

## A POTENCIALIDADE MICROBIOLÓGICA DE COAGULAÇÃO DO COALHO LÍQUIDO ARTESANAL

*Andreza Mendonça dos Santos Peixoto*

Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup> e Ex aluna da UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi Árido  
E- mail: andreza-peixoto@hotmail.com

*Everardo Ferreira Praça.*

Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>. D. Sc. e Professor da UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi Árido  
E- mail: everardo@esam.br

*Vilson Alves de Góis*

Eng<sup>o</sup>. Agr<sup>o</sup>. D. Sc. e Professor da UFERSA – Universidade Federal Rural do Semi Árido  
E- mail: vilson@esam.br

**RESUMO** - O queijo de coalho artesanal por ser elaborado com leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades ou pequenas indústrias não apresenta segurança microbiológica apresentando problemas de contaminação. O presente trabalho teve como objetivo a avaliação microbiológica do coalho líquido artesanal e no queijo produzido por ele para avaliar os diferentes tipos de contaminantes presentes neles. Utilizou-se como coagulante o quarto estômago de bovino fresco brevemente lavado e como solução extratora o soro de leite fervido contendo ácido bórico 0,5% e cloreto de sódio 4%. Os coalhos foram preparados para que tivessem a concentração final de 2, 4, 6, 8, 10 gramas de estômago por 100ml de solução extratora. Os coalhos utilizados foram eficientes na manufatura dos queijos sendo os mais eficientes os de concentração de 80 e 100g/L de coalho bovino. Analisou-se microbiologicamente para determinar os contaminantes de coliformes fecais, bactérias mesófilas, bolores e leveduras nos coalhos artesanais e os queijos com os seguintes resultados: Para o coalho industrial não apresentou contaminação, para os coalhos de 8 e 10g% de coalho bovino apresentaram 14,8 e 300 para leveduras e 19,2 e 15,2 UFC/ml de bolores, não apresentando bactérias mesófilas e coliformes fecais. Para os queijos produzidos com os coalhos, industrial e os de 8 e 10g% de coalho bovino. Para leveduras 163,6, 0,4 e 22,8 e bolores 25,4, 22,6 e 0,6 UFC/g, bactérias mesófilas  $1,3 \times 10^3$ ,  $3,0 \times 10^3$  e  $7,3 \times 10^3$ , coliformes fecais  $17 \times 10^3$ ,  $28 \times 10^3$  e  $9,0 \times 10^3$  UFC/g respectivamente.

**Palavra chave:** Microbiologia. Coliformes Fecais. Bactérias Mesófilas. Bolores e Leveduras.

## THE POTENCIALIDADE MICROBIOLOGICAL OF COAGULAÇÃO OF COALHO EQUITY ARTESANAL.

**ABSTRACT** - The artisanal cheese rennet, to be prepared with raw milk without due care and hygiene in small properties and small industries presents no microbiological safety presenting problems of contamination. This study aimed to evaluate the microbiological of liquid rennet craft and the cheese produced by it to evaluate the different types of contaminants present in them. Used as a coagulant the serum of boiled milk containing boric acid 0.5% and sodium chloride 4%. The coalhos were prepared to have a final concentration of 2, 4, 6, 8, 10 grams of stomach per 100ml of solution extratora. The coalhos used were efficient in the manufacture of the cheese being the most efficient of the concentration of 80 and 100 / L of rennet veal. Examined microbiologically is to determine the contaminants of fecal coliform, mesophilic bacteria, molds and yeasts in coalhos craft and cheese with the following results: For the rennet has not produced industrial contamination, for coalhos of 8 and 10% of veal rennet submitted 14 , 8 and 300 for yeast and 19.2 and 15.2 CFU / ml of mold, not presenting mesophilic bacteria and fecal coliform. For the cheese produced with the coalhos, industrial and of 8 and 10% of rennet veal. For yeast 163.6, 0.4 and 22.8 and mold 25.4, 22.6 and 0.6 CFU / g, bacteria mesophilic  $1.3 \times 10^3$ ,  $3.0 \times 10^3$  and  $7.3 \times 10^3$ , faecal coliforms  $17 \times 10^3$ ,  $28 \times 10^3$  and  $9.0 \times 10^3$  UFC / g respectively.

**Keyword:** Microbiology. Coliform Fecais. Bacteria Mesófilas. Bolores and yeasts.

## **INTRODUÇÃO**

Dentre os produtos derivados do leite, o queijo é considerado um veículo freqüente de patógenos de origem alimentar e, em especial, os queijos frescos artesanais por serem, na maioria das vezes, elaborados a partir de leite cru e não sofrerem processo de maturação. A contaminação microbiana desses produtos assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos.

Queijos artesanais como os de coalho são típicos da região nordeste e muito difundidos no Estado do Rio Grande do Norte. O queijo de coalho, por ser elaborado, em quantidade considerável, a partir de leite cru e sem os devidos cuidados de higiene, em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias que não adotam as boas práticas de fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização da qualidade apresentando problemas de contaminação, devido à manipulação inadequada após o processamento.

Originalmente o coalho eram as próprias vísceras de um animal abatido, necessariamente macho, as vísceras eram mergulhadas no leite e as enzimas e os microorganismos envolvidos na digestão animal coagulavam as proteínas do leite. Entretanto, essa prática produzia um produto extremamente contaminado uma vez que o coalho não era submetido a qualquer tratamento prévio. Atualmente as vísceras foram substituídas por um coalho industrial, mas o processo continua rústico desprovido de maiores recursos.

Tanto no Brasil como na região nordeste e também no Rio Grande do Norte o coalho é utilizado principalmente na fabricação de queijos, eles tanto são feitos com coalho líquido como o em pó, a produção desses produtos feitos tanto de fabricação artesanal quanto na industrial. Esses produtos que são feitos a partir do leite só existem devido a um ingrediente de maior importância que é o coalho que tem o poder de coagular o leite e transformar em seus derivados. O coalho não sendo de boa qualidade poderá trazer vários danos a as pessoas causando doenças causadas por microorganismos maléficis contidos nele.

