados foram realizados o teste da catalase, coloração de Gram e teste da coagulase, visando identificar as cepas estafilococos coagulase positiva e negativa.

2.3.2 Identificação e caracterização molecular dos isolados

Os isolados de *Staphylococcus* spp. foram inoculados em caldo BHI e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Depois de apresentarem turvação no meio líquido os mesmos foram estriados por esgotamento em placas de Petri contendo ágar BHI e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Foi coletada uma colônia isolada e adicionada em um microtubo contendo 1 ml de água Miliq ultra pura estéril e centrifugado a 12.000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o pélete foi submetido à metodologia de extração de DNA conforme recomendações do fabricante do kit comercial InstaGene (Bio-Rad Laboratories).

Em todas as cepas foram realizadas amplificação do gene *nuc* para identificar *S. aureus* e posteriormente o gene *nuchy* para *S. hyicus*, para os não *S. aureus*. Nas amostras onde não foram detectadas nenhuma das duas espécies foi realizada amplificação do gene *sodA*, posteriormente o produto de PCR foi purificado e enviado para o sequenciamento Sanger no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) com intuito de identificar a espécie.

Em todas as cepas positivas para *S. aureus* foi realizada a pesquisa de PCR dos genes responsáveis pela produção das seguintes enterotoxinas: *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, os genes de resistência a antibióticos *mecA* e *mecC*. Além disso, também foi realizada tipagem por *agr typing*, onde foram investigados os quatro grupos *agr* (I, II, III, IV). Em todas as PCR foram incluídos controles positivo e negativo.

Para amplificação de todos os genes pesquisados, exceto *sodA*, foi realizada uma reação de 25 μL contendo: 5 μL de Buffer 5x (Promega), 2 a 4 μL de MgCl_2 25mM (Promega) dependendo do gene, 0,5 μL de dNTP 10 mM (Invitrogen), 1 μL de cada par de primer Forward e Reverse (Invitrogen ou Sigma dependo do gene), 0,25 μL Taq Polymerase (Promega), 5 μL de DNA e o necessário de água Miliq ultra pura para completar a reação de 25 μL . Para o gene *sodA* foi necessário uma reação de 50 μL para posterior purificação.

As reações foram realizadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial de $94-95^\circ\text{C}/2-5$ minutos, ciclos de 30 a 33 (variaram de acordo com o primer), desnaturação de $94-95^\circ\text{C}/30$ segundos a 2 minutos, temperatura de anelamento

conforme as referências citadas na tabela 1, extensão de 72°C/1 minutos; extensão final de 72°C/5-10 minutos.

Tabela 1. Genes pesquisados e seus respectivos primers.

Gene	Oligonucleotídeos (5'→3')	Tamanho (pb)	Anelamento (°C)	Referência
<i>nuc</i>	F: TCGCTTGCTATGATTGTGG R: GCCAATGTTCTACCATAGC	359	56	(SASAKI et al., 2010)
<i>hy</i>	F: CATTATATGATTTGAACGTG R: GAATCAATATCGTAAAGTTGC	793		
<i>sodA</i>	F: CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC R: ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	Variável	52	(POYART et al., 2001)
<i>sea</i>	F: TTGGAAACGGTTAAAACGAA R: GAACCTTCCCATCAAAAACA	120	54	(JOHNSON et al., 1991)
<i>seb</i>	F: TCGCATCAAACGACAAACG R: GCAGGTAATCTATAAGTGCC	478		
<i>sec</i>	F: GACATAAAAAGCTAGGAATTT R: AAATCGGATTAACATTATCC	257	53	
<i>sed</i>	F: CTAGTTTGGTAATATCTCCT R: TAATGCTATATCTTATAGGG	317	54	(MEHROTRA et al., 2000)
<i>see</i>	F: AGGTTTTTTCACAGGTCATCC R: CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	209		
<i>mecA</i>	F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACACGATAGCC	527	57	(CUNY et al., 2011)
<i>mecC</i>	F: GCTCCTAATGCTAATGCA R: TAAGCAATAATGACTACC	304	51	(GÓMEZ-SANZ et al., 2010)
<i>agrI</i>	F: GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT R: ATGCACATGGTGCACATGC	440		
<i>agrII</i>	F: GTATTACTAATTGAAAAGTGCCATAGC R: ATGCACATGGTGCACATGC	572	55	(SHOPSIN et al., 2003)
<i>agrIII</i>	F: CTGTTGAAAAAGTCAACTAAAAGCTC R: ATGCACATGGTGCACATGC	406		
<i>agrIV</i>	F: CGATAATGCCGTAATACCCG R: ATGCACATGGTGCACATGC	588		

2.3.3 Caracterização fenotípica da resistência a antibióticos

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado pelo método de disco-difusão em ágar interpretados conforme a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), com discos impregnados com penicilina (10 µg), oxacilina (1 µg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), eritromicina (15 µg), tetraciclina (30 µg), clindamicina (2 µg) e cloranfenicol (30 µg).

Os isolados foram repicados com o auxílio de uma alça bacteriológica para retirada de uma pequena quantidade de biomassa bacteriana da superfície dos tubos de ágar BHI e repicado para tubos contendo caldo BHI, incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas, depois de apresentarem turvação no meio líquido os inóculos foram padronizados de modo a se obter uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland, o que corresponde a uma suspensão bacteriana com aproximadamente 10^8 UFC/mL. As suspensões foram semeadas com auxílio de *swabs* na superfície das placas de ágar Mueller-Hinton e os discos impregnados com antibióticos foram dispostos sobre o meio, depois as placas foram incubadas invertidas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas, posteriormente foi medido os halos presentes em torno dos discos e conforme a CLSI as cepas foram classificadas como sensível, intermediária ou resistente.

A tabela 2 mostra a interpretação dos diâmetros em relação aos antibióticos utilizados na pesquisa de resistência de *S. aureus*.

Tabela 2. Padrões interpretativos do diâmetro de zona de inibição de antibióticos frente a *S. aureus*.

Agente antimicrobiano	Disco contendo	Critérios interpretativos zona de diâmetro (mm)		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Penicilina	10 µg	≥ 29	-	≤ 28
Oxacilina	1 µg	≥ 22	-	≤ 21
Cefoxitina	30 µg	≥ 22	-	≤ 21
Gentamicina	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Tobramicina	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Eritromicina	15 µg	≥ 23	14-22	≤ 13
Tetraciclina	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Clindamicina	2 µg	≥ 21	15-20	≤ 14
Cloranfenicol	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12

Fonte: (CLSI, 2018)

2.4 Resultados e discussão

Das amostras analisadas as de tanque, lira e forma tiveram contagens de Estafilococos coagulase positiva inferiores a $5 \log$ UFC/cm². Entre as amostras de massa

semicozida, salgada e queijos foram encontradas contagens variando entre 5,28 log UFC/g a 5,93 log UFC/g e nas amostras de leite foi observada uma contagem média de 6,34 log UFC/ml. Nas amostras de embalagens não foi observado crescimento.

Em queijo de coalho admite-se contagem máxima de 3 log UFC/g de *Estafilococos* coagulase positiva (BRASIL, 2019). Nas amostras de queijo de coalho analisadas neste estudo os valores encontrados foram superiores ao limite estabelecido na legislação, assim como em outros estudos realizados com queijo de coalho (PEREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). De acordo com a legislação europeia queijos artesanais com contagens de *Estafilococos* coagulase positiva superior a 5 log UFC/g devem ser analisados para a presença de enterotoxinas (ANDRETTA et al., 2019).

Além da contaminação no leite foram observadas contagens de *Estafilococos* coagulase positiva acima de 5 log UFC/g nas amostras de massa semicozida e salgada, indicando a permanência do microrganismo na cadeia produtiva do queijo de coalho. Os queijos fabricados com leite cru, geralmente, apresentam a flora bacteriana da sua matéria-prima, como o *Estafilococos* coagulase positiva é um patógeno comum em rebanhos bovinos as condições inadequadas da ordenha e manipulação do leite podem favorecer a permanência do microrganismo no queijo (HUMMERJOHANN et al., 2014).

Foram obtidos 208 isolados e destes 188 (90,4%) foram coagulase positivo e 20 (9,6%) coagulase negativo. Dos isolados coagulase positivo 95 foram positivos para *Staphylococcus aureus* e dos coagulase negativo 10 foram positivos para *S. aureus*, nenhum dos isolados foi positivo para *Staphylococcus hyicus*. Foram enviados 48 isolados para o sequenciamento Sanger e destes 91,6% não foram identificadas como nenhuma espécie conhecida. Dos isolados restantes dois isolados de queijo foram identificados como *Proteus vulgaris*, um isolado de lira como *Macrocooccus caseolyticus* e um isolado de tanque como *Enterobacter hormaechei*. Nessas amostras não foi realizado estudo de outros genes, visto não ser objetivo do trabalho.

Em estudo analisando a presença dos genes codificadores da enzima coagulase em isolados de *Staphylococcus* spp. foi possível encontrar 8,5% de amostras positivas para *S. aureus* em isolados coagulase negativos. Os autores encontraram diferenças entre os genes *coa* das diversas amostras analisadas a partir de variações nos seus resíduos de aminoácidos, demonstrando divergências entre a expressão dos genes codificadores da coagulase em diferentes cepas (CHMAG et al., 2019).

Das amostras onde foram observadas a presença de *S. aureus* houve maior incidência de genes produtores de enterotoxinas *sea*, seguido por *sec* e *seb*, não sendo encontrado os genes codificadores das enterotoxinas *sed* e *see* (Tabela 3).

Tabela 3. Genes e perfil de resistência a antibióticos identificados em *Staphylococcus aureus* isolados da produção de queijo de coalho.

Amostras (isolados)	Genes de enterotoxinas (%)	Genes de resistência a antibióticos (%)	agr type (%)
Leite (4)	<i>sea</i> (20%), <i>seb</i> (20%)	<i>mecA</i> (25%)	<i>agr</i> IV (25%)
Tanque (1)	-	-	-
Massa coagulada (8)	<i>sea</i> (38%), <i>sec</i> (13%)	<i>mecA</i> (50%)	<i>agr</i> III (13%)
Lira (6)	<i>sea</i> (50%), <i>sec</i> (50%)	<i>mecA</i> (50%)	<i>agr</i> III (33%)
Massa semicozida (13)	<i>sea</i> (23%) <i>sec</i> (8%)	<i>mecA</i> (62%)	<i>agr</i> I (15%), <i>agr</i> III (31%)
Massa salgada (13)	<i>sec</i> (8%)	<i>mecA</i> (62%)	<i>agr</i> I (8%), <i>agr</i> III (8%)
Forma (7)	<i>sea</i> (29%), <i>sec</i> (29%)	<i>mecA</i> (57%)	<i>agr</i> IV (14%)
Queijo (53)	<i>sea</i> (15%)	<i>mecA</i> (36%), <i>mecC</i> (8%)	<i>agr</i> I (8%), <i>agr</i> II (6%), <i>agr</i> III (9%)

Dos isolados obtidos no presente estudo a maior parte foi coagulase positiva e 50% deles foram identificados como *S. aureus*. Em variedade de queijo elaborado com leite cru e maturação inferior a 60 dias foram obtidas 69% de amostras com Estafilococos coagulase positiva e 97% dos isolados foram identificados como *S. aureus*, 2% como *Staphylococcus intermedius* e 1% de *Staphylococcus hyicus* (ROSEGREN et al., 2010). Em alimentos as espécies mais importantes, a nível de saúde pública, são o *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, e destes *S. aureus* é um mais implicado em surtos de intoxicação alimentar. As espécies mencionadas são produtoras de coagulase e esta é uma das provas utilizadas para correlacionar a cepa analisada com a produção de enterotoxinas (SANTANA et al., 2010).

No presente estudo o gene produtor de enterotoxina mais prevalente foi o da enterotoxina *sea* (19%) e em duas amostras (lira e massa semicozida) foram detectadas a presença de mais de um gene produtor de enterotoxina. Além da presença de genes produtores de enterotoxinas no queijo, com exceção do tanque, identificou-se esses superantígenos na produção do queijo, estando os genes produtores de enterotoxinas *sea* e *sec* presentes em 24,7% dos isolados. As enterotoxinas possuem estrutura compacta que confere resistência a ação enzimática e podem resistir a pasteurização, mantendo-se presentes até o produto final, sendo importante a aplicação das boas práticas em todas as etapas (DIAS et al., 2011).

Em queijo maturado elaborado a partir de leite bovino cru em fazendas da Noruega Central foram detectados genes produtores de enterotoxinas em 87,5% dos isolados, sendo a maioria produtor de mais de um gene, onde o mais comum foi o *sec* (MEHLI et al., 2017). A presença de *S. aureus* em produtos finais está relacionada a diversos fatores da produção, em especial à qualidade da matéria-prima utilizada, como o leite cru contaminado, assim como a manipuladores assintomáticos, que podem contaminar o produto em qualquer etapa de produção (CASTRO et al., 2020). A intoxicação estafilocócica é uma das causas mais importantes de surtos de doenças transmitidas por alimentos e ocorre principalmente pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas. Destas, as clássicas são responsáveis por até 95% dos surtos alimentares causados por *S. aureus* (ANDRETTA et al., 2019; BORGES et al., 2015).

Dos genes relacionados à resistência a antibióticos observou-se uma incidência elevada (45,7%) do gene *mecA*, estando o *mecC* presente em quatro amostras de queijo. Em relação aos isolados que apresentaram os genes *agr*, os quatro grupos foram encontrados na cadeia produtiva do queijo de coalho sendo o grupo *agr* III o mais prevalente (12,7%) nas amostras estudadas. Nas amostras do *swab* do tanque foi observado um isolado de *S. aureus* e este não apresentou gene de resistência ou virulência.

Entre os genes de resistência a antibióticos o *mecA* esteve presente em todo o processo de produção do queijo de coalho, iniciando sua detecção no leite, nos utensílios utilizados no processo até o produto final. Analisando leite bovino proveniente da Índia também foi possível confirmar o gene *mecA* em cepas de *S. aureus* (MAHANTI et al., 2020). Através da detecção dos genes *mecA* e *mecC* se indica a cepa como MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina) (QUIJADA et al., 2019). O MRSA a

princípio era isolado de amostras clínicas e ultimamente tem sido isolado de alimentos de origem animal, principalmente leite e derivados, alertando para sua disseminação através da cadeia produtiva de alimentos (FILIPELLO et al., 2018).

