

Fátima Aparecida Carnicel

Qualidade Microbiológica de Ricota e Estudos  
de Resistência de Leveduras do Gênero  
*Debaryomyces* Isoladas deste Produto Lácteo



1910001298



FÁTIMA APARECIDA CARNICEL

**FÁTIMA APARECIDA CARNICEL**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE RICOTA E ESTUDOS  
DE RESISTÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO  
DEBARYOMYCES ISOLADAS DESTES PRODUTOS LÁCTEOS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE RICOTA E ESTUDOS  
DE RESISTÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO  
DEBARYOMYCES ISOLADAS DESTES PRODUTOS LÁCTEOS**

Desertação apresentada ao Instituto de Biociências,  
Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual  
Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José  
do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia e Ciência de Alimentos

1.1272/04

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann**

São José do Rio Preto, 2004



FÁTIMA APARECIDA CARNICEL

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE RICOTA E ESTUDOS  
DE RESISTÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO  
DEBARYOMYCES ISOLADAS DESTE PRODUTO LÁCTEO**



1.1298/04

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann**

São José do Rio Preto, 2004



46641576.8  
C265q

50901037

21/10/2004  
Doação  
R\$ 27,00  
Autor  
ND: 114/04 –  
Proc. 047/04

Carnicel, Fátima Aparecida.

Qualidade microbiológica de ricota e estudos de resistência de leveduras do gênero *Debaryomyces* isoladas deste produto lácteo / Fátima Aparecida  
Carnicel - São José do Rio Preto : [s.n.], 2004

131 f. ; 30 cm.

Orientador: Fernando Leite Hoffmann

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Alimentos - Microbiologia. 2. Queijo - Microbiologia. 3. Levedos. 4. Alimentos conservadores. 5. Leveduras - Tratamento térmico. 6. Ricota. 7. *Debaryomyces*. I. Hoffmann, Fernando Leite. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 579.67



FÁTIMA APARECIDA CARNICEL

DADOS CURRICULARES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE RICOTA E ESTUDOS  
DE RESISTÊNCIA DE LEVEDURAS DO GÊNERO  
DEBARYOMYCES ISOLADAS DESTE PRODUTO LÁCTEO**

NASCIMENTO: 25.11.1967 - São José do Rio Preto/SP

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann

2º Examinador: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

São José do Rio Preto, 18 de junho de 2004

## **DADOS CURRICULARES**

**FÁTIMA APARECIDA CARNICEL**

**NASCIMENTO:** 25. 11. 1957 - São José do Rio Preto/SP

**FILIAÇÃO:** Batista Carnicel Martinez

Latif Atallah Carnicel

1979/1982: Curso de Graduação em Nutrição, na Pontifícia Universidade Católica de  
Campinas/SP

2000/2001: Especialização em Nutrição Clínica no Centro Universitário de Rio Preto -  
UNIRP

2002/2004: Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos,  
nível de mestrado no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas -  
Universidade Estadual Paulista (UNESP) - São José do Rio Preto - SP



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos,  
Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto de  
Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE),  
Universidade Estadual Paulista (UNESP).

### Dedico este estudo

À minha querida mãe, que com  
paciência e carinho incentivou e transformou minha  
educação em uma busca pelo conhecimento da minha  
pessoa. O verdadeiro amor é aquele que constrói e faz  
crescer. Deixo aqui meu reconhecimento e admiração.

À minha filha Mariana que sabe compreender todas as  
minhas horas de estudo e mesmo assim enriquece o "nosso lar".

"É o mestre do fazer e do deixar acontecer como resposta  
sempre extrema de todo enredo do crescer. Tem a palavra  
chave de que cada pessoa precisa, no momento chave  
preciso de cada pessoa"

Silvia Risette

### **Dedico este estudo**

Ao meu querido marido, que com paciência e carinho incentivou e transformou minha ausência em apoio para o engrandecimento da minha pessoa. O verdadeiro amor é aquele que constrói e faz crescer. Deixo aqui meu reconhecimento e admiração.

À minha filha Patrícia que soube compreender todas as minhas horas de ausência e mesmo assim enriquece o "nosso lar".

Ao meu irmão Amário e a minha cunhada Zorilda,

Aos meus afilhados Gustavo e Larissa,

Pelo exemplo de amor e pelo incentivo de carinho para a realização deste trabalho.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela sua brilhante orientação, confiança, incentivo e apoio durante esses anos que tive o grande privilégio de trabalhar sob sua orientação e também por ter me proporcionado um crescimento profissional e acadêmico.

**Aos meus pais, Batista e Latif pelo amor, dedicação e pelos esforços não medidos para minha realização profissional, por estarem ao meu lado em todos os momentos, principalmente os mais difíceis. Demonstrando sempre o que antes parecia impossível torna-se possível quando alguém se sente apto a transformar todos os obstáculos, conhecendo a verdadeira grandeza interior. Vocês são a minha alegria.**

**Ao meu irmão Amarildo e a minha cunhada Zoraide.**

**Aos meus afilhados Gustavo e Larissa.**

**Pelo exemplo de amor e pelo incentivo de carinho para a realização deste trabalho.**



## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Leite Hoffmann, pela sua brilhante orientação, confiança, incentivo e apoio durante esses anos que tive o grande privilégio de trabalhar sob sua orientação