A presença de microrganismos no ambiente de processamento dos alimentos pode levar à contaminação do produto acabado, reduzindo a sua qualidade. As fontes de contaminação do meio ambiente incluem alimentos, manipuladores, animais, insetos, além de equipamentos, utensílios e componentes estruturais do prédio mal higienizados. O ar, o ambiente, as embalagens primárias, as mãos dos funcionários, bem como os equipamentos e os utensílios, constituem pontos importantes que devem ser ajustados às boas práticas de fabricação (BPF) de forma a não representarem risco de contaminação para o produto.

A qualidade de um produto está diretamente relacionada com a qualidade da matéria-prima empregada na sua elaboração. A microflora inicial influencia grandemente nessa qualidade do leite cru e conseqüentemente dos produtos com ele fabricados. As técnicas usuais de manuseio de leite cru frequentemente resultam em altas contagens de psicotróficos antes da fabricação de queijos, que através de suas atividades proteolíticas e lipolíticas produzem substâncias indesejáveis ao produto.

Por suas características de processamento inadequado, os queijos produzidos em pequenas fábricas, ou artesanalmente, apresentam em geral uma grande quantidade de microorganismos responsáveis pela deteriorização e ou a redução da vida útil, indicadores de, mas condições higiênicas sanitárias do processamento além da manipulação inadequada da matéria prima, utensílio e equipamento.

O consumo do queijo tipo coalho é preocupante uma vez que este tipo de produto não permite que haja pasteurização do leite, sendo produzido com leite cru, para que as características sensoriais do produto sejam mantidas, e o mesmo tenha o sabor e a consistência característicos.

Considerando-se o importante papel que os microrganismos desempenham com relação à qualidade e conservação do leite e seus derivados, torna-se de grande interesse o conhecimento mais detalhado desses grupos de microrganismos comumente envolvidos de forma benéfica, como aqueles responsáveis por fermentações indispensáveis na fabricação de vários produtos, ou de forma maléfica, causando defeitos e deteriorações das mais diversas.

Principalmente no interior da Região Nordeste, na manufatura do queijo, é utilizado em larga escala o coalho artesanal, praticamente sem tratamento prévio, o que induz à produção de um produto final com os contaminantes naturais do coalho. Portanto o objetivo deste trabalho é avaliar os diferentes tipos de contaminantes presentes no leite como coliformes fecais, bactérias mesófilas, leveduras e bolores para avaliar as condições sanitárias do coalho proposto neste trabalho.

As tecnologias de fabricação do queijo coalho na região nordeste empregam uma parcela considerável de pequenos produtores estabelecidos na zona rural. Porém, por suas características de processamento inadequado, os queijos produzidos em pequenas fábricas ou de forma artesanal, geralmente apresentam grande quantidade de microorganismos. Isso se traduz em deterioração e redução da vida útil do produto, além de apresentar riscos para o consumidor (BARROSO, 2006).

O registro dos queijos regionais do nordeste pode ser inserido nesta perspectiva de que o sabor diferenciado dos queijos artesanais nordestinos abre a possibilidade de tornar os produtos com alto valor

agregado por uma indicação de procedência. Para tanto, é necessário que seja feito um esforço concentrado de ações de transferência de conhecimentos, para incorporar avanços sanitários e tecnológicos, sem descaracterizar a produção. Devemos estimular o pequeno produtor a defender sua tradição e identidade, ao mesmo tempo em que se deve investir na sua capacitação (BARROSO 2006).

Todos os coagulantes apresentam a mesma ação primária que é de coagular o leite, mas, os efeitos subsequentes podem ser diferentes para cada tipo de coagulante pelo fato de se tratar de enzimas diferentes quer ser pela fabricação quer ser pela cura ou ate mesmo pelos auxiliares tecnológicos que são diferentes. As características desses coalhos comerciais são definidas pela sua pureza bacteriológica, conhecimento de sua força e respectivo poder de conservação (LIMA, 2006).

Os microorganismos proteolíticos, como o nome indica, são responsáveis pela quebra de proteínas. Em sua ação, provocam alterações no aroma, sabor e características físico-químicas do leite e derivados. Embora os microorganismos tipicamente proteolíticos sejam indesejáveis, certas bactérias lácticas possuem alguma atividade proteolítica, a qual é importantíssima na maturação dos queijos. Fazem parte deste grupo os *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* e *Bacillus*. Associados aos microorganismos proteolíticos, e geralmente tão indesejáveis quanto eles, estão os lipolíticos, responsáveis pela quebra nas gorduras que acarreta como principal problema, o ranço. A maioria deles tem características psicotróficas. Entre os microorganismos lipolíticos encontram-se bactérias como *Pseudomonas* e *Alcaligenes* e fungos, como *Candida* e *Geotrichum* (PERRY, 2004).

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os laticínios, pela própria matéria-prima que utilizam e pelo alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente suscetíveis a essa contaminação. Daí, a importância da conscientização dos profissionais do setor, em todos os níveis, para a necessidade da implantação de programas de boas práticas de fabricação e do controle permanente dos processos e seus pontos críticos (PERRY, 2004).

Cuidados especiais devem ser tomados quanto à seleção do leite e quanto à presença de esporulados e contaminações com coliformes. Lembramos que o queijo tem um pH muito alto (5,7) quando se usa fermento ou mais alto (6,3-6,5) quando não se usa fermento e daí facilmente as bactérias contaminantes encontram condições de desenvolverem. O uso do nitrato de sódio é indicado (MUNCK, 2006).

Vários estudos (BASTOS et al., 2000), (PAIVA et al., 1999) e (SANTOS et al., 1995), sobre a qualidade

microbiológica de queijo de coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos e contagens de microrganismos deterioradores em números que excedem, as vezes, os limite estabelecidos pela legislação (BRASIL, 1996 e 2001).