Cepas de *S. aureus* podem abrigar diferentes genes de virulência que codificam para a produção de enterotoxinas, de resistência a antibióticos e de genes acessórios de regulação (BASANISI et al., 2015). Os genes acessórios de regulação possuem quatro alelos (I, II, III e IV) e acredita-se que os grupos I e II estão mais envolvidos em intoxicações alimentares mediadas por enterotoxinas, o grupo III com a síndrome do choque tóxico e o grupo IV com a produção de exotoxinas esfoliativas (JARRAUD et al., 2001; 2002). No presente estudo nas amostras onde foram encontrados o gene *agr* também foram identificados genes produtores de enterotoxinas.

Avaliando o perfil fenotípico de resistência a antibióticos observou-se que as cepas analisadas apresentaram resistência aos antibióticos penicilina, oxacilina, eritromicina, clindamicina, cefoxitina e tetraciclina (Tabela 4). Além disso, algumas amostras apresentaram ação intermediária sobre a gentamicina e tobramicina.

Tabela 4. Perfil fenotípico de resistência a antibióticos das cepas de *S. aureus* isoladas da produção de queijo de coalho artesanal.

Amostras (isolados)	Isolados sensíveis a antibióticos (%)	Isolados intermediários a antibióticos (%)	Isolados resistentes a antibióticos (%)
Leite (4)	TET (75%), CLO (100%), CEF (75%), GEN (100%), TOB (100%) ERI (25%), CLI (25%)	TET (25%)	CEF (25%), PEN (100%), OXA (100%), ERI (75%), CLI (75%)
Tanque (1)	TET (100%), CLO (100%), CEF (100%), GEN (100%), TOB (100%)	-	PEN (100%), OXA (100%), ERI (100%), CLI (100%)

Continua

Amostras (isolados)	Isolados sensíveis a antibióticos (%)	Isolados intermediários a antibióticos (%)	Isolados resistentes a antibióticos (%)
Massa coagulada (8)	TET (75%), CLO (100%), CEF (75%), PEN (12,5%), GEN (87,5%), TOB (100%), ERI (25%), CLI (25%)	GEN (12,5%)	TET (25%), PEN (87,5%), OXA (100%), CEF (25%), ERI (75%), CLI (75%)
Lira (6)	TET (33%), CLO (100%), CEF (67%), OXA (17%), GEN (100%), TOB (100%), ERI (33%), CLI (33%)	-	TET (67%), CEF (33%), PEN (100%), OXA (83%), ERI (67%), CLI (67%)
Massa semicozida (13)	TET (69%), PEN (2), OXA (1), CLO (13), CEF (11), GEN (13), TOB (13), ERI (4), CLI (4)	-	TET (31%), CEF (2), PEN (11), OXA (12), ERI (9), CLI (9)
Massa salgada (13)	TET (61%), CLO (13), CEF (85%), PEN (15%), oxa (8%), GEN (100%), TOB (100%), ERI (31%), CLI (31%)	TET (8%)	TET (31%), CEF (15%), PEN (85%), OXA (92%), ERI (69%), CLI (69%)
Forma (7)	TET (86%), CLO (100%), CEF (100%), GEN (100%), TOB (100%), ERI (14%), CLI (14%)	TET (14%)	PEN (100%), OXA (100%), ERI (86%), CLI (86%)
Queijo (53)	TET (77%), CLO (100%), CEF (85%), PEN (13%), OXA (15%), GEN (94%), TOB (96%), ERI (21%), CLI (21%)	TET (14%), GEN (6%), TOB (4%)	TET (9%), CEF (15%), PEN (87%), OXA (85%), ERI (79%), CLI (79%)

TET = tetraciclina; PEN = penicilina; OXA = oxacilina; CEF = cefoxitina; ERI = eritromicina; CLI = clindamicina; GEN = gentamicina; CLO = cloranfenicol; TOB = tobramicina.

A resistência a antibióticos observada em cepas de *S. aureus* é vista como preocupante em termos de saúde pública e o uso indiscriminado de antibióticos no

tratamento de patologias bovinas, como a mastite, tem sido discutido por questões econômicas e por favorecer o desenvolvimento da resistência nos microrganismos (KAPELLI et al., 2019). No presente estudo observou-se cepas de *S. aureus* resistente a antibióticos em todo o processo de produção do queijo de coalho com maior prevalência de resistência aos antibióticos penicilina, oxacilina, eritromicina e clindamicina, onde 79% dos isolados apresentou resistência simultânea a esses quatro antibióticos.

As cepas de *S. aureus* podem apresentar resistência a um ou a vários antibióticos, o que representa grave problema de saúde pública, principalmente o MRSA. Esse tipo de microrganismo assim como a resistência múltipla são características de cepas de origem humana (SPANU et al., 2012). Na cadeia produtiva de laticínios da Grécia foi encontrada elevada frequência de resistência a penicilina, amoxicilina e eritromicina e 14,5% dos isolados foram identificados como MRSA (PAPADOPOULOS et al., 2019).

Em queijos artesanais a utilização de leite cru é justificada pela manutenção das características organolépticas do produto, no entanto essa matéria-prima se apresenta como uma fonte inicial de contaminação do produto por *S. aureus*, interferindo na qualidade final do queijo (FILIPELLO et al., 2018). Na elaboração de queijos artesanais o conhecimento e a preocupação com a segurança alimentar são fundamentais, tendo em vista o potencial patogênico do *S. aureus* e as consequências que podem trazer a saúde do consumidor (MEHLI et al., 2017).

2.5 Conclusão

Este estudo demonstrou a elevada contaminação de queijo de coalho artesanal por *Staphylococcus aureus* e o perfil enterotoxigênico desse microrganismo. No processo de produção do queijo de coalho, com exceção da embalagem, foi observada presença do Estafilococos coagulase positiva em contagens elevadas, assim como a presença de genes produtores de enterotoxinas, genes de resistência a antibióticos e genes acessórios de regulação, demonstrando assim as condições precárias de fabricação do queijo de coalho e a necessidade de melhorar a qualidade higiênica do processo produtivo desse tipo de queijo, visando reduzir o risco de intoxicação alimentar por ingestão desse alimento.

Referências

ANDRETTA, M. et al. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 10790-10798, 2019.

AHMED A. A. et al. Incidence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in milk and Egyptian artisanal dairy products. **Food Control**, v. 104, p. 20-27, 2019.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), 2018. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – Informe 2018. Acesso em 10 de dezembro de 2019. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta----o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>.

ARAGÃO, B. B. et al. Short communication: High frequency of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in artisanal coalho cheese made from goat milk produced in northeastern Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 6923-6927, 2019.

BABIĆ, M. et al. Expression of toxic shock syndrome toxin-1 gene of *Staphylococcus aureus* in milk: Proof of concept. **Mljekarstvo**, v. 68, n. 1, p. 12-20, 2018.

BANASINI, M. G. et al. Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in Southern Italy. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 17-19, 2016.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instrução Normativa n. 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, 26 de dezembro de 2019.

CAN, H. Y.; ÇELIK, T. H. Detection of enterotoxigenic and antimicrobial resistant *S. aureus* in Turkish cheeses. **Food Control**, v. 24, p. 100-103, 2012.

CASTRO, R. D. et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from the production processo f Minas artisanal cheese from the region of Campo das Vertentesm Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 3, p. 2098-2110. 2020.

CHMAGH, A. A. et al. Comparison between the coagulase (*coa* and *vwb*) genes in *Staphylococcus aureus* and other staphylococci. **Gene Reports**, v. 16, 2019.

CLSI. **M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Clinical and Laboratory Standards Institute, v. 28th Ed., p. 01–296, 2018.

CUNY, C. et al. Rare Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a Novel *mecA* Homologue in Humans in Germany. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1–5, 2011.

DIAS, N. L. et al. Detecção dos genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à meticilina em leite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1547-1552, 2011.

DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination os foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 676p. 2001.

- ETET, P. F. S. et al. **Signaling pathways sustaining antibiotic resistance: lessons from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. In: Kon K.; Rai, M. Ed(s). Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. Elsevier, 2016, p. 37-62.
- FERREIRA, M. A. et al. Virulence profile and genetic variability of *Staphylococcus aureus* isolated from artisanal cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8589-8597, 2016.
- FILIPELLO, V. et al. G. Molecular characterization and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from the dairy production chain in Northern Italy. **International Dairy Journal**, v. 91, p. 110-118, 2019.
- GÓMEZ-SANZ, E. et al. Detection, molecular characterization, and clonal diversity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and CC97 in Spanish slaughter pigs of different age groups. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 10, p. 1269–1277, 2010.
- HUMMERJOHANN, J. et al. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1-8, 2014.
- JARRAUD, S. et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 631–641, 2002.
- JARRAUD, S. et al. *egc*, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669–677, 2001.
- JOHLER, S. et al. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by *egc*-Encoded Enterotoxins. **Toxins**, v. 7, p. 997-1004, 2015.
- JOHLER, S. et al. Short communication: Characterization of *Staphylococcus aureus* along the raw milk cheese production process in artisan dairies in Italy. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-6, 2018.
- JOHNSON, W. M. et al. Detection of Genes for Enterotoxins, Exfoliative Toxins, and Toxic Shock Syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 426–430, 1991.
- KÄPPELI, N. et al. *Staphylococcus aureus* related to bovine mastitis in Switzerland: Clonal diversity, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of isolates collected throughout 2017. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1-8, 2019.
- MAHANTI, A. et al. Characterization of methicillin-resistant and enterotoxins producing *Staphylococcus aureus* in bovine milk in India. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, 2020.
- MEHLI, L. et al. The prevalence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and cheese from artisan farm dairies. **International Dairy Journal**, v. 65, p. 20-27, 2017.
- MEHROTRA, M.; WANG, G.; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of

genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032–1035, 2000.

OBAIDAT, M. M. et al. Antibiotic-resistance, enterotoxin gene profiles and farm-level prevalence of *Staphylococcus aureus* in cow, sheep and goat bulk tank milk in Jordan. **Internarional Dairy Journal**, v. 81, p. 28-34, 2018.

OLIVEIRA, F. I. P. et al. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo coalho. **Cadernos ESP**, v. 13, n. 2, p. 82-93, 2019.

PAPADOULOS, P. et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from dairy industries in north-central and north-eastern Greece. **International Journal of Food Microbiology**, v. 291, p. 35-41, 2019.

PEREIRA, C. T. M. et al. Microbiology quality, detection of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and Coalho cheese. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 5, p. 1957-1968, 2018.

POYART, C. et al. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the *sodA* gene as a target. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4296–4301, 2001.

QUIJADA, N. M. et al. Oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus* associated with processed food in Europe. **Food Microbiology**, v. 82, p. 107-110, 2019.

ROSENGREN, A. et al. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 263-269, 2010.

SANTANA, E. B. W. et al. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765–769, 2010.

SHOPSIN, B. et al. Prevalence of agr specificity groups among *Staphylococcus aureus* strains colonizing children and their guardians. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 456–459, 2003.

SPANU, V. et al. Virulence factors and genetic variability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw sheep's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 53-57, 2012.

XING, X. et al. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from goat milk powder processing plants. **Food Control**, v. 59, p. 644-650, 2016.

3 CAPÍTULO III: UTILIZAÇÃO DE SAL COM MIX DE ERVAS EM QUEIJO FRESCO

3.1 Resumo

A produção de queijo fresco com diferentes proporções de ervas em substituição parcial ao cloreto de sódio foi proposta. Para tanto, foram fabricados três tipos de queijo com redução de 30% do teor de cloreto de sódio e sua substituição por 30% (CH30), 22,2% (CH22,2) e 12,5% (CH12,5) de ervas, além do lote controle (CC), todos em triplicata. Para todos os tratamentos foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicas e sensorial, durante 10 dias de armazenamento refrigerado. As amostras CH30 apresentaram crescimento de bactérias mesófilas e halófilas semelhante ao controle, e proporcionaram redução nas contagens de *Estafilococos coagulase positiva* até o quinto dia de armazenamento (5,64 log UFC/g). Foi observada uma mudança de cor (coordenadas a^* e b^*) indicando o escurecimento do queijo com a adição das ervas, entretanto, esta alteração não foi perceptível aos provadores, além disso uma redução ($p < 0,05$) no teor de sódio foi observada nos queijos com ervas. Para o perfil de textura as amostras com menor teor de ervas (CH12,5) apresentaram resultados semelhantes ao controle para elasticidade, mantendo a dureza estável durante o armazenamento. Na análise sensorial onde o queijo com adição de 12,5% de ervas apresentou a maior pontuação para sabor (7,21) e aceitação global (7,33). A partir dos resultados encontrados conclui-se que a redução do cloreto de sódio em queijo de coalho e sua substituição por ervas pode ser uma alternativa à elaboração de um produto com características sensoriais aceitáveis e reduzido teor de sódio.

Palavras-chave: tecnologia de queijos; sal de ervas; qualidade nutricional; redução de sódio.

3.2 Introdução

O consumo excessivo de sódio é considerado um problema de saúde pública e pode ocasionar problemas, como doenças cardiovasculares, renais, câncer gástrico e osteoporose (ISRAR et al., 2016). Entre as patologias associadas ao consumo excessivo de sódio a hipertensão apresenta relação com a proporção dietética de sódio e potássio em pessoas que apresentam quadro de sobrepeso (NDANUKO et al., 2017).

Os queijos, assim como as carnes conservadas salgadas, carnes processadas, bolachas, sanduíches, pizza e pães, fazem parte de um grupo de alimentos que contribuem com até 25% da ingestão diária média de sódio pela população brasileira (SOUZA et al.,

2013). Diante disso, as organizações mundiais de saúde pública vêm orientando sobre a importância da redução no consumo do sal. Nessa abordagem um dos objetivos é reduzir a adição nos alimentos, durante sua fabricação. Em queijos a questão principal é como reduzir o sal sem interferir nas propriedades tecnológicas e sensoriais. Estudos têm buscando alternativas que mantenham ou aumentem o sabor salgado nos queijos, como substituição parcial do sódio por CaCl_2 , KCl e MgCl_2 (GORE et al., 2019).