A análise microbiológica para se verificar quais e quantos microorganismos estão presentes e fundamental para se conhecer as condições de higiene em que o alimento foi preparado, os riscos que o alimento pode oferecer a saúde do consumidor e se o alimento terá ou não a vida útil pretendida. Essa análise e indispensável também para verificar se os padrões e especificações microbiológicos para alimentos, nacionais ou internacionais, estão sendo atendidos adequadamente (FRANCO e LANDGRAF, 1996)

O método de contagem de microorganismos em placas e um método geral, que pode ser utilizado para contagem de grandes grupos microbianos, como aeróbios, mesófilos, termófilos bolores e leveduras, variando-se o tipo de meio, a temperatura e o tempo de incubação (HAJDENWURCEL, 1998; SILVA et al., 1997).

No Brasil, resolução RDC n° 12, da agencia nacional de vigilância sanitária do ministério da saúde (ANVISA), de 2 de janeiro de 2001 estabelece os padrões microbiológicos sanitários para os alimentos destinados ao consumo humano.

Em relação aos analisados neste trabalho os padrões microbiológicos da referida resolução estabelece para o queijo:

- Coliformes fecais no máximo de  $5,0 \times 10^3$
- Bactérias Mesófilas: não estabelece limites máximos para produtos obtidos de fermentações sendo detectáveis alterações com quando os alimentos apresentarem números superiores de no máximo de  $10^6$ .
- Leveduras e bolores: não estabelece limites máximos para produtos obtidos de fermentações, sendo detectáveis alterações com quando os alimentos apresentarem números superiores de no máximo de  $10^6$ .

Segundo a ICMSF (1984) o número de microorganismos aeróbios mesófilos (contagem em placas) encontrado em um alimento tem sido um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados, indicando se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura durante os processos de tratamento industrial, transporte e armazenamento foram realizados de forma adequada. Como exemplos de microorganismos indicadores podem ser agrupados em:

1. Microorganismos que não oferecem riscos direto a saúde: Bactérias mesófilas, bolores e leveduras.

2. Microorganismos que oferecem um risco baixo ou indireto a saúde: Coliformes totais e fecais.

A presença de bolores e leveduras viáveis e em índices elevados nos alimentos podem fornecer várias informações, tais como, condições higiênicas deficientes de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento e/ou estocagem e matéria prima com contaminação excessiva (SIQUEIRA, 1995). O código sanitário não de termina valores limite máximo de microorganismos. No máximo  $10^6$ .

A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós processamento. Segundo Franco, (2005), os microorganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deteriorização potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento. De acordo com os níveis da ANVISA estabelece  $5,0 \times 10^3$

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Fabricação do coalho**

O experimento realizou-se no laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), localizado no Município de Mossoró, Região Oeste do Estado do Rio Grande do Norte, no período de fevereiro a maio de 2007.

A matéria prima utilizada neste trabalho foi obtida do Abatedouro e Frigorífico Industrial de Mossoró - AFIM.

Utilizou-se como coagulante o quarto estômago fresco de bovinos adultos brevemente lavados com água corrente.

Para o teste de coagulação e para a fabricação do queijo final utilizou-se o leite cedido pelo setor de bovinocultura da UFERSA.

O coalho líquido artesanal foi preparado retirando-se o excesso de gordura do estômago e lavando-se com água corrente somente o necessário para retirar o excesso de resíduos sólidos. O excesso de água foi eliminado colocando-se o estômago lavado em bandeja contendo papel filtro. Em seguida o coalho foi colocado em soluções extratoras.

Para a extração das enzimas utilizou-se o soro de leite fervido, contendo ácido bórico a 0,5% e cloreto de sódio a 4%.

Para a extração das enzimas picou-se o estômago fresco (brevemente lavado) em pequenos pedaços em uma tábua de madeira e com faca de

cozinha amolada, em seguida transferiu-se os pedaços do coalho para placas de petri e pesou-se em balança analítica 5, 10, 15, 20 e 25g da amostra. Colocou-se as amostras em beckers de 50 ml e acrescentou-se 30 ml de solução extratora para facilitar a maceração; macerou-se, separadamente cada amostra, com bastão de vidro na solução de soro de leite fervido contendo ácido bórico a 0,5% e cloreto de sódio a 4%. Depois de maceradas, deixou-se as amostras em repouso durante 24 horas. Em seguida filtrou-se, em papel filtro, e transferiu-se para balão volumétrico de 250 ml e completou-se o volume com solução extratora. No final as amostras ficaram com as concentrações de 5, 10, 15, 20 e 25g/250mL de solução extratora.

Depois de preparados as amostras de coalho foram acondicionadas em erlenmeyers de 250 ml com tampas de papel alumínio e colocados em geladeira a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  para uso posterior.

Para testar a força do coalho diluiu-se 1ml do coalho líquido artesanal em 500 ml de leite pré-aquecido a  $35^\circ$ , em beckers de 500ml. Mediu-se o tempo gasto, em segundos, para a formação das primeiras gramas de coalhada. Com este dado, calculou-se a força do coalho usando-se a seguinte fórmula, conforme o Manual para fabricação de laticínios (CETEC. 1985 p.14):

$$F = \frac{L \times 2400}{C \times T} \quad (1)$$

Onde:

F= força do coalho

L= quantidade de leite, em mL

C= quantidade de coalho, em gramas

T= tempo de coagulação, em segundos.

### **Fabricação do queijo**

Utilizou-se 5L de leite, aquecido à temperatura de  $35^\circ\text{C}$  com temperatura controlada por termômetro. Nesse leite acrescentou-se 1 grama de cloreto de cálcio dissolvido previamente em água destilada.

#### **Coagulação do Leite**

Adicionou-se 10ml do coalho ao leite em temperatura de  $35^\circ\text{C}$  e homogeneizou-se de modo que a mistura ficasse bem uniforme. Logo após, deixou-se a mistura em repouso até completa coagulação do leite.

Considerou-se como sendo o ponto de corte ideal quando a coalhada formada tornou-se brilhante e o soro adquiriu coloração esverdeada.

Efetou-se o corte de modo que a coalhada ficasse em pequenos pedaços e depois deixou-se em repouso durante 3 minutos. Após esse tempo, mexeu-se a coalhada utilizando uma colher de pau durante 5 minutos, tendo o cuidado de mexer lentamente para preservar os pedaços de coalhada inteiros. Cinco minutos depois repetiu-se a operação sendo que mexendo um pouco mais rapidamente. Em seguida

deixou-se a coalhada repousar até total decantação no fundo do recipiente.