Os queijos frescos são produtos que podem apresentar uma vida útil reduzida em virtude do crescimento microbiano resultante da intensa manipulação na sua elaboração. Esse aspecto levanta a necessidade de utilização de ingredientes que melhorem a qualidade microbiológica desses produtos e aumentem a sua vida útil (EL GALIOU et al., 2015). Diante da maior demanda por produtos saudáveis e livres de conservantes sintéticos pelos consumidores, as ervas e especiarias são consideradas alternativas para conservação de alimentos (MARTÍNEZ-GRACIÁ et al., 2015).

Consideradas mais saudáveis que os conservantes sintéticos, as ervas podem preservar a qualidade microbiológica do produto, proporcionar maior atividade antioxidante e características sensoriais desejáveis (SHAN et al., 2011). Em amostras de queijo “Serra da Estrela” a utilização de folhas secas de manjericão apresentou resultados satisfatórios para inibição de bactérias proteolíticas, não sendo observada contaminação no interior do produto em um período de seis meses (CAROCHO et al., 2016).

O sal de ervas é uma mistura de sal de cozinha com ervas, como manjericão, alecrim e orégano desidratado em proporções iguais, utilizando como alternativa ao uso apenas do sal, por aumentar o conteúdo de antioxidantes, reduzir oxidação lipídica e manter a conservação do alimento ao qual é adicionado (SANTOS, 2017). A substituição parcial de sal por ervas em queijo de coalho surge como uma possibilidade de reformulação do queijo e essa utilização visa garantir a qualidade e melhorar o seu teor nutricional. Diante disso, objetivou-se elaborar uma variedade de queijo fresco com substituição parcial do cloreto de sódio por um sal acrescido de ervas (alecrim, manjericão e orégano) e analisar a qualidade e aceitação dessas formulações.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Elaboração dos queijos

O queijo fresco utilizado no estudo foi o queijo de coalho, para sua fabricação o leite bovino utilizado foi pasteurizado e analisado quanto ao crescimento de bactérias mesófilas. Os queijos foram elaborados no Laboratório de Inspeção de Alimentos de Origem Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, utilizando as técnicas artesanais de fabricação e aplicando as boas práticas de fabricação.

Para tanto, após a pasteurização resfriou-se o leite até 35°C e adicionou-se cloreto de cálcio e coagulante (Halamix - Chr. Hansen A/S). Após o período de coagulação (60 minutos), a coalhada formada foi cortada em cubos grandes e posteriormente em cubos pequenos, ficando em repouso por alguns minutos. Em seguida, realizou-se a primeira dessoragem, onde retirou-se parte do soro que foi aquecido para o cozimento da massa. Posterior ao cozimento procedeu-se a segunda dessoragem, salga (com o cloreto de sódio e ervas) e prensagem (BRASIL, 2001). Após a elaboração, os queijos foram armazenados durante dez dias em refrigeração (10 a 12°C) para análises posteriores.

3.3.2 Elaboração do sal com ervas e adição aos queijos

Foram utilizadas três ervas: alecrim (*Rosmarinus officinalis*), manjericão (*Ocimum basilicum*) e orégano (*Origanum vulgare*). As ervas foram obtidas desidratadas, devidamente embaladas e no prazo de validade, no mercado local. Para preparação do sal com ervas foi utilizado o sal marinho refinado obtido em comércio local, sendo adicionado de diferentes porcentagens de ervas e homogeneizado em liquidificador, resultando em um sal com ervas. O sal com ervas foi adicionado na etapa de salga dos queijos, obtendo-se quatro formulações diferentes: CC (queijo sem adição de ervas), CH 12,5 (queijo com 12,5% de ervas no sal), CH 22,2 (queijo com 22,2% de ervas no sal) e CH 30 (queijo com 30% de ervas no sal) (Tabela 1).

Tabela 1. Ingredientes e quantidades das quatro formulações de queijo de coalho adicionado de ervas.

Ingredientes e quantidades para 1000g de queijo	Tratamentos			
	CC	CH 12,5	CH 22,2	CH 30
Leite pasteurizado	10 L	10 L	10 L	10 L
Cloreto de cálcio	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml
Coagulante	1 g	1 g	1 g	1 g
Cloreto de sódio	150 g	105 g	105 g	105 g
Mistura das ervas	-	15 g (5 g de cada)	30 g (10 g de cada)	45g (15 g de cada)

CC = queijo controle; CH 12,5 = queijo com 12,5% de ervas no sal; CH 22,2 = queijo com 22,2% de ervas no sal; CH 30 = queijo com 30% de ervas no sal

3.3.3 Qualidade microbiológica durante armazenamento

Foram pesados, de forma asséptica, 25 g de queijo que foram transferidos para sacos plásticos estéreis, aos quais foram adicionadas 225 ml de água peptonada tamponada para homogeneização em “Stomacher” durante 2 minutos, onde obteve-se a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram realizadas as demais diluições até 10^{-5} . Após as diluições, as amostras foram submetidas a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas, bactérias halófilas, estafilococos coagulase positiva, e detecção de *Salmonella* sp., utilizando a metodologia descrita pela American Public Health Association (DOWNES; ITO, 2001). As análises foram realizadas durante os dias 1, 5 e 10 de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

3.3.4 Características físicas, cor e perfil de textura durante armazenamento

Durante os dias de armazenamento (1, 5 e 10) aferiu-se o pH das amostras utilizando um medidor de pH/temperatura para alimentos e laticínios HANNA[®] modelo HI 99161. A medida foi realizada por introdução da ponteira em três pontos distintos de cada queijo, sendo a ponteira higienizada entre as aferições.

A análise de acidez foi realizada através do método de acidez titulável, onde uma alíquota da amostra homogeneizada com água deionizada foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1N, utilizando como indicador a solução alcoólica de fenolftaleína

a 1%. O resultado foi dado como porcentagem de ácido láctico presente no queijo e a análise foi realizada em triplicata (BRASIL, 2018a).

A cor dos queijos foi aferida em três pontos distintos por amostra, através do colorímetro Konica Minolta, CM-700d/600d (Sistema CIE L*a*b*), cujo sistema considera as coordenadas L* luminosidade (preto/branco), a* teor de vermelho (verde/vermelho) e b* teor de amarelo (azul/amarelo).

O perfil de textura foi avaliado através de teste de dupla compressão, com peso constante, utilizando cilindro de alumínio de 25 mm de diâmetro (P/1SP), em analisador de textura TA-XT2 (Stable Microsystems). Os dados foram coletados através do programa “Exponent Lite Express” – versão 5.1. Foram analisados os atributos primários dureza, coesividade, adesividade, viscosidade e elasticidade e o atributo secundário gomosidade. Foram empregados os seguintes parâmetros: amostras de queijo com altura de 2 cm, diâmetro de 2 cm e temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras cilíndricas dos queijos foram comprimidas até 50% de sua altura inicial a uma velocidade de 1mm/s.

3.3.5 Composição dos queijos

Após a elaboração, de forma pontual, avaliaram-se alguns dos constituintes dos queijos, relacionados a sua qualidade. As amostras foram analisadas quanto ao teor de umidade, utilizando o método de secagem em estufa a 102°C até obtenção de massa constante. A porcentagem de gordura foi analisada através do método de Gerber, onde o ataque da matéria orgânica pelo ácido sulfúrico permite a liberação da gordura que é carregada pelo álcool amílico, durante centrifugação, permitindo a leitura da porcentagem de gordura presente na amostra diretamente no butirômetro. Com este resultado calculou-se o conteúdo de lipídios nos sólidos totais. O teor de cinzas foi determinado por incineração da amostra em mufla a 550°C , obtendo como resultado o teor de matéria inorgânica do alimento. As cinzas brancas foram usadas para avaliar o teor de cloretos. Este foi analisado pelo método argentométrico que se baseia na reação do nitrato de prata com os cloretos, em presença do indicador cromato de potássio. Ao final da reação obteve-se a porcentagem de cloreto de sódio presente nos queijos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e seguindo as determinações para análise de queijos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2018a).

Para análise do teor de sódio foram pesados aproximadamente 4g de amostra em cadinhos de porcelana e estas foram carbonizadas e incineradas em forno mufla a 525°C e em seguida, esfriadas. As cinzas obtidas foram solubilizadas em ácido nítrico e filtradas. O filtrado obtido foi adicionado de água deionizada até o volume de 100 mL e lido diretamente em fotômetro de chama. O ensaio foi realizado em triplicata, sendo o resultado expresso como a média das amostras em $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ (BRASIL, 2014).

3.3.6 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada em cabines individuais, com iluminação e ventilação apropriadas, sem ruídos. As amostras foram servidas em porções de 25g cada, em formato retangular semelhante, em pratos descartáveis brancos, codificadas com números de três dígitos de forma aleatória. Foram servidas em temperatura ambiente, acompanhadas de biscoito água e sal e água mineral para remoção do sabor residual. O teste realizado foi o teste de aceitação, onde avaliaram-se os atributos de cor, aroma, sabor e textura, além de análise de intenção de compra e aceitação global. Os provadores receberam as quatro amostras e foram orientados a responder o teste de acordo com as suas percepções (APÊNDICE 1).

Este trabalho foi submetido a avaliação e apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), através da Plataforma Brasil, e aprovado (Protocolo nº 58596116.8.0000.5294; Número de comprovante: 079217/2016).

3.3.7 Análise estatística

Observou-se a homoscedasticidade e normalidade dos dados, não havendo *outliers*, após os quais os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes t de Student e Tukey a 5% de significância, utilizando o software estatístico R, versão 3.5.0 (R Core Team).

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Qualidade microbiológica durante armazenamento

O leite utilizado como matéria-prima apresentou qualidade adequada para elaboração dos queijos, não havendo contagem de bactérias mesófilas superior a 1×10^4 UFC/g (BRASIL, 2018b). Para as contagens de bactérias mesófilas e halófilas nos

queijos frescos estudados observou-se aumento com os dias de armazenamento, onde os tratamentos apresentaram resultados de crescimento semelhantes ao controle (Figuras 1 e 2).

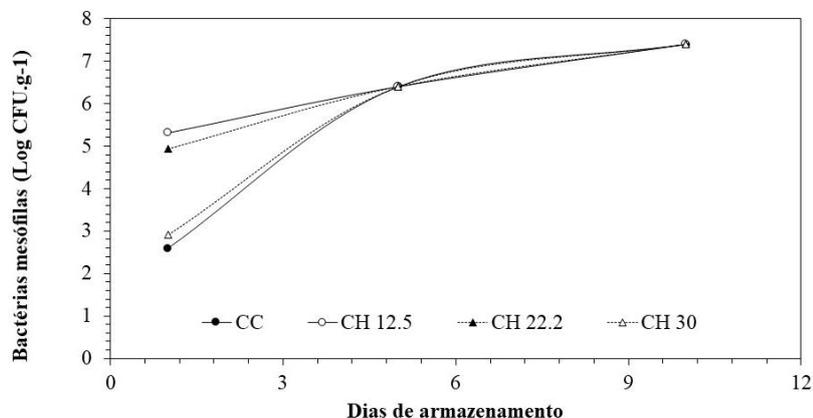


Figura 1. Crescimento de bactérias mesófilas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

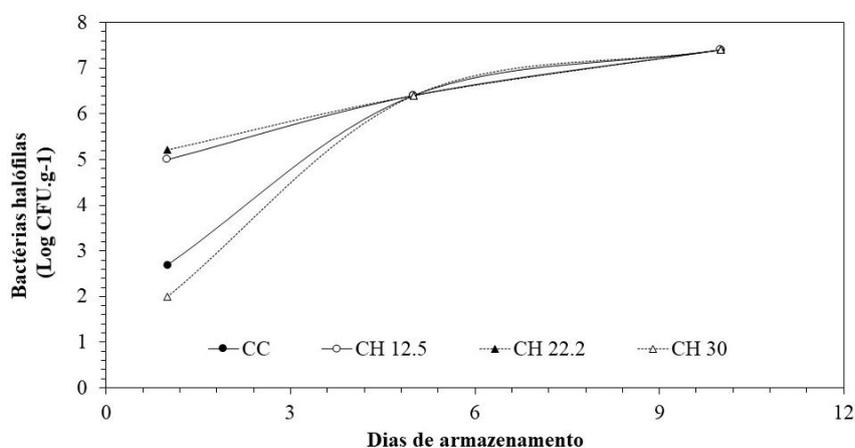


Figura 2. Crescimento de bactérias halófilas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^{\circ}\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

O sal é utilizado como conservante alimentar desde os primórdios. Em queijos, sua utilização objetiva alcançar o sabor desejável, prover conteúdo de sódio, necessário

às funções fisiológicas humanas, e contribuir com a conservação, uma vez que o sal diminui a atividade de água do alimento o que influencia no crescimento microbiano (GUINEE, 2004). Neste estudo, a adição de ervas (CH 30), em substituição parcial do sal, conseguiu reduzir as contagens de estafilococos coagulase positiva e de bactérias psicrotróficas (Figuras 3 e 4, respectivamente) mantendo até o quinto dia de armazenamento contagens semelhantes ao queijo controle. Em relação a análise de *Salmonella* sp. não foi observada presença em nenhum lote de queijo.