Após a decantação da coalhada, retirou-se aproximadamente 50% do soro, com auxílio de uma concha. O soro retirado foi aquecido até 70°C, quando começa a surgir uma espuma branca na superfície do recipiente. Antes de adicionar o soro aquecido, a massa foi homogeneizada para desagregar os pedaços. A adição do soro foi feita de maneira lenta e com homogeneização constante para que no final da adição, a massa atingisse uma temperatura de 55° a 60°.

Após a adição do soro continuou-se a homogeneização, mexendo mais rápido, até a formação de uma massa uniforme. Considerou-se como ponto da massa quando ao comprimir com a mão a massa formava um agregado e, ao comprimir com os dedos, esfarelava-se.

Ao ser obtido o ponto da massa, parou-se de mexer e retirou-se em torno de 90% do soro contido na massa.

Após a retirada do soro da massa, adicionou-se o sal dissolvido em uma solução de soro filtrado de modo que a concentração final fosse de 6g de sal para 100 gramas de queijo. A massa foi homogeneizada, para melhor incorporação do sal, até terminar a adição da solução salina.

Após a salga da massa realizou-se uma prensagem prévia com as mãos para eliminar parte do soro e, logo em seguida, transferiu-se a massa para uma forma de plástico retangular com furos para que pudesse sair o soro remanescente.

A massa enformada foi colocada em uma prensa para queijos e de hora em hora ajustou-se a pressão de modo que todo o soro fosse eliminado. Durante a prensagem o queijo pré-formado foi desenformado e virado para que houvesse eliminação

homogênea do soro. Após a eliminação do soro o queijo foi colocado em temperatura ambiente para serem curados.

Os queijos foram curados durante 24 horas à temperatura ambiente. Durante a cura, os queijos foram virados diariamente e cobertos com um pano para evitar contaminações. Após esse período, os queijos foram acondicionados em geladeira a 4±2°C.

#### **Análise microbiológica do coalho e do queijo**

As amostras foram a parti do coalho bovino obtido no AFIM (Abatedouro e Frigorífico Industrial de Mossoró) e do leite vindo do setor de bovinocultura da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido), para produção do coalho líquido artesanal e produção do queijo artesanal. Após a aquisição foram transportadas para o laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde foram preparadas as amostras de coalho líquido artesanal e do queijo. Após o preparo foram transferidos para o laboratório de fitopatologia do departamento de fitossanidade da UFERSA (Universidade Federal Rural do Semi-Árido), onde foram feitas as análises microbiológicas, sendo 3 amostras de coalho líquido e três amostras de queijo produzido com os coalhos líquidos..

Utilizou-se o meio de cultura específico para cada grupo de microorganismos, SBR para análise de bolores e leveduras, VRB para coliformes fecais e o PCA bactérias mesófilas.

Para a detecção de bolores e leveduras foi utilizado o meio de cultura SBR, neste caso foi utilizado o equivalente comercial Sabouraud Dextrose Ágar cujos componentes estão relacionados na quadro 03.

---

#### **COMPOSIÇÃO**

ENZIMAS DIGESTIVA DE CASEINA	5g
ENZIMA DIGESTIVA DE TECIDO ANIMAL	5g
DEXTROSE	40g
ÁGAR	15g
AGUA DESTILADA	1000ml

---

Quadro 01 – Constituinte do meio de cultura Sabouraud Dextrose Ágar.

O meio de cultura utilizado foi o SBR, onde foi dissolvido 65g/L de meio em água destilada esterilizada e depois autoclavado a 121°C por 15 minutos, deixou-se resfriar a 44 – 46°C e em seguida verteu-se em placas de petri cerce de 15 a 20ml de meio fundido e resfriado. Depois esperou-se o tempo de solidificação do ágar foi

adicionado o ácido tartárico 10% para acidificar o meio, só depois de resfriado e já fundido. Ficou em temperatura ambiente 25 – 30°C por um período de incubação de 72 h.



Figura 01 – Meio de cultura SBR com desenvolvimento de bolores e leveduras.

#### Para o coalho

Adicionou-se ao meio 1 ml de coalho líquido artesanal com 25 e 20g de coalho bovino e 1ml de coalho líquido industrial ao meio de cultura e verteu-se nas placas de petri.

#### Para o queijo

Adicionou-se ao meio 1grama de queijo artesanal produzido com o coalho líquido artesanal com 25 e 20g de coalho bovino e 1grama de queijo produzido com o coalho líquido industrial ao meio de cultura e verteu-se nas placas de petri.

Para a detecção de bactérias mesófilas foi utilizado o meio de cultura PCA, sendo utilizado seu equivalente comercial Standard Methods Ágar cujos componentes estão relacionados no quadro 04.

---

#### **COMPOSIÇÃO**

ENZIMA DIGESTIVA DE CASEÍNA	5g
EXTRATO DE LEVEDURA	2,5g
DEXTROSE	40g
ÁGAR	15g
AGUA DESTILADA	1000ml

---

Quadro 02 - Constituinte do meio de cultura Standard Methods Ágar.

O meio de cultura utilizado foi o PCA, onde foram dissolvidos 23,6g/L de meio em água destilada esterelizada e depois autoclavado a 121°C por 15 minutos, deixou-se resfriar a 44 – 46°C e em seguida verteu em placas de petri cerce de 15 a 20ml do meio

fundido e resfriado. Depois esperou-se o tempo de solidificação do ágar para serem invertidas e incubadas em uma BOD a uma temperatura de 37°C ± 1°C por 48 h.

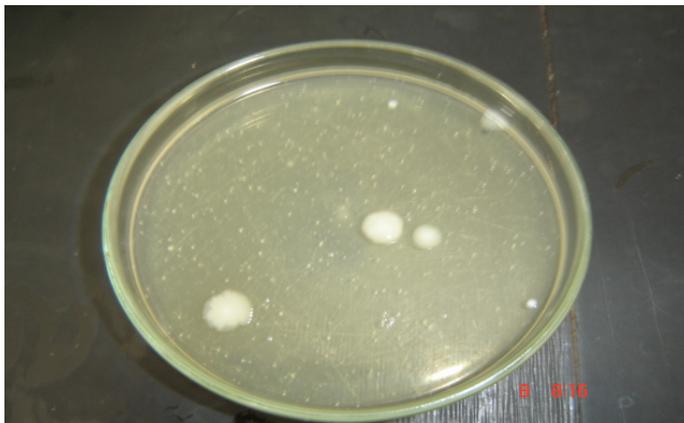


Figura 02 - Meio de cultura PCA com desenvolvimento de bactérias mesófilas.

#### **Para o coalho**

Adicionou-se ao tubo de cultura 1 ml do coalho líquido em um tubo de cultura contendo 9ml de água destilada esterelizada fazendo diluições em série até  $10^{-3}$  e depois adicionadas 1ml da última diluição ao meio de cultura, verteu-se em placas de petri a última diluição, feito para as três amostras, duas de coalho líquido artesanal e uma com coalho líquido industrial.

#### **Para o queijo**

Adicionou-se 1 grama de queijo em 1 tubo de cultura contendo 10ml de água destilada esterelizada, sendo macerado e depois retirado 1ml da suspensão para ser feito diluições em série em outros três tubos de cultura contendo 9ml de água destilada esterelizada. A última diluição foi a de  $10^{-3}$ , retirou-se 1ml da última diluição e adicionou ao meio de cultura, verteu-se nas placas de Petri, sendo feita para as três amostras de queijo artesanal produzido com o coalho líquido artesanal com 25 e 20g de coalho bovino e do queijo produzido com o coalho líquido industrial.

Para detecção de coliformes fecais foi utilizado o meio de cultura VRB, sendo utilizado o seu equivalente comercial Violet Red Bile Ágar cujos componentes estão relacionados no quadro 05.

---

#### **COMPOSIÇÃO**

EXTRATO DE LEVEDURA	3g
ENZIMA DIGESTIVA DE GELATINA	7g
MISTURA DE SAIS DE BILE	1,5g
LACTOSE	10g
CLORETO DE SODIO	5g
NEUTRAL RED	0,03g
CRISTAL DE VIOLETA	0,002g
ÁGAR	15g
AGUA DESTILADA	1000ml

---

Quadro 03 - Constituinte do meio de cultura Violet Red Bile Ágar.

O meio de cultura utilizado foi o VRB, onde foram dissolvidos 41,6g/L de meio em água destilada esterelizada e depois colocado em banho-maria com vapor fluente por 30 minutos, deixou-se resfriar a  $44 - 46^{\circ}\text{C}$  e em seguida verteu em placas de petri cerca de 15

a 20ml do meio fundido e resfriado. Depois esperou-se o tempo de solidificação do ágar para verter mais 5ml de meio para serem invertidas e incubadas em uma BOD a uma temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24h.

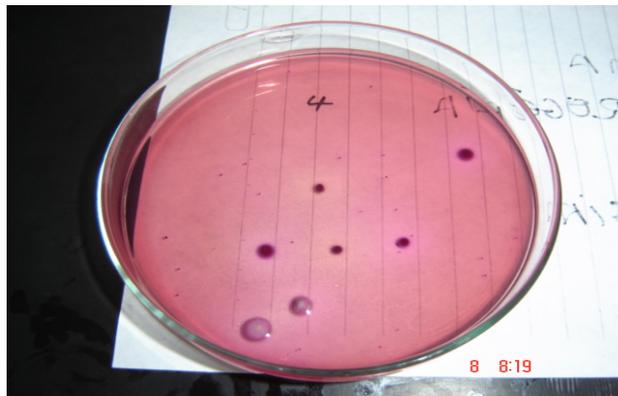


Figura 03 - Meio de cultura VRB com desenvolvimento de coliformes fecais

#### Para o coalho

Adicionou-se 1 ml de coalho líquido em um tubo de cultura contendo 9ml de água destilada esterelizada em cada tubo fazendo diluições até  $10^{-3}$  e depois adicionadas 1ml da última diluição ao meio de cultura, verteu-se em placas de Petri sendo repetidas para as três diluições de coalho líquido artesanal com 25 e 20g de coalho bovino e 1ml de coalho líquido industrial.

#### Para o queijo

Adicionou-se 1 grama de queijo artesanal produzido com o coalho líquido artesanal com 25 e 20g de coalho bovino e do queijo produzido com o coalho líquido industrial. Em 1 tubo de ensaio contendo 10ml de água destilada esterelizada, macerou-se e depois foi retirado 1ml da suspensão para 3 tubos de ensaio contendo 9ml de água destilada esterelizada, a última diluição foi a de  $10^{-3}$  adicionada 1ml ao meio de cultura, verteu-se nas placas de petri.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### **Poder de coagulação do coalho líquido artesanal**

- 5g ou 2% de coalho bovino, as primeiras gramas de coalhada foi formada em 20'

Tarnsformação do tempo em segundos

$$T = 20 \times 60 = 1200 \text{ segundos}$$

Força do coalho

L = 500 ml

C = 1 ml de coalho líquido

$$F = \frac{500 \times 2400}{1} = 1.000 \text{ ou } 1: 1000$$

1x1200

A força do coalho líquido artesanal feito com 20g de coalho bovino por litro de leite fervido foi de 1: 1000.

- 10g ou 4% de coalho bovino, as primeiras gramas de coalhada foi formada em 18'

Tarnsformação do tempo em segundos

$$T = 18 \times 60 = 1080 \text{ segundos}$$

Força do coalho

L = 500 ml

C = 1 ml de coalho líquido

$$F = \frac{500 \times 2400}{1} = 1.111 \text{ ou } 1: 1111$$

1x1080

A força do coalho líquido artesanal feito com 40g de coalho bovino por litro de leite fervido foi de 1: 1111..