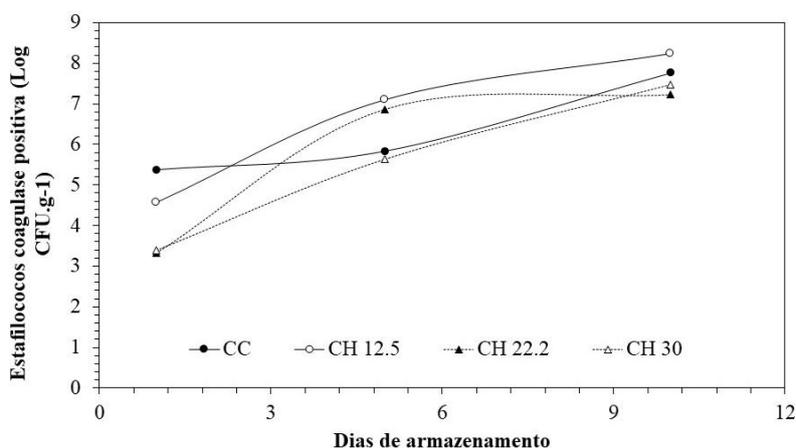


Figura 3. Crescimento de estafilococos coagulase positiva em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

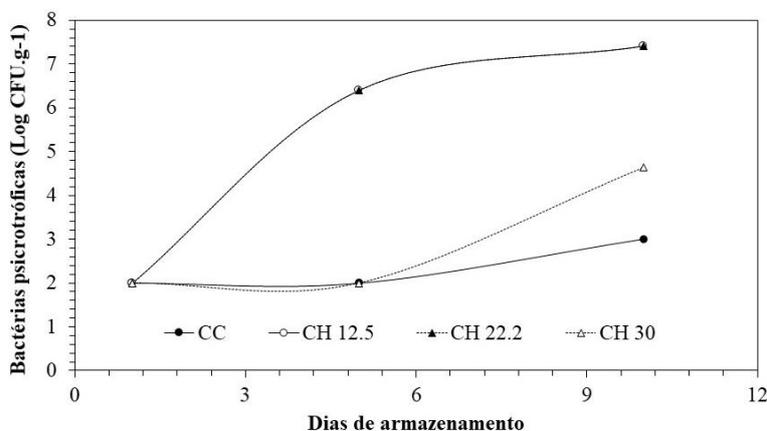


Figura 4. Crescimento de bactérias psicrotróficas em queijo fresco durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com

adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

Os óleos essenciais e os extratos de plantas apresentam compostos que são secretados como metabólitos secundários e desempenham a atividade antimicrobiana observada nesses produtos. Esses compostos atuam na defesa da própria planta contra bactérias e fungos e consistem em terpenos, hidrocarbonetos, aldeídos alifáticos, álcoois, ésteres e outros compostos. Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente elucidado, sabe-se que esses compostos alteram a permeabilidade celular dos microrganismos e interferem no metabolismo destes, levando à morte celular (KHORSHIDIAN et al., 2018).

A utilização de um mix de ervas pode potencializar a ação antimicrobiana dos compostos, sendo observado ação sobre bactérias patogênicas, como *Listeria monocytogenes*. O emprego de ervas além de contribuir para a segurança alimentar, em termos microbiológicos, colabora para a redução na utilização de conservantes artificiais, podendo ser um elemento de marketing na produção e comercialização de alimentos (LOBACZ et al., 2016).

Em amostras de queijo de coalho o óleo essencial de alecrim demonstrou ação inibitória sobre cepas EC16 de *Escherichia coli*, conseguindo uma redução de 2.3 ciclos logarítmicos em um intervalo de 24 horas (RIBEIRO et al., 2013). Outras ervas também apresentaram ação inibitória sobre microrganismos patogênicos e deteriorantes. O óleo essencial de orégano apresentou ação inibitória sobre *Staphylococcus aureus* e sobre bactérias mesófilas, tanto *in vitro* quanto em matrizes alimentares, como queijos frescos de ovelha e ricota (AMASTITE et al., 2014; ASENSIO et al., 2014).

3.4.2 Aspectos físicos, cor e perfil de textura durante armazenamento

Nas amostras avaliadas de queijo, os valores de acidez mantiveram-se estáveis durante os dias de armazenamento e entre os tratamentos analisados. O mesmo foi observado para o pH até o quinto dia de armazenamento, os queijos adicionados de ervas apresentaram valores de pH inferiores ($p < 0,05$) ao queijo controle (Figuras 5 e 6).

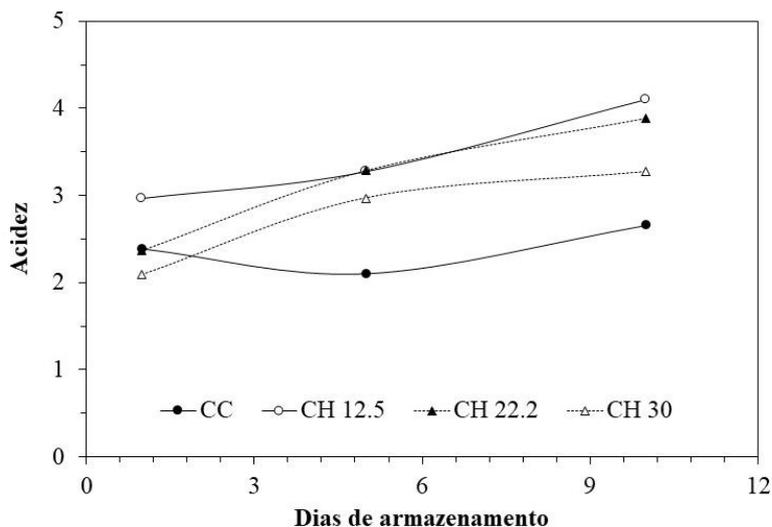


Figura 5. Avaliação da acidez (mg ácido láctico/ 100g) durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) dos queijos. CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

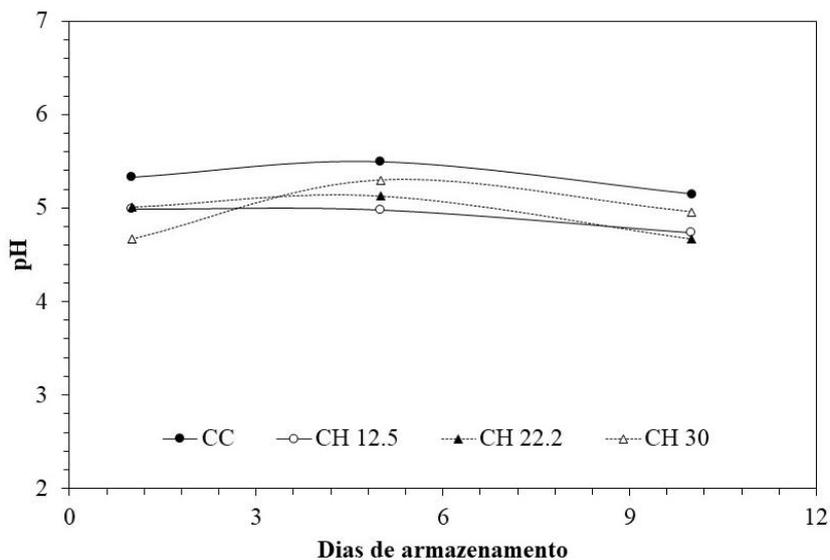


Figura 6. Avaliação do pH durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$) dos queijos. CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

A acidez, verificada através da mensuração do pH ou da quantificação de ácido láctico, é um parâmetro importante relacionado a qualidade de um queijo, exercendo

influência sobre o crescimento microbiano e especialmente sobre propriedades funcionais e aspectos de qualidade, como a capacidade de derretimento de um queijo (JOHNSON, 2017).

Os queijos frescos, como o de coalho, apresentam maiores valores de pH e consequentemente menor acidez, quando comparados aos queijos que sofrem processo de maturação e alterações mais pronunciadas em sua composição, além de não sofrerem variações pronunciadas em poucos dias de armazenamento (FREITAS; MALCATA, 2000).

Em relação a cor dos queijos estudados não foram observadas variações das coordenadas durante os dias de análise (Figuras 7, 8 e 9), mantendo-se a característica sensorial de cor estável até o décimo dia de armazenamento. A luminosidade foi maior na amostra controle, reduzindo à medida que o teor de ervas aumentou, o que era esperado em virtude da mudança de cor provocada pela adição das ervas ao queijo. Em relação a coordenada a^* foi observado aumento ($p < 0,05$) da cor vermelha na amostra com maior teor de ervas (30%), quando comparada aos demais tratamentos e para coordenada b^* maior teor ($p < 0,05$) de amarelo foi observado nas amostras com adição das ervas, sendo todas superiores ao queijo controle.

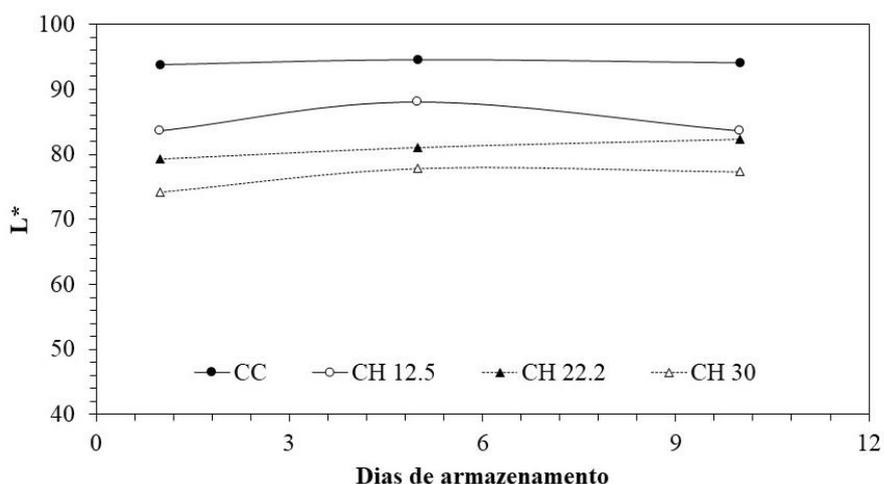


Figura 7. Valores médios do parâmetro de cor L^* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

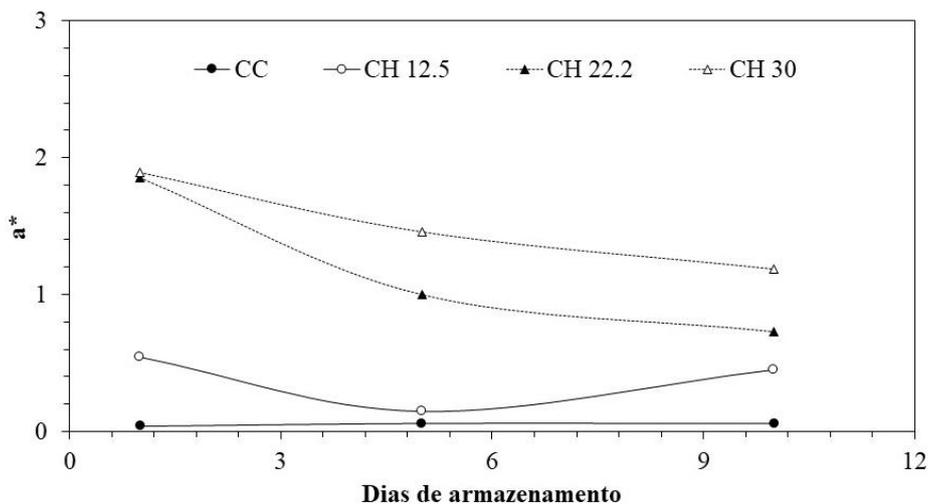


Figura 8. Valores médios do parâmetro de cor a^* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

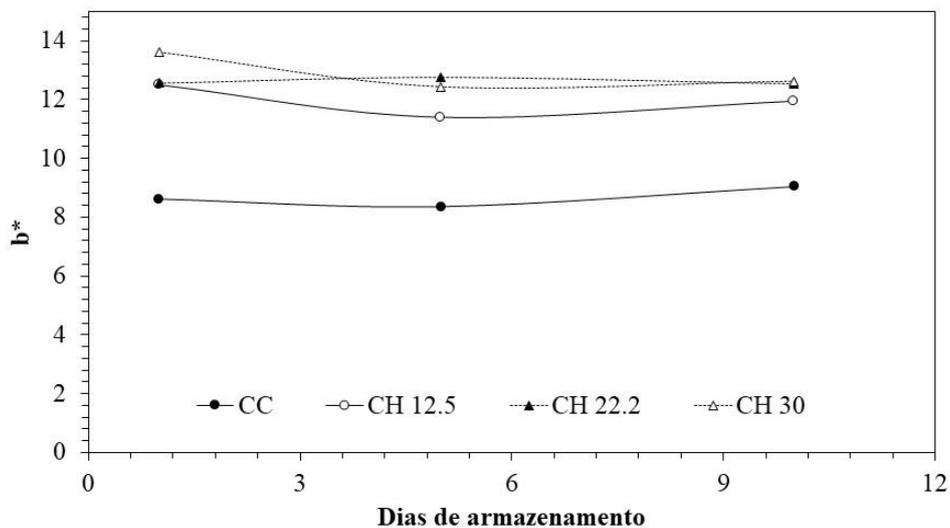


Figura 9. Valores médios do parâmetro de cor b^* dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

A cor é um atributo que se relaciona com a qualidade e conformidade de um produto. É usada pela indústria para atrair os consumidores, pois estes tendem a associar

as cores dos alimentos a seu sabor, sendo um dos primeiros atributos observados no momento da compra (WADHWANI; MCMAHON, 2012). Boroski et al. (2012) também observaram decréscimo na luminosidade e aumento nas coordenadas a^* e b^* com a adição de extratos e óleos essenciais de orégano em bebidas lácteas. A intensidade de cores verde e vermelha aumenta com a presença de compostos fenólicos, estes presentes em tecidos vegetais, como as ervas, promovem mudanças na coloração aos produtos aos quais são adicionados (SCHAMBERGER; LABUZA, 2007).

Para o perfil de textura observou-se que apenas o queijo com adição de 12,5% de ervas (CH 12,5) manteve a estabilidade para dureza durante os dias de armazenamento, mantendo as características de elasticidade semelhantes ao queijo controle. Analisando coesividade, viscosidade e gomosidade, nenhuma variação ($p < 0,05$) foi observada durante os dias de armazenamento para nenhum tratamento (Tabela 2). A textura é um importante fator observado pelo consumidor e correlacionado aos atributos sensoriais. Analisando o perfil de textura pode-se estabelecer correlações com a textura perceptível pela mastigação na análise sensorial, sendo um fator determinante para aceitação do produto (FOEGEDING; DRAK, 2007; LAMICHHANE et al., 2018).

Tabela 2. Efeito da substituição parcial do sal por ervas sobre o perfil de textura de queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$).

Dias de armazenamento	Análise de perfil de textura	Tratamentos				CV (%)
		CC	CH 12,5	CH 22,2	CH 30	
0	Dureza	1,39 Ac	2,58 Ab	2,81 Ab	3,58 Aa	4,23
5		1,36 Ac	2,84 Ab	3,03 Aab	3,37 Aa	
10		1,90 Bd	2,70 Ac	3,35 Bb	4,12 Ba	
0	Adesividade	-0,23 Ac	-15,23 Aa	-10,21 Ab	-12,23 Aab	11,89
5		-0,43 Ac	-13,22 Aa	-9,87 Ab	-11,45 Aab	
10		-0,29 Ac	-14,21 Aa	-10,78 Ab	-11,76 Ab	
0	Elasticidade	0,880 Aa	0,890 Aa	0,890 Aa	0,897 Aa	9,21
5		0,889 Aa	0,889 Aa	0,895 Aa	0,901 Aa	
10		0,811 Bb	0,871 Aa	0,885 Aa	0,898 Aa	
0	Coesividade	0,51 Ac	0,64 Ab	0,78 Aa	0,81 Aa	10,87
5		0,50 Ac	0,68 Ab	0,80 Aa	0,81 Aa	
10		0,54 Ac	0,70 Ab	0,81 Aa	0,81 Aa	
0	Gomosidade	0,57 Ab	2,03 Aa	2,22 Aa	2,28 Aa	6,02
5		0,54 Ac	2,07 Ab	2,13 Aab	2,35 Aa	
10		0,51 Ab	2,05 Aa	2,06 Aa	2,19 Aa	
0	Viscosidade	0,51 Ab	1,81 Aa	1,98 Aa	2,05 Aa	12,32
5		0,54 Ab	1,91 Aa	1,98 Aa	2,07 Aa	
10		0,6 Ac	2,02 Ab	2,25 Aab	2,38 Aa	

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferença entre os tempos de armazenamento pelo teste Tukey 5%.

^{a, b, c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste Tukey 5%.

3.4.3 Composição química

A adição de ervas aos queijos não provocou modificações no teor de lipídios e de cinzas em relação ao queijo controle, sendo observada apenas redução ($p < 0,05$) no teor de umidade do queijo com 30% de ervas (CH 30), o que se justifica pela maior concentração de ervas adicionadas em relação aos outros queijos, assim como maior teor ($p < 0,05$) de cloretos no queijo controle, uma vez que este apresenta o maior teor de sal adicionado. A análise do teor de sódio e de cloretos comprovaram a redução do sal nos queijos adicionados de ervas, por sua concentração significativamente maior ($p < 0,05$) no queijo controle (CC) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados de composição química dos queijos analisados durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$).

	CC	CH 12,5	CH 22,2	CH 30	CV (%)
Umidade (%)	49,15 a	53,31 a	50,00 a	38,40 b	4,09
Cinzas (%)	6,53 a	4,58 a	4,22 a	6,51 a	15,76
Lipídios* (%)	39,37 a	44,26 a	36,66 a	35,48 a	5,04
Cloretos (%)	5,27 a	3,42 b	3,41 b	2,06 b	8,63
Teor de sódio (mg/100g)	840,68 a	120,58 b	210,80 b	150,68 b	14,90

*Lipídios nos sólidos totais

^{a, b, c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste Tukey 5%.

O sal é um ingrediente importante na fabricação do queijo, uma vez que atua no controle da atividade de água e conseqüentemente no crescimento microbiano, como também no seu sabor e textura (CRUZ et al., 2011). Apesar disso, o consumo excessivo de sal é visto como problema de saúde pública por estar associado ao desenvolvimento de doenças (FERRÃO et al., 2016). Estudos recentes apontam o consumo em excesso de sal como um fator promotor para o desencadeamento de respostas imunológicas e inflamatórias, assim como sua correlação com doenças autoimunes (SIGAUX et al., 2018). Sendo o queijo considerado uma fonte alimentar rica em sódio, com seu conteúdo dependendo do tipo de queijo (DUGAT-BONY et al., 2016), alternativas para a redução do sal na elaboração dos queijos são desejáveis.

Apesar da necessidade de utilização do sal na elaboração dos queijos, como mozzarella, sua redução não interfere na vida útil desse produto, tendo maior aceitação pelos provadores durante avaliação sensorial (FACCIA et al., 2012). De forma semelhante, reduzindo o teor de sódio e utilizando substitutos em queijo prato foi possível observar que não houve interferência nas características físico-químicas, na capacidade de fusão e no perfil de textura desse produto, sendo a redução do sódio uma alternativa viável para a indústria de laticínios (COSTA et al., 2018). A redução no teor de sal é bem vista não apenas para a qualidade geral do queijo, mas principalmente desejada pelos consumidores. Estes têm demonstrado preferência por queijos com menores teores de sal, quando comparados aos seus similares convencionais (CZARNACKA-SZYMANI; JEZEWSKA-ZYCHOWICZ, 2015).

3.4.4 Análise sensorial

Participaram da análise sensorial alunos e funcionários da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, sendo todos os provadores não treinados, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias (variando de 18 a 60 anos), que relataram não possuir restrição ao consumo de queijo, assim como periodicidade no consumo do queijo de coalho.

No presente estudo entre todos os tratamentos analisados o queijo com adição de 12,5% de ervas em substituição ao sal (CH 12,5) apresentou as melhores notas para todos os atributos analisados (aroma, cor, sabor e textura) e para a avaliação de intenção de compra, exibindo notas superiores ($p < 0,05$) para o atributo sabor e para aceitação global, quando comparado ao queijo controle e aos demais tratamentos (Figura 10).

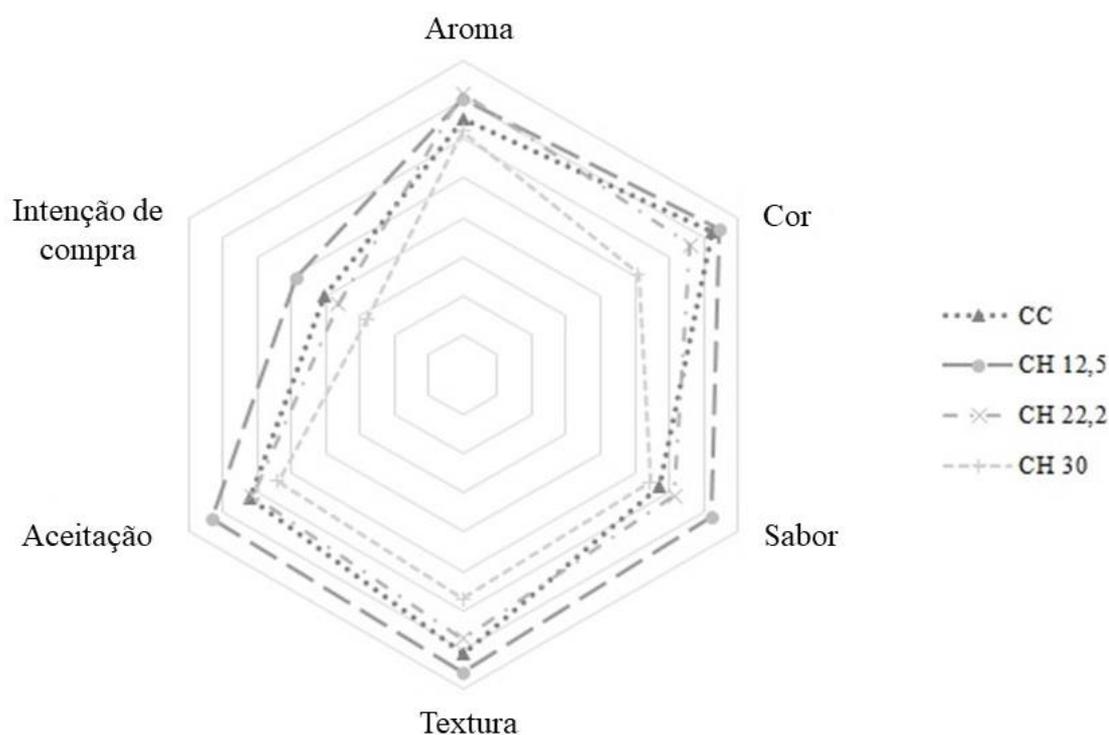


Figura 10. Análise sensorial dos queijos durante 10 dias de armazenamento refrigerado ($10 \pm 2^\circ\text{C}$). CC = queijo controle; CH 12,5 (queijo com adição de 12,5% de ervas); CH 22,2 (queijo com adição de 22,2% de ervas); CH 30 (queijo com adição de 30% de ervas).

A percepção sensorial de produtos lácteos, como o queijo, é importante para avaliação de produtos no mercado e reformulação destes. É através de análises de

atributos sensoriais que se pode inferir a satisfação do consumidor sobre o produto analisado e sua perspectiva de mercado. Sendo assim, as medidas sensoriais são de fundamental importância na análise de um alimento, uma vez que seus resultados direcionam a melhor forma de sua elaboração (DRAKE, 2007).

O sal adicionado na elaboração dos mais variados tipos de queijo tem a importante função de fornecer sabor ao produto (DAMIANO; JONYER, 2018) e este é um dos atributos primordiais para a escolha de um alimento pelo consumidor. No presente estudo o queijo com redução de sal e adição de 12,5% de ervas recebeu a melhor nota para o sabor, sendo preferido pelos provadores em comparação ao queijo convencional. Este resultado permite inferir que a redução no teor de sal no queijo de coalho foi vista como desejável pelos consumidores e a adição das ervas propiciou uma melhor aceitação global desse produto.

A redução do sal em produtos, e/ou a sua substituição parcial por outros ingredientes que forneçam segurança e garantam as características organolépticas, é uma tendência mundial que segue as recomendações dos órgãos reguladores em produzir e consumir produtos mais saudáveis (ALBARRACÍN et al., 2011). Estudos têm sido realizados visando avaliar a possibilidade de redução de sal em derivados lácteos, como o queijo prato, onde uma redução de até 25% no teor de sal não afetou a aceitação geral do queijo, indicando uma alternativa na elaboração desse produto (BAPTISTA et al., 2017).

Além disso, a adição de ervas, seus extratos e óleos essenciais, também são estudados, como alternativa para maior preservação e qualidade de queijos. Os resultados encontrados por outros autores demonstraram que na análise sensorial os queijos aromatizados com os extratos de ervas apresentaram aceitação igual ou superior as amostras controle, demonstrando a possibilidade de adição dessas ervas no queijo processado (TAYEL et al., 2015).

A reformulação de produtos é um desafio, principalmente quando orientada para redução de sal, pois este exerce papéis importantes nas características sensoriais e no aspecto da estabilidade dos produtos. Entretanto, essa atitude é necessária, visto que para atender as diretrizes mundiais de redução do consumo de sódio pela população, esta deve

ser motivada pela oferta de produtos que estejam em conformidade com as regulamentações e atendam às suas expectativas e anseios (ZANDSTRA et al., 2016).

3.5 Conclusão

A redução de 30% no sal e a adição de 12,5% de ervas na elaboração do queijo de coalho apresentou resultados satisfatórios em relação a sua composição, reduzindo o teor de sódio e mantendo as demais características de composição, e a aceitação do produto, sendo observada formulação com melhor aceitação que o similar convencional. Estes resultados demonstram a possibilidade das ervas como substitutos do sal para formulação de queijo de coalho com qualidade aceitável e melhor teor nutricional.

Referências

- ALBARRACÍN, W. et al. Salt in food processing; usage and reduction: a review. **International of Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1329-1336, 2011.
- AMASTITE, S. et al. Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus aureus* in fresh sheep cheese. **Italian Journal of Food Safety**, v. 3, p. 148-150, 2014.
- ASENSIO, C. M. et al. Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. **LWT – Food Science and Technology**, v. 60, p. 664-671, 2015.
- BAPTISTA, D. P. et al. Reduction of 25% salt in Prato cheese does not affect proteolysis and sensory acceptance. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 101-110, 2017.
- BOROSKI, M. et al. Use of oregano extract and oregano essential oil as antioxidants in functional dairy beverage formulations. **LWT – Food Science and Technology**, v. 47, p. 167-174, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, p. 5-8, 16 de julho, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes no Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 13 de julho, 2018a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Regulamentos Técnicos que fixam a identidade e as características de qualidade que devem apresentar o leite cru refrigerado, o leite pasteurizado e o leite pasteurizado tipo A. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 30 de novembro, 2018b.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Laboratório Nacional Agropecuário. Determinação de sódio e potássio em produtos de origem animal por espectrometria de emissão atômica por chama. **MET POA/SLAV/13/04/03**. Emissão em 18 de julho, 2014.
- CAROCHO, M. et al. Basil as functional and preserving ingredient in “Serra da Estrela” cheese. **Food Chemistry**, v. 207, p. 51-59, 2016.
- COSTA, R. G. B. et al. Sodium substitutes in Prato cheese: Impact on the physicochemical parameters, rheology aspects and sensory acceptance. **LWT – Food Science and Technology**, v. 90, p. 643-649, 2018.
- CRUZ, A. G. et al. Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 276-291, 2011.
- CZARNACKA-SZYMANI, J.; JEZEWSKA-ZYCHOWICZ, M. Impact of nutritional information on consumers’ acceptance of cheese with reduced sodium chloride content. **International Dairy Journal**, v. 40, p. 47-53, 2015.
- DAMIANO, H. F.; MELITO, H. S. J. The impact of salt reduction on cottage cheese cream dressing rheological behavior and consumer acceptance. **International Dairy Journal**, v. 79, p. 62-72, 2018.
- DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.
- DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4925-4937, 2007.
- DUGAT-BONY, E. et al. The effect of reduced sodium chloride content on the microbiological and biochemical properties of a soft surface-ripened cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 1-10, 2016.
- EL GALIOU, O. et al. Chemical and microbiological characteristics of traditional homemade fresh goat cheeses from Northern Morocco, **Small Ruminant Research**, v. 129, p. 108-113, 2015.
- FACCIA, M. et al. Influence of the different sodium chloride concentrations on microbiological and physico-chemical characteristics of mozzarella cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 390-396, 2012.
- FERRÃO, L. L. et al. Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. **Food Research International**, v. 86, p. 93-102, 2016.
- FOEGEDING, E. A.; DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory and Mechanical Properties of Cheese Texture. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1611-1624, 2007.
- FREITAS, C.; MALCATA, F. X. Microbiology and Biochemistry of Cheeses with Appellation d’Origine Protégée and Manufactured in the Iberian Peninsula from Ovine and Caprine Milks. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 584-602, 2000.