- 15g ou 6% de coalho bovino, as primeiras gramas de coalhada foi formada em 15'

Tarnsformação do tempo em segundos

$$T = 15 \times 60 = 900 \text{ segundos}$$

Força do coalho

L = 500 ml

C = 1 ml de coalho líquido

$$F = \frac{500 \times 2400}{1} = 1.333 \text{ ou } 1: 1333$$

1x900

A força do coalho líquido artesanal feito com 60g de coalho bovino por litro de leite fervido foi de 1: 1333.

- 20g ou 8% de coalho bovino, as primeiras gramas de coalhada foi formada em 12'

Tarnsformação do tempo em segundos

$$T = 12 \times 60 = 660 \text{ segundos}$$

Força do coalho

L = 500 ml

C = 1 ml de coalho líquido

$$F = \frac{500 \times 2400}{1 \times 660} = 1.818 \text{ ou } 1:1818$$

A força do coalho líquido artesanal feito com 80g de coalho bovino por litro de leite fervido foi de 1:1666.

- 25g ou 10% de coalho bovino, as primeiras gramas de coalhada foi formada em 10'

Transformação do tempo em segundos

$$T = 10 \times 60 = 600 \text{ segundos}$$

Força do coalho

L = 500 ml

C = 1 ml de coalho líquido

$$F = \frac{500 \times 2400}{1 \times 600} = 2.000 \text{ ou } 1:2000$$

1x600

A força do coalho líquido artesanal feito com 100g de coalho bovino por litro de leite fervido foi de 1:2000.

O poder de coagulação do coalho líquido artesanal aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração do coalho bovino e com o tempo de coagulação como mostram os gráficos 01 e 02. Este resultado era esperado uma vez que, logicamente, a concentração de enzimas coagulantes será maior quanto maior a concentração do coalho bovino utilizado na manufatura do coalho líquido artesanal. Esse comportamento é semelhante ao encontrado por Sousa et al (2006) quando avaliou a produção do poder de coagulação do coalho líquido artesanal.

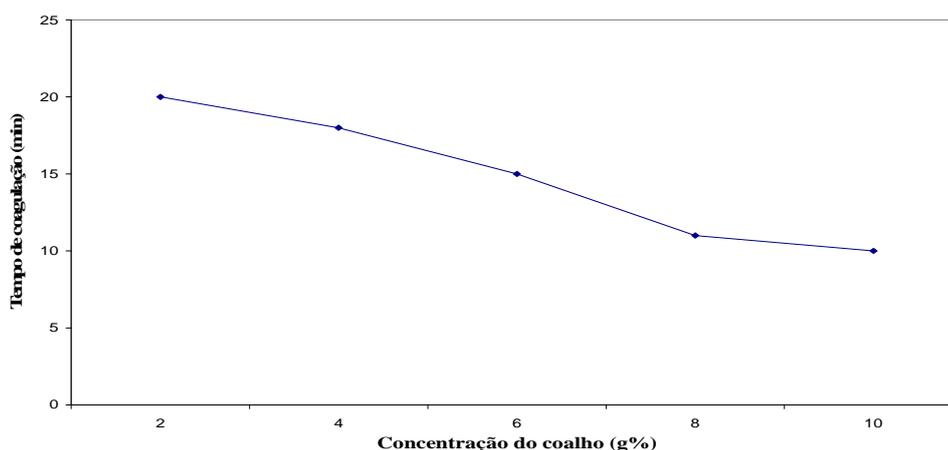


Gráfico 01 - Coagulação do leite utilizando o coalho líquido artesanal produzido com coalho bovino fresco brevemente lavado e extraído com soro de leite fervido.

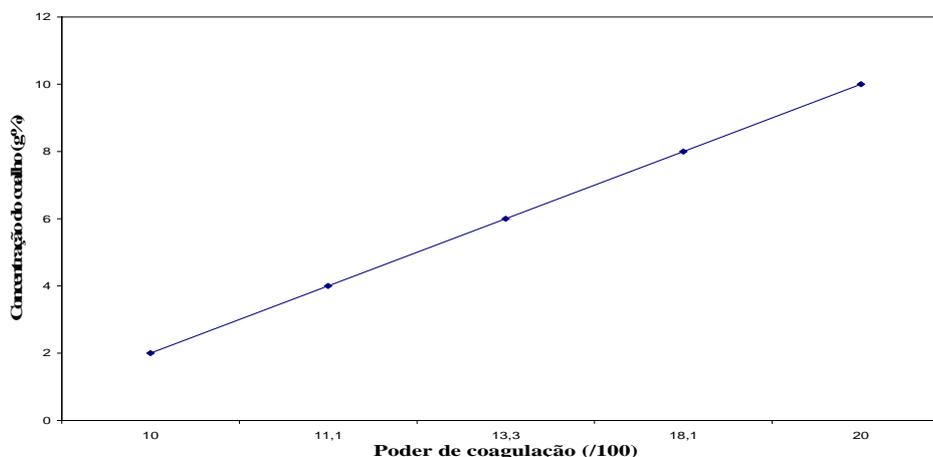


Gráfico 02 - Força do coalho líquido artesanal produzido com coalho bovino fresco brevemente lavado e extraído com soro de leite fervido.

Outro aspecto a ser levado em consideração é o fato de que mesmo armazenado sob refrigeração durante sete meses, o coalho líquido artesanal conservou 90% do seu poder de coagulação uma vez que, conforme Sousa et al (2006), o poder de coagulação inicial foi de 1:222 e, no presente trabalho, após sete meses, a força de

coagulação foi de 1:2000, o que mostra a viabilidade de conservação do coalho líquido artesanal (Quadro 04). Quando comparado com o coalho líquido industrial, o poder de coagulação, ainda de acordo com Sousa et al (2006), não houve diferença significativa entre os dois coalhos.

<b>Coalhos líquidos artesanais</b>		
<b>Concentração do coalho (g%)</b>	<b>Tempo de coagulação (min.)</b>	<b>Poder de coagulação</b>
2	20	1: 1000
4	18	1: 1111
6	15	1: 1333
8	11	1: 1818
10	10	1: 2000

<b>Coalho líquido industrial*</b>		
<b>Concentração do coalho (g%)</b>	<b>Tempo de coagulação (min.)</b>	<b>Poder de coagulação</b>
8	8	1:2500

\*Utilizado para comparação do coalho líquido artesanal

Quadro 04 – Poder de coagulação do coalho líquido artesanal extraído com soro de leite fervido e do coalho líquido industrial.