GORE, E. et al. Calcium lactate as an attractive compound to partly replace salt in blue-veined cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1-13, 2019.

GUINE, T. P. Salting and the role of salt in cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 99-109, 2004.

ISRAR T. et al. Salt reduction in baked products: Strategies and constraints. **Trends in Food Science & Technology**, v. 51, p. 98-105, 2016.

JOHNSON, M. E. A 100-Year Review: Cheese production and quality. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 9952-9965, 2017.

KHORDOSHIAN, N. et al. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 62-72, 2018.

LAMICHHANE, P. et al. Invited review: Structure-function relationships in cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-18, 2018.

LOBACZ, A. et al. The analysis of the behaviour of *Listeria monocytogenes* in fresh cheeses with various spices during storage. **Procedia Food Science**, v. 7, p. 80-84, 2016.

MARTÍNEZ-GRACIÁ, C. et al. Use of herbs and spices for food preservation: advantages and limitations. **Current Opinios in Food Science**, v. 6, p. 38-43, 2015.

NDANUKO, R. N. et al. Relationship between sodium and potassium intake and blood pressure in a sample of overweight adults. **Nutrition**, v. 33, p. 285-290, 2017.

RIBEIRO, D. S. et al. Evaluation rosemary essential oil the control of multidrug-resistant *Escherichia coli* in Coalho cheese. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 4, p. 1-9, 2013.

SANTOS, A. G. A. **Capacidade antioxidante do sal de ervas no perfil lipídico e aceitabilidade do peixe assado**. 2017. 78 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2017.

SCHAMBERGER, G. P.; LABUZA, T. P. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 1410-1417, 2007.

SHAN, B. et al. Potential Application of Spice and Herb Extracts as Natural Preservatives in Cheese. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, p. 284-290, 2011.

SIGAUX, J. et al. Salt, inflammatory joint disease, and autoimmunity. **Joint Bone Spine**, v. 85, p. 411-416, 2018.

SOUZA, A. M. et al. Dietary Sources of Sodium Intake in Brazil in 2008-2009. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 113, p. 1359-1365, 2013.

TAYEL, A. A. et al. Foodborne Pathogens Prevention and Sensory Attributes Enhancement in Processed Cheese via Flavoring with Plant Extracts. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. 2886-2891, 2015.

WADHWANI, R.; MCMAHON, D. J. Color of low-fat cheese influences flavor perception and consumer liking. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 2336-2346, 2012.

ZANDSTRA, E. H. et al. Salt reduction: Moving from consumer awareness to action. **Food Quality and Preference**, v. 48, p. 376-381, 2016.

**4 CAPÍTULO IV: APLICAÇÃO DE INULINA EM QUEIJO FRESCO
COM TEOR DE GORDURA ELEVADO: CARACTERIZAÇÃO
FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL**

4.1 Resumo

A inulina é uma fibra dietética que apresenta diversos benefícios a saúde humana e propriedades tecnológicas que proporcionam sua utilização em queijos frescos, como o de coalho, melhorando a qualidade nutricional destes. Objetivou-se elaborar queijo de coalho com adição de inulina em substituição parcial da gordura. Para isso, foram elaborados três lotes de queijos: C (queijo controle), II 8% (queijo com leite integral e 8% de inulina) e SI 8% (queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina). Os queijos foram analisados durante os dias 1, 5 e 10 de armazenamento refrigerado quanto a qualidade microbiológica (coliformes a 35°C e 45°C, bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas e *Salmonella* sp.), quanto a composição química e parâmetros físicos (acidez, pH, cor, perfil de textura, umidade, cinzas, lipídios, cloretos e teste de fritura) e quanto a aceitação (teste de aceitação e intenção de compra). Os queijos analisados estavam aptos a consumo entre os dias 5 e 10 de armazenamento, não havendo interferência da inulina no crescimento microbiano. Todos os lotes estavam em conformidade com a legislação para o teor de umidade e lipídios, sendo considerados aprovados no teste de fritura. Foram observadas mudanças ($p < 0,05$) na cor e luminosidade apenas do queijo SI 8%, não sendo essa característica percebida pelos provadores. Os queijos II 8% e SI 8% demonstraram melhores características de textura, principalmente maior coesividade e menor dureza. Em relação a análise sensorial não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) entre os queijos. A inulina, além de ser um substituto de gordura, garante as características de textura do queijo de coalho sem alterar a aceitação sensorial dos produtos, mesmo em concentração de 0,5%. Sendo assim, uma alternativa a elaboração de queijo de coalho com características semelhantes ao produto convencional e com melhor qualidade nutricional.

Palavras-chave: queijo de coalho; fibra dietética; qualidade nutricional; atributos sensoriais.

4.2 Introdução

A inulina é um polímero de carboidrato de origem vegetal, constituído por unidades de frutose, que em sua cadeia final apresentam resíduos de glicose, pertencendo a uma classe de carboidratos, conhecida como frutanos (MODZELEWSKA-KAPITULA; KLEBUKOWSKA, 2009). É uma fibra dietética que está naturalmente presente em algumas frutas e vegetais, como trigo, cebola, banana, alho-poró e chicória, sendo este

último a fonte vegetal mais utilizada para fins de extração industrial (ROBERFROID, 2007).

Essa fibra é considerada um ingrediente alimentar funcional, sendo assim definida por ser capaz de apresentar propriedades que resultam na prevenção ou redução do risco de desenvolver doenças, além da função primária de fornecer nutrientes (ARIAS-ARANDA; ROMEROSA-MARTINÉZ, 2010). Entre suas diversas funções apresenta propriedades prebióticas, não sendo assim digerida na parte superior do trato gastrointestinal, promovendo o crescimento da flora do trato digestivo, não sendo também armazenada diretamente como glicogênio (FLAMM et al., 2001). Apresenta outros benefícios para a saúde, como o aumento da absorção de minerais –cálcio, magnésio e ferro – regulação de hormônios relacionados ao apetite e estimulação do sistema imunológico (SHOIAB et al., 2016).

A inulina apresenta também utilização na indústria de alimentos, em virtude de suas propriedades tecnológicas e nutricionais. É utilizada em substituição ao açúcar e a gordura, apresentando baixo valor calórico (>3kcal/g) (FLAMM et al., 2001). Em produtos lácteos, a utilização da inulina se apresenta como uma alternativa promissora para elaboração de derivados com melhor teor nutricional, uma vez que estudos demonstram que o consumo de produtos derivados do leite vem contribuindo para o aumento da ingestão de gordura saturada (MANGUEIRA et al., 2002).

Entre os derivados lácteos com alto teor de gordura consumidos no Brasil tem-se o queijo de coalho (SANTOS et al., 2011). Este é um queijo elaborado através de coagulação do leite, com uso de coalho ou outras enzimas coagulantes, de massa cozida ou semi-cozida, de cor branco amarelada, odor ácido e sabor levemente salgado, que em sua constituição média, apresenta entre 35 a 60% de gordura nos sólidos totais (BRASIL, 2001).

Percebe-se uma inclinação da população por alimentos com melhores características nutricionais e menores teores de gordura, o que proporciona um maior interesse em queijos com teor de gordura reduzido (DRAKE et al., 2010). Entretanto, estas variedades de queijo ainda são consideradas como de qualidade inferior ao produto convencional. Algumas das estratégias são melhorar o sabor e a textura desses produtos ou utilizar ingredientes que melhorem essas características separadamente (SKEIE et al., 2013).

Alguns estudos realizados com a substituição da gordura de queijo processado por inulina demonstraram como resultados melhores características de textura, como menor dureza e adesividade (SOŁOWIEJ et al., 2015). Em queijo fresco elaborado a partir de leite caprino também foram observadas melhores características de textura nos queijos elaborados com substituição da gordura por inulina (SALVATORE et al., 2014). Esses resultados evidenciam a perspectiva de utilização da inulina como substituto da gordura em queijos, em virtude de seus satisfatórios atributos funcionais, necessários as características sensoriais dos queijos (KARIMI et al., 2015).

A utilização da inulina em queijos frescos pode ser uma alternativa para um produto mais saudável e com manutenção de suas características sensoriais. Diante disso, objetivou-se elaborar queijo de coalho com reduzido teor de gordura e adição da inulina, visando aumentar a possibilidade de elaboração desse queijo tradicional com melhores características nutricionais.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Produção dos queijos

Para elaboração dos queijos o leite bovino foi pasteurizado, sendo em seguida submetido a análises microbiológicas e físico-químicas. Os queijos foram elaborados no Laboratório de Inspeção de Alimentos de Origem Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, utilizando as técnicas artesanais de fabricação e aplicando as boas práticas de fabricação.

Após a análise do leite os queijos foram elaborados por processos baseados nas técnicas tradicionais de elaboração, onde o leite, após pasteurização, foi resfriado até 35°C e adicionado de cloreto de cálcio e de coagulante (Halamix - Chr. Hansen A/S). Após 60 minutos de coagulação a coalhada foi cortada em cortes longos e posteriormente em cortes finos, seguido de repouso. Em seguida foi realizada a primeira dessoragem, com retirada do soro e aquecimento deste para cozimento da massa. Após o cozimento, procedeu-se a segunda dessoragem, salga, adição da inulina e prensagem dos queijos (BRASIL, 2001).

Foram elaborados três lotes de queijos, sendo eles: C (queijo controle), II 8% (queijo com leite integral e 8% de inulina) e SI 8% (queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina) (Tabela 1). Os dois últimos lotes de queijos foram acrescidos com a fibra

inulina (Orafit – FT-X®), cedida pela empresa Sweetmix. A inulina foi previamente dissolvida em soro aquecido a 55-60°C, na proporção de uma parte de inulina para duas partes de soro (1:2), como proposto por Buriti et al. (2008). A quantidade de inulina adicionada, em ambos os lotes, foi de aproximadamente 8% do produto final. A fibra foi adicionada após a salga, sendo homogeneizada à massa do queijo de forma manual, objetivando-se atingir a maior incorporação da fibra à massa. Após esse procedimento, os queijos foram submetidos a prensagem, com saída de soro residual. Esse processo ocorreu durante, aproximadamente, 7h, tempo habitual de prensagem dessa variedade de queijo.

Todo o procedimento de elaboração dos queijos foi realizado em ambiente controlado, no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), utilizando os requisitos necessários as boas práticas de fabricação. Após a elaboração dos queijos estes foram armazenados em refrigeração (10 a 12°C) para análises posteriores.

Tabela 1. Ingredientes e quantidades utilizados na elaboração dos queijos.

Ingredientes e quantidades para 1000g de queijo	Tratamentos		
	C	II 8%	SI 8%
Leite pasteurizado	10 L	10 L	10 L
Cloreto de cálcio	5 ml	5 ml	5 ml
Coagulante	1g	1 g	1 g
Cloreto de sódio	150 g	150 g	150 g
Inulina	-	80 g	80 g

C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina

4.3.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em duplicata durante os tempos de armazenamento de 1, 5 e 10 dias com as amostras em refrigeração. Para as análises foram pesados assepticamente 25g de queijo que foram transferidos para sacos plásticos estéreis, onde acrescentaram-se 225 ml de água peptona tamponada estéril para posterior homogeneização em “Stomacher” durante 2 minutos, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram obtidas as demais diluições decimais até 10^{-4} . Após as diluições, as amostras foram submetidas às técnicas para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 e 45°C, contagens de bactérias aeróbias mesófilas e

psicrotróficas e detecção de *Salmonella* sp. utilizando a metodologia recomenda pela American Public Health Association (DOWNES; ITO, 2001).

4.3.3 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras de queijo nos dias 1, 5 e 10 de armazenamento refrigerado (10 a 12°C). As amostras foram analisadas quanto a acidez pelo método de acidez titulável e quanto ao pH utilizando um phmetro portátil para produtos lácteos. A cor dos queijos foi aferida em três pontos distintos por amostra, com o auxílio de um colorímetro digital (Sistema CIE L*a*b*).

O perfil de textura foi determinado através de teste de dupla compressão de amostras, com peso constante, utilizando cilindro de alumínio de 25 mm de diâmetro (P/1SP), em analisador de textura TA-XT2 (Stable MicroSystems). Os dados foram coletados através do programa “Exponent Lite Express” – versão 5.1. Foram analisados os atributos primários dureza, coesividade, adesividade e elasticidade, viscosidade e o atributo secundário gomosidade. Foram empregados os seguintes parâmetros: amostras de queijo com altura de 2 cm, diâmetro de 2 cm e temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. As amostras cilíndricas dos queijos foram comprimidas até 50% de sua altura inicial a uma velocidade de 1mm/s.

De forma pontual, após o primeiro dia de armazenamento, os queijos foram analisados quanto ao teor de umidade através de secagem em estufa a 102°C até massa constante. O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C e o teor de lipídios através do método butirométrico para queijos, sendo calculado o teor de gordura nos sólidos totais. Também foram analisados o teor de cloretos através do método argentométrico. (BRASIL, 2018).

A análise de inulina foi realizada através do método de quantificação de frutanos (frutooligossacarídeos, frutanos e inulina) MA-CQ.172 baseado em AOAC (2012), Official Method 999.03. Foi realizado também o teste de fritura, com a finalidade de avaliar a capacidade de derretimento do queijo de coalho. Para tanto, foram utilizados pedaços de queijo com dimensões, aproximadas, de 8 cm x 4 cm x 1 cm, sem casca. Estes foram levados a fritura em frigideira, com cerca de 5g de gordura vegetal. Os pedaços de queijo foram fritos durante 1 minuto e 40 segundos, de ambos os lados, em fogo médio (CAVALCANTE et al., 2007).

4.3.4 Análise sensorial

Após a elaboração dos queijos estes foram submetidos a teste sensorial. A análise sensorial foi realizada em cabines individuais, com iluminação apropriada. As amostras foram servidas em porções de 25g cada, em formato retangular semelhante, em pratos descartáveis brancos, codificadas com números de três dígitos de forma aleatória. Foram servidas em temperatura ambiente, acompanhadas de biscoito água e sal e água mineral para remoção do sabor residual. O teste realizado foi o teste de aceitação, onde avaliaram-se os atributos de cor, aroma, sabor e textura, além de análise de intenção de compra e aceitação global. Os provadores receberam as quatro amostras e foram orientados a responder o teste de acordo com as suas percepções (APÊNDICE 2).

Este trabalho foi submetido a avaliação e apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/UERN) e aprovado (Protocolo n° 58596116.8.0000.5294; Número de comprovante: 079217/2016).

4.3.5 Análise estatística

Foi observada a homocedasticidade e normalidade dos dados, não sendo observados *outliers*, logo em seguida os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e aos testes, t de Student e Tukey a 5% de significância, utilizando o software estatístico R, versão 3.5.0 (R Core Team).

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Qualidade microbiológica da matéria-prima e dos queijos

O leite utilizado como matéria-prima apresentou-se apto para elaboração dos queijos, apresentando conteúdo de gordura adequado para leite semidesnatado (2,7g/100g). Para elaboração artesanal de queijos um dos requisitos de maior importância é a qualidade da matéria-prima utilizada, que aliada a adequação das práticas de fabricação proporciona a elaboração de queijos de coalho com qualidade higiênica e constituição química conhecida (SANTOS et al., 2008).

A adição da inulina não influenciou o crescimento dos microrganismos estudados. Em relação a coliformes termotolerantes todos os queijos analisados estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação para consumo até o 5° dia, estando o II 8% dentro dos padrões até o 10° dia de armazenamento, todas as amostras estavam livres de *Salmonella* sp. (Tabela 2). A ausência ou baixas contagens de alguns microrganismos

podem decorrer do processo de pasteurização, que contribui para a redução microbiana no leite e conseqüentemente em seus produtos derivados (FREITAS et al., 2013). Além disso, pode-se enfatizar que a microbiota autóctone do queijo de coalho, composta por diversas espécies de bactérias lácticas competem com alguns microrganismos patogênicos, interferindo na sua multiplicação e provocando redução destes (SILVA et al., 2010).

Tabela 2. Qualidade microbiológica das amostras de queijos (média) com e sem inulina, e com adição desta e redução de gordura durante os dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C).

Dias de armazenamento		Tratamentos			CV (%)
		C	II 8%	SI 8%	
1	Coliformes	2,38 Ba	1,81 Bb	1,04 Bc	0,05
5	35°C (Log 10	3,04 Aa	3,04 Aa	3,04 Aa	
10	UFC.g ⁻¹)	3,04 Aa	1,36 Bb	3,04 Aa	
1	Coliformes a	2,38 Ba	2,20 Ab	1,04 Bc	0,00
5	45°C (Log 10	1,04 Ca	0,48 Bb	1,04 Ba	
10	UFC.g ⁻¹)	3,04 Aa	0,48 Bb	3,04 Aa	
1	Mesófilos	5,40 Ba	5,40 Ba	5,40 Ba	0,24
5	(Log 10	5,40 Ba	5,17 Bb	5,40 Ba	
10	UFC.g ⁻¹)	6,40 Aa	6,40 Aa	6,40 Aa	
1	Psicrotróficos	2,24 Ca	2,32 Ba	1,00 Bb	1,71
5	(Log 10	4,29 Bb	2,73 Ac	4,40 Aa	
10	UFC.g ⁻¹)	4,40 Aa	1,00 Cb	4,40 Aa	
1	Estafilococos	5,69 Cb	5,54 Cc	6,13 Ca	0,56
5	coagulase	6,30 Ba	5,81 Bb	6,30 Ba	
10	positiva (Log 10 UFC.g ⁻¹)	7,30 Aa	7,08 Ab	7,30 Aa	

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças entre os tempos de armazenamento pelo teste de Tukey 5%. ^{a,b,c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey 5%. C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina

Ao analisar as contagens de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, observou-se que houve um aumento nas contagens para ambos os microrganismos no décimo dia de armazenamento. Levando em consideração que a vida útil de um queijo pode ser estabelecida quando se atingem contagens totais de 6 log UFC/g (JUAN et al.,

2013), os queijos estavam com qualidade microbiológica aceitável entre os dias 5 e 10 de armazenamento. Em relação a detecção de microrganismos mesófilos, algumas bactérias benéficas, como as lácticas, podem estar presentes em quantidades elevadas participando das características sensoriais desses queijos e garantindo as particularidades desse produto artesanal (SANGALETTI et al., 2009).

Em relação a *Estafilococos coagulase positiva*, a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019, estabelece que em queijos esse microrganismo deve apresentar contagem nunca superior a 10^3 UFC/g, o que corresponde a 3 log (BRASIL, 2019). Partindo desse parâmetro todas as amostras estavam com valores superiores ao estabelecido. *Estafilococos* que são coagulase positiva, como os *Staphylococcus aureus*, são microrganismos que fazem parte da microbiota natural do leite e podem permanecer no produto caso ele não seja submetido a nenhum tratamento térmico, caso este tenha sido insuficiente ou tenha ocorrido contaminação após a pasteurização. Além disso, o ambiente de manipulação do queijo pode ocasionar contaminação desse produto (TILOCCA et al., 2020).

4.4.2 Composição química e parâmetros físicos nos queijos

Em relação a composição dos queijos, todos estavam em conformidade com a legislação para o teor de umidade, e o SI 8% apresentou a menor média para o teor de lipídios, como esperado (Tabela 3). A contribuição do consumo de queijos para o aumento da obesidade têm sido foco de diversos estudos e levanta a necessidade de reformulação desse tipo de alimento frente a demanda crescente da população por produtos mais saudáveis. O consumidor tem demonstrado interesse em pagar mais por queijos com reduzido teor de gordura, o que demonstra a importância do estudo de formulações de queijos com menores teores de gordura e a implicação nas suas características organolépticas (MAGISTRIS; GÁLAN, 2016).

Tabela 3. Composição químicas das amostras de queijo fresco controle, integral e semidesnatado com inulina (média) após 1 dia de armazenamento (10-12°C).

	Tratamentos			CV (%)
	C	II 8%	SI 8%	
Umidade (%)	52,24 a	52,26 a	49,41 b	1,11
Extrato seco (%)	47,76 b	47,74 b	50,59 a	1,17
Cinzas (%)	4,43 b	4,85 a	3,61 c	0,82
Cloretos (%)	4,06 a	4,42 a	1,99 b	4,56
Teor de lipídios (%)	16,00 b	17,00 a	14,33 c	2,11
Teor de lipídios nos sólidos totais (%)	33,64 a	35,53 a	28,13 b	2,44
Frutanos (%)*	Nd	0,48	0,50	0,20

^{a,b,c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey 5%. C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina. Nd – não detectável. *Frutooligosacarídeos, frutanos e inulina

Para cinzas e cloretos os valores encontrados para todos os tratamentos estavam dentro do esperado para este tipo de queijo. Apesar da redução do teor de cloretos no queijo SI 8%, isso não foi perceptível pelos provadores nos testes sensoriais. Avaliando a capacidade de derretimento das amostras, após 1 dia de armazenamento refrigerado, observou-se que os queijos foram considerados aprovados no teste de fritura, mantendo-se com seu formato inicial após a fritura, não apresentando derretimento, mesmo apresentando um pH baixo. Uma das características do queijo de coalho é manter-se firme após o processo de fritura, não perdendo seu formato. O derretimento do queijo de coalho tem forte associação com teor de umidade elevado e valores baixos de pH, onde em valores inferiores a 5,7 o queijo não suporta a aplicação de calor e derrete (CAVANCANTE et al., 2007).

A partir da análise de frutanos nas amostras de queijo de coalho podemos observar que da fibra adicionada apenas 0,5% permaneceu no produto final. De acordo com Shoiab et al. (2016) a inulina ao ser dissolvida em água, ou outro líquido, forma um gel de estrutura cremosa branca, que pode ser adicionado a qualquer produto. Analisando a influência da inulina sobre a coagulação e sinérese em queijos observou-se que a fibra não interfere negativamente nesses processos, podendo até reduzir a perda de soro por retenção de líquido, no entanto sua permanência no produto pode ser influenciada pela pressão exercida no alimento (ARANGO et al., 2013).

O queijo de coalho é um produto fresco onde o final da sua elaboração é caracterizado pela prensagem e saída do soro residual. Este apresenta metade dos sólidos solúveis do leite, entre eles, proteínas, lactose, gordura e alguns sais minerais, assim como outros componentes que se dissolvam nesse material (LIBÓRIO et al., 2017). No queijo em estudo a inulina foi adicionada na última etapa do processo, sendo dissolvida em soro e adicionada a massa que foi posteriormente prensada. Provavelmente a homogeneização da solução de inulina não foi completa ao queijo, o que teve como consequência sua saída no soro residual.

Para pH e acidez (Tabela 4) os valores encontrados para todos os tratamentos foram inferiores aos encontrados em outros estudos com queijo de coalho (FREITAS FILHO et al., 2012). Deve-se enfatizar que o SI 8% apresentou no décimo dia o menor valor para pH e maior para acidez. Sabe-se que a inulina atua em simbiose com microrganismos como as bactérias ácido-láticas, estimulando o seu crescimento, podendo assim haver um maior consumo de substrato, como lactose, acidificando o meio (SHOIAB et al., 2016).

Tabela 4. Avaliação de pH, acidez e cor dos queijos frescos com e sem redução de gordura e adição de inulina nos dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C).

Dias de armazenam ento		Tratamentos			CV (%)
		C	II 8%	SI 8%	
1	Acidez	0,35 Aa	0,39 Ba	0,33 Ca	14,25
5		0,39 Aa	0,42 Aa	0,42 Ba	
10		0,39 Ab	0,42 Aab	0,51 Aa	
1	pH	4,81 Ba	4,79 Ba	4,78 Ba	0,69
5		4,92 Aa	4,94 Aa	4,92 Aa	
10		4,85 Ba	4,80 Ba	4,69 Bb	
1	L*	94,82 Aa	94,67 Aa	94,01 Aa	0,85
5		94,06 Aa	93,18 Aab	92,00 Bb	
10		93,86 Aa	93,70 Aa	90,63 Bb	
1	a*	0,19 Aa	0,04 Aa	0,21 Ca	39,17
5		0,26 Aa	0,29 Aa	0,69 Bb	
10		0,09 Ab	0,13 Ab	1,47 Aa	
1	b*	8,72 Aa	9,09 Aa	9,75 Ba	6,62
5		9,55 Ab	9,55 Aab	10,93 Ba	
10		8,64 Ab	9,72 Ab	13,23 Aa	
1	Δe	-	-	-	2,44
5		1,23 Ac	2,07 Ab	3,63 Ba	
10		1,20 Ab	1,53 Ab	6,29 Aa	

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças entre os tempos de armazenamento pelo teste de Tukey 5%. ^{a,b,c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey 5%. C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina

Dos queijos analisados apenas no SI 8% foram observadas mudanças ($p < 0,05$) nas coordenadas de cor durante os dias de armazenamento, como também na diferença total de cor (Tabela 4). No queijo em que houve redução de gordura e adição de inulina (SI 8%) observou-se menor luminosidade, sendo a maior diferença ($p < 0,05$) no décimo dia de armazenamento, além de maior teor de vermelho e menor de amarelo, no entanto essas características não foram perceptíveis pelos provadores durante análise sensorial. Essas mesmas características foram observadas em queijo fresco espanhol com reduzido teor de gordura e adição de inulina, onde a natureza das partículas da inulina pode ser o fator desencadeante da maior dispersão da luz, o que provoca opacidade nos queijos e redução da luminosidade (JUAN et al., 2013).

Os queijos II 8% e SI 8% apresentaram os melhores resultados para os parâmetros de textura. Os queijos acrescidos de inulina apresentaram, entre os parâmetros analisados, maior coesividade e menor dureza, principalmente o SI 8% (Tabela 5). Em queijo fresco elaborado com leite de outras espécies também foram observadas melhores características de textura nos queijos elaborados com substituição da gordura por inulina (SALVATORE et al., 2014). Sendo assim, a adição de inulina, em substituição da gordura, não provoca modificações apenas nas características reológicas relacionadas a dureza, mas proporciona também maior cremosidade e suavidade (MEYER et al., 2011).

Tabela 5. Análise do perfil de textura dos queijos com substituição de gordura por inulina nos dias 1, 5 e 10 de armazenamento (10 a 12°C).

Dias de armazenamento	Análise de perfil de textura	Tratamentos			CV (%)
		C	II 8%	SI 8%	
1	Dureza	3,11 Aa	2,29 Ab	2,44 Ab	9,42
5		2,62 Ba	2,04 Ab	2,20 Aab	
10		2,70 Ba	1,69 Bb	1,70 Bb	
1	Adesividade	-0,50 Aa	-0,24 Ab	-0,30 Ab	1,77
5		-0,52 Aa	-0,33 Ab	-0,35 Ab	
10		-0,33 Ba	-0,14 Ab	-0,21 Aab	
1	Elasticidade	0,89 Aa	0,90 Aa	0,89 Aa	2,26
5		0,94 Aa	0,91 Aa	0,92 Aa	
10		0,90 Aa	0,90 Aa	0,91 Aa	
1	Coesividade	0,64 Ab	0,79 Aa	0,82 Aa	5,62
5		0,65 Ab	0,69 Aab	0,78 Aa	
10		0,65 Ab	0,70 Ab	0,77 Aa	
1	Gomosidade	0,22 Aa	0,26 Aa	0,24 Aa	10,11
5		0,19 Aa	0,28 Aa	0,24 Aa	
10		0,20 Aa	0,25 Aa	0,22 Aa	
1	Viscosidade	0,17 Aa	0,28 Aa	0,24 Aa	7,65
5		0,18 Aa	0,26 Aa	0,22 Aa	
10		0,16 Ab	0,30 Aa	0,26 Aa	

^{A,B,C} Letras maiúsculas distintas na coluna indicam diferenças entre os tempos de armazenamento pelo teste de Tukey 5%. ^{a,b,c} Letras minúsculas distintas na linha indicam diferença entre os tratamentos pelo teste de Tukey 5%. C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina

A inulina, quando em soluções aquosas, forma um gel de textura macia que melhora a estabilidade de emulsões e apresenta características semelhantes a gordura

(FRANCK, 2002). Em estudo utilizando a adição de 4% de inulina em queijo fresco observou-se melhor textura dos queijos, não tendo impacto na elasticidade e coesão, indicando o uso da fibra como um substituto de gordura nesses tipos de queijo (JUNYUSEN et al., 2017). A inserção da inulina em alimentos proporciona a manutenção da textura do produto garantindo assim a qualidade do produto e melhorando seus atributos nutricionais (MENSINK et al., 2015).