O poder de coagulação do coalho é de grande importância uma vez que pode provocar perdas de gorduras e proteínas no soro no momento do corte da coalhada o que além de desvalorizar o produto nutricionalmente, encarece o custo final de produção. (Lima, 2006).

#### **Análise microbiológica do coalho líquido artesanal.**

A análise microbiológica do coalho líquido artesanal comparado com a do coalho líquido industrial mostra, no quadro 05 que em ambos não houve contaminações de bactérias mesófilas e nem de coliformes fecais para os meios de cultura específicos utilizados. Entretanto, o coalho líquido artesanal apresentou outros contaminantes como bolores e

leveduras. Contudo a Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) não estabelece limites para esses contaminantes para produtos de ação fermentativas, e mesmo para alimentos, a legislação observa que os níveis não devem ultrapassar  $10^6$  UFC/ml, portanto, o coalho líquido artesanal teve contaminantes muito abaixo do limite estabelecido.

Os coalhos produzidos a partir de 8 e 10g% de coalho bovino apresentaram uma média de 14,8 e 300 UFC/ml para leveduras e 19,2 e 15,2 UFC/ml de bolores, não apresentando bactérias globais e nem coliformes fecais (Quadro 05).

Nascimento et al. (1985) encontrou contagens altas de bolores e leveduras variando de  $4,4 \times 10^5$  até  $3,8 \times 10^7$  UFC/ml.

<b>Meios de cultura/ alimentos</b>	<b>SBR</b>		<b>PCA</b>	<b>VRB</b>
	<b>Leveduras*</b>	<b>Bolores*</b>	<b>Bactérias mesófilas*</b>	<b>Coliformes fecais*</b>
<b>Coalho industrial</b>	0	0	0	0
<b>Coalho produzido com 8g% coalho bovino</b>	14,8	19,2	0	0

<b>Coalho produzido com 10g% coalho bovino</b>	300	15,2	0	0
--	-----	------	---	---

\*Resultado dado em unidade formadora de colônia (UFC/g ou ml)

Quadro 05 – Resultado das análises microbiológicas do coalho líquido industrial e dos coalhos líquido artesanais.

**Análise microbiológica do queijo produzido com o coalho líquido artesanal e industrial.**

A análise microbiológica dos queijos produzidos com o coalho líquido industrial e os coalhos líquidos artesanais mostra, no quadro 06 que houve contaminação de bactérias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes fecais para os meios de cultura específicos utilizados. Contudo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não estabelece limites para esses contaminantes para produtos de ação fermentativas, e mesmo para alimentos, a legislação observa que os níveis não devem ultrapassar  $10^6$  UFC/g, para as bactérias mesófilas e bolores e leveduras, já os coliformes fecais devem ser de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g. De acordo com a agência nacional vigilância sanitária (ANVISA).

O queijo produzido com o coalho líquido industrial apresentou com 163,6 e 25,4 UFC/g de leveduras e bolores respectivamente e  $1,3 \times 10^3$  UFC/g para bactérias globais e  $17 \times 10^3$  UFC/g para coliformes fecais.

Para o queijo produzido com 8 e 10g% de coalho artesanal apresentaram 0,4 e 22,6 e 22,8 e 0,6 UFC/g e para leveduras e bolores respectivamente, bactérias mesófilas  $3,0 \times 10^3$  e  $7,3 \times 10^3$  UFC/g e para coliformes fecais  $28 \times 10^3$  e  $9,0 \times 10^3$  UFC/g.

Garcia - Cruz et al. (1994) encontraram em queijo Minas Frescal contagens de  $5 \times 10^5$  para bactérias globais e para bolores e leveduras desde  $2,0 \times 10^4$  até  $6,0 \times 10^4$  UFC/g e para coliformes fecais contagens de  $4,3 \times 10^1$  até  $4,6 \times 10^2$  UFC/g.

Os níveis de microorganismos aceitáveis pela legislação para bolores e leveduras e para bactérias mesófilas em queijo é de  $10^6$  UFC/g, esses resultados deste trabalho encontram-se dentro das normas estabelecidas pela vigilância sanitária, já os resultados de coliformes fecais apresentaram em níveis acima do aceitável pela legislação que é de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g.

A contaminação apresentada neste trabalho para coliformes fecais não são provenientes dos coalhos, desde que os coalhos não apresentaram contaminações de coliformes fecais, essa contaminação é proveniente da matéria prima.

Meios de cultura/ alimentos	SBR		PCA	VRB
	Leveduras*	Bolores*	Bactérias Mesófilas*	Coliformes fecais*
<b>Queijo produzido com coalho industrial</b>	163,6	25,4	$1,3 \times 10^3$	$17 \times 10^3$
<b>Queijo produzido 8g% coalho bovino</b>	0,4	22,6	$3,0 \times 10^3$	$28 \times 10^3$
<b>Queijo produzido 10g% coalho bovino</b>	22,8	0,6	$7,3 \times 10^3$	$9,0 \times 10^3$

\* Resultado dado em unidade formadora de colônia (UFC/g ou ml)

Quadro 06 – Resultado das análises microbiológicas do queijo produzido com o coalho líquido industrial e dos queijos produzidos com os coalhos líquidos artesanais.

**CONCLUSÃO**

O coalho líquido artesanal apresentou padrões microbiológicos sanitários dentro das normas vigentes com referência a bolores e leveduras, bactérias mesófilas e coliformes fecais.

O queijo produzido com o coalho líquido artesanal apresentou padrões microbiológicos sanitários acima dos padrões exigidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para os

microorganismos analisados neste trabalho como os bolores e leveduras, bactérias mesófilas e os coliformes fecais sendo justificada a contaminação proveniente do leite para a produção do queijo.