4.4.3 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada após 2 dias de armazenamento refrigerado, com o intuito de se avaliar a qualidade microbiológica do queijo testado. Participaram do teste provadores não treinados, de ambos os sexos, de diferentes faixas etárias (variando de 18 a 60 anos), sendo estes alunos e funcionários da UFERSA e que demonstraram consumo periódico do queijo de coalho. Um total de 70 provadores participaram do teste. Os queijos não apresentaram diferenças ($p < 0,05$) quanto aos atributos sensoriais avaliados (Figura 1) demonstrando que a adição da inulina além de garantir uma melhor textura aos queijos não modificou a sua aceitação.

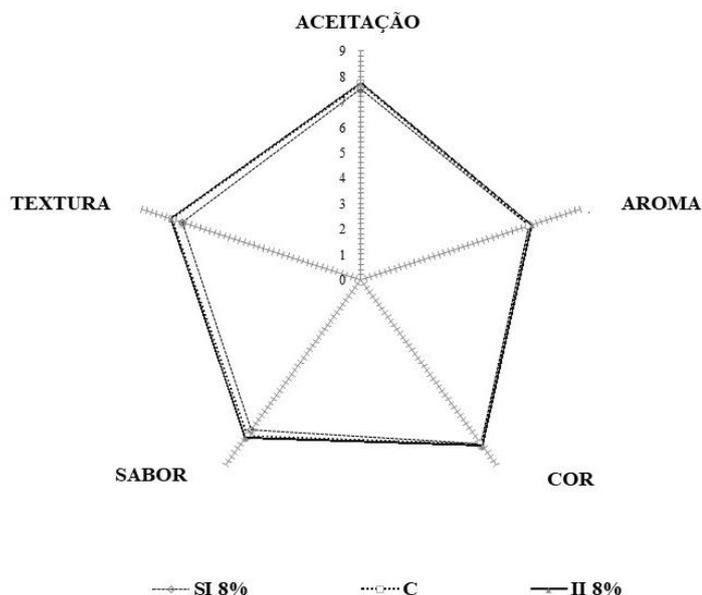


Figura 1. Análise sensorial dos queijos após 2 dias de armazenamento (10 a 12°C). C = queijo controle; II 8% = queijo com leite integral e 8% de inulina, SI 8% = queijo com leite semidesnatado e 8% de inulina.

Em outras variedades de queijo a adição da inulina também não interferiu nas características sensoriais do produto, demonstrando a perspectiva de utilização tecnológica da inulina, como substituto da gordura, além de perspectivas de melhoria nutricional (HENNELLY et al., 2006). As características tecnológicas e nutricionais da inulina sugerem a sua utilização nos mais diversos alimentos, principalmente nos derivados lácteos como os queijos, não interferindo nas características e na aceitação dos produtos, sendo uma boa base para elaboração de produtos mais saudáveis, que correspondem a crescente demanda dos consumidores pela manutenção e melhoria da saúde (KIP et al., 2006; MIOČINOVIĆ et al., 2011).

4.5 Conclusão

Este estudo demonstrou que a inulina pode ser utilizada como substituto de gordura em queijo fresco, do tipo coalho, mantendo as suas características microbiológicas, químicas e sensoriais semelhantes ao produto convencional, rico em gordura. A utilização da inulina em queijos melhora os seus atributos nutricionais, atendendo a uma demanda dos consumidores por produtos com menores teores de gordura e semelhantes aos integrais.

Referências

AOAC 999.03. **Measurement of total fructans in foods. Official methods of analysis** (19th ed.). Arlington: AOAC International, 2012.

ARANGO, O. et al. Influence of fat replacement by inulin on rheological properties, kinetics of rennet milk coagulation, and syneresis of milk gels. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 1-13, 2013.

ARIAS-ARANDA; D.; ROMEROSA-MARTÍNEZ, M. M. Innovation in the functional foods industry in a peripheral region of the European Union: Andalusia (Spain). **Food Policy**, v. 35, p. 240-246, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1, p. 133, 26 de dezembro, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário Oficial da União**, p. 5-8, 16 de julho, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2018. Estabelece como oficiais os métodos constantes no Manual

de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Seção 1, 13 de julho, 2018a.

BURITI, F. C. A. et al. Textura instrumental e avaliação sensorial de queijo fresco cremoso simbiótico: implicações da adição de *Lactobacillus paracasei* e inulina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 1, p. 75-84, 2008.

CAVALCANTE, J. F. M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 205-214, 2007.

DOWNES, F. P.; ITO, H. **Compendium of methods for the microbiological examination os foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676p.

DRAKE, M. A. et al. Impact of fat reduction on flavor and flavor chemistry of Cheddar cheeses. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 11, p. 5069-5081, 2010.

FLAMM, G. et al. Inulin and Oligofructose as Dietary Fiber: A Review of the Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 5, p. 353-362, 2001.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofrutose. **British Journal of Nutrition**, v. 87, n. 2, p. 287-291, 2002.

FREITAS FILHO, J. R. et al. Avaliação dos parâmetros físico químicos do queijo coalho artesanal produzido em Calçado – PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Paraná, v. 6, n. 1, p. 722-729, 2012.

FREITAS, W. C. et al. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 35-42, 2013.

HENNELLY, P. J. et al. Textural, rheological and microstructural properties of imitation cheese containing inulin. **Journal of Food Engineering**, v. 75, p. 388-395, 2006.

JUAN, B. et al. Effect of inlin addition on the sensorial properties of reduced-fat fresh cheese. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, p. 1-6, 2013.

JUNYUSEN, T. et al. The effects of inulin on the textural, termal, and microstructural properties of reduced-fat cheese. **Suranaree Journal of Science and Technology**, v. 24, n. 1, p. 23-30, 2017.

KARIMI, R. et al. Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. **Cabohydrate Polymers**, v. 119, p. 85-100, 2015.

KIP, P. et al. Inulins improve sensoric and textural properties of low-fat yoghurts. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1098-1103, 2006.

LIBÓRIO, P. T. H. R. et al. Avaliação físico-química do soro de queijo coalho produzido no município de Jucati-PE. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 1, p. 42-45, 2017.

MAGISTRIS, T.; GÁLAN, B. L. Consumer's willingness to pay for nutritional claims fighting the obesity epidemic: the case of reduced-fat and low salt cheese in Spain. **Public Health**, v. 135, p. 83-90, 2016.

MANGUEIRA, T. F. B. et al. Teste de aceitabilidade sensorial de queijo de coalho com baixo teor de gordura e enriquecido com ferro. **Boletim do CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 279-290, 2002.

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 405-419, 2015.

MEYER, D. et al. Inulin as texture modifier in dairy products. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1881-1890, 2011.

MIOČINOVIĆ, J. et al. Development of low fat UF cheese technology. **Mljekarstvo**, v. 61, n. 1, p. 33-44, 2011.

MODZELEWSKA-KAPITUŁA, M.; KŁĘBUKOWSKA, L. Investigation of the potential for using inulin HPX as a fat replacer in yoghurt production. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 2, p. 209-214, 2009.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients^{1,2}. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 11, p. 2491-2502, 2007.

SALVATORE, E. et al. Replacement of fat with long-chain inulin in a fresh cheese made from caprine milk. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 1-5, 2014.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTOS, B. M. et al. Caracterização físico-química e sensorial de queijo de coalho produzido com mistura de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 3, p. 302-310, 2011.

SANTOS, J. S. et al. Diagnóstico das condições de processamento de produtos artesanais derivados do leite no Estado de Sergipe. **Revista Instituto de Laticínios "Cândido Tostes"**, v. 63, n. 363, p. 17-25, 2008.

SHOIAB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 444-454, 2016.

SILVA, M. C. D. et al. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SKEIE, S. et al. Improvement of the quality of low-fat cheese using a two-step strategy. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 153-162, 2013.

SOŁOWIEJ, B. et al. The effect of fat replacement by inulin on the physicochemical properties and microstructure of acid casein processed cheese analogues with added whey protein polymers. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 1-11, 2015.

TILOCCA, B. et al. Milk microbiota: Characterization methods and role in cheese production. **Journal of Proteomics**, v. 210, 2020.

APÊNDICE 1: FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL DOS QUEIJOS COM SUBSTITUIÇÃO PARCIAL DO SAL

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
Análise sensorial de queijo de coalho

Data: _____

Idade: _____

Sexo: () M () F

Você está recebendo quatro amostras codificadas. Por favor, prove da esquerda para a direita com intervalo de 20 segundos entre as amostras e faça a sua avaliação. Entre uma amostra e outra faça a limpeza da boca com água e biscoito. Das quatro amostras codificadas avalie cada atributo segundo o grau de gostar e desgostar utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

Quanto a cor:

- (9) gostei extremamente _____ ()
- (8) gostei moderadamente _____ ()
- (7) gostei regularmente _____ ()
- (6) gostei ligeiramente _____ ()
- (5) não gostei, nem desgostei _____ ()
- (4) desgostei ligeiramente _____ ()
- (3) desgostei regularmente _____ ()
- (2) desgostei moderadamente _____ ()
- (1) desgostei extremamente _____ ()

Quanto ao aroma:

- (9) gostei extremamente _____ ()
- (8) gostei moderadamente _____ ()
- (7) gostei regularmente _____ ()
- (6) gostei ligeiramente _____ ()
- (5) não gostei, nem desgostei _____ ()
- (4) desgostei ligeiramente _____ ()
- (3) desgostei regularmente _____ ()
- (2) desgostei moderadamente _____ ()
- (1) desgostei extremamente _____ ()

Quanto ao sabor:

- (9) gostei extremamente _____ ()
- (8) gostei moderadamente _____ ()
- (7) gostei regularmente _____ ()
- (6) gostei ligeiramente _____ ()
- (5) não gostei, nem desgostei _____ ()
- (4) desgostei ligeiramente _____ ()
- (3) desgostei regularmente _____ ()
- (2) desgostei moderadamente _____ ()
- (1) desgostei extremamente _____ ()

Quanto a textura:

- (9) gostei extremamente _____ ()
- (8) gostei moderadamente _____ ()
- (7) gostei regularmente _____ ()
- (6) gostei ligeiramente _____ ()
- (5) não gostei, nem desgostei _____ ()
- (4) desgostei ligeiramente _____ ()
- (3) desgostei regularmente _____ ()
- (2) desgostei moderadamente _____ ()
- (1) desgostei extremamente _____ ()

Após avaliação de cada atributo, avalie globalmente cada amostra segundo o grau de gostar e desgostar utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

- (9) gostei extremamente _____ ()
- (8) gostei moderadamente _____ ()
- (7) gostei regularmente _____ ()
- (6) gostei ligeiramente _____ ()
- (5) não gostei, nem desgostei _____ ()
- (4) desgostei ligeiramente _____ ()
- (3) desgostei regularmente _____ ()
- (2) desgostei moderadamente _____ ()
- (1) desgostei extremamente _____ ()

Das quatro amostras codificadas avalie cada uma segundo a sua intenção de compra utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

- (7) compraria sempre _____ ()
- (6) compraria muito frequentemente _____ ()
- (5) compraria frequentemente _____ ()
- (4) compraria ocasionalmente _____ ()
- (3) compraria raramente _____ ()
- (2) compraria muito raramente _____ ()
- (1) nunca compraria _____ ()

APÊNDICE 2: FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL DOS QUEIJOS COM ADIÇÃO DE INULINA

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO SENSORIAL DE QUEIJO COALHO

Sexo: M () F () Idade: _____ Data: ____ / ____ / ____

Você está recebendo três amostras codificadas. Por favor, prove da esquerda para a direita com intervalo de 20 segundos entre as amostras e faça a sua avaliação. Entre uma amostra e outra faça a limpeza da boca com água e biscoito.

Das três amostras codificadas avalie cada atributo segundo o grau de gostar e desgostar utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

- 1-Desgostei muitíssimo
- 2-Desgostei muito
- 3-Desgostei moderadamente
- 4-Desgostei ligeiramente
- 5-Nem gostei/Nem desgostei
- 6-Gostei ligeiramente
- 7-Gostei moderadamente
- 8-Gostei muito
- 9-Gostei muitíssimo

Indique o quanto você gostou da **COR** das amostras:

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()

Indique o quanto você gostou do **AROMA** das amostras:

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()

Indique o quanto você gostou do **TEXTURA** das amostras:

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()

Indique o quanto você gostou do **SABOR** das amostras:

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()

Após avaliação de cada atributo, avalie a **ACEITAÇÃO GLOBAL** de cada amostra segundo o grau de gostar e desgostar utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()

INTENÇÃO DE COMPRA

Das três amostras codificadas avalie cada uma segundo a sua intenção de compra utilizando a escala abaixo e escreva ao lado de cada código a numeração correspondente a sua avaliação:

- 1-Certamente compraria
- 2-Provavelmente compraria
- 3-Tenho dúvida se compraria
- 4-Provavelmente não compraria
- 5- Certamente não compraria

Amostra _____ () Amostra _____ () Amostra _____ ()