Os resultados deste trabalho comprovou que os coalhos líquidos artesanais podem substituir os coalhos industriais, com suas características microbiológicas dentro dos padrões da vigilância sanitária.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barroso, T. **Agrishow Semi-Árido**: Embrapa discute melhoria da qualidade dos produtos derivados de leite no Nordeste (13/07/2006) Disponível em, <[http://www.embrapa.br/noticias/banco\\_de\\_noticias/folder.2006/foldernoticia.2006-07-03.1126368809/noticia.2006-07-13.5887887313/mostra\\_noticia](http://www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/folder.2006/foldernoticia.2006-07-03.1126368809/noticia.2006-07-13.5887887313/mostra_noticia)>, acesso em: 20 set de 2006.
- BASTOS, M. DO S.R.; NASSU, R.T.; BORGES, M. DE F.; SILVA, J.B. Inspeção em uma indústria produtora de queijo tipo coalho no estado do Ceará, visando à implantação das boas práticas de fabricação. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 57, p.130-136, 2001.
- BORGES, M. DE F.; BRANDÃO, S.C.C.; PINHEIRO, A.J.R. Sobrevivência de *Salmonella* em queijo Minas Padronizado durante a maturação. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 276-281, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Portaria Nº. 146, de 07/03/1996. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11/03/1996. p.3977-3978.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 02/01/2001. p.1-54.
- CENTRO TECNOLÓGICO - CTC. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. **Produção de queijos**. Disponível em, <[http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc\\_eng\\_bioq/trabalhos\\_grad2004/queijos/biotecnologia.htm](http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_grad2004/queijos/biotecnologia.htm)>, Acesso em 20 ago de 2006.
- CETEC, **SBRT Formulário de Resposta Técnica Padrão**. Disponível em, <<http://www.sbrt.ibict.br/upload/sbrt2328-3.html>>, Acesso em: 16 ago de 2006.
- EMBRAPA 2004. **Base de dados**. Disponível em <[http://www.sct.embrapa.br/radio/2004/abordagem/release\\_13.htm](http://www.sct.embrapa.br/radio/2004/abordagem/release_13.htm)>. Acesso em: 16 ago de 2006.
- FLORENTINO, E.S.; MARTINS, R.S. Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 59, p. 43-48, 1999.
- FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182p.
- FRANCO, B. D. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 2005. p27 - 171.
- FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO De MINAS GERAIS/CETEC: **Manual para fabricação de laticínios**. Belo Horizonte: CETEC, 1985. (Série de Publicações técnicas, 14).
- GARCIA-CRUZ, C.H.;HOFFMANN, F.L.;VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo minas frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto – SP. **Revista do instituto Adoufo Lutz**. V.54, n.2, p. 78-82, jun./dez. 19994.
- HAJDENWURCEL, J.R. **Atlas de microbiologia de alimentos**. São Paulo: Fonte de comunicação e editora, 1998. 66p.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos**: Técnica de análisis microbiológica. Zaragoza: Acríbia, 1984. 431p.
- LIMA, C. **Coagulantes**. Disponível em <<http://luizmeira.com/coalho.txt>>. Acesso em: 09 ago de 2006.
- MESQUITA FILHO, J. A. **Como fazer queijo de coalho**. 2. ed. Brasília.Coronário,1994. p. 14 – 26.
- MODI, R.; HIRVI, Y.; HILL, A.; GRIFFITHS, M.W. Effect of phage on survival of *Salmonella enteritidis* during manufacture and storage of cheddar cheese made

- from raw and pasteurized milk. **Journal Food Protection**, Ames, v.64, n. 7, p. 927-933, 2001.
- MUNCK, A.V. **Queijo de coalho** – Princípios básicos da fabricação.  
Disponível em,  
< <http://www.cienciadoleite.com.br/queijocoalho.htm>>,  
Acesso em: 04 ago de 2006.
- NASCIMENTO, D.; SABION, J.G. PIMENTA, N. XANDÓ, S.R. Avaliação microbiológica de queijo minas frescal da cidade de ouro Preto – MG. **Boletim da sociedade brasileira de ciências e tecnologia de alimentos**. v.19, n.2, p.120 – 129, abr./jun. 1985.
- NASSU, R.T; MOREIRA, C.G.; ROCHA, R.G. DE A.; FEITOSA, T.; BORGES, M. DE F.; MACEDO, A.A.M. Diagnóstico das condições de processamento e qualidade microbiológica de produtos regionais derivados do leite produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 55, p. 121-126, 2000.
- OLIVEIRA, J, S. **Queijos: Fundamentos tecnológicos**. 2. ed. São Paulo. Ícone. 1987. p. 229 - 272
- PAIVA, M.S.D.; CARDONHA, A. M. S. queijo de coalho artesanal e industrializado produzidos no Rio Grande do Norte: estudo comparativo da qualidade microbiológica. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 61, 1999, p.33.
- PERRY, K. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Quím. Nova v.27, n. 2 São Paulo Mar/Apr.2004.
- PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo minas: problema emergente de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 44, p. 22-27, 1996.
- RAVANIS, S.; LEWIS, M. J. Observations on the effect of raw milk quality on the keeping quality of pasteurized milk. **Letters in Applied Microbiology**, London, v.20, n.3, p.164-167, mar. 1995.
- RUDOLF, M.; SCHERER, S. HIGH. incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, p. 91-98, 2001.
- SÁ, V. F. **O leite e os seus produtos**. 2. ed. Lisboa: Clássica, 1962.83p.
- SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. A., Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – Ceará. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 13, n. 1, p. 31-361, 1995.
- SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.
- SOUSA, J. S. **Produção e avaliação do poder de coagulação do coalho líquido artesanal**. Mossoró, 2006. 36f. Monografia.Graduação, Universidade Federal Rural do Semi Árido (UFERSA), Mossoró, 2006.
- SOUZA, R.A. **Incidência de *L. monocytogenes* em queijo tipo coalho artesanal comercializado à temperatura ambiente em Fortaleza - CE**. Fortaleza, 2002. 78f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará (UFCE).
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 259p
- SIQUEIRA, R.S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, SPI; Rio de Janeiro: EMBRAPA, CTAA, 1995. 159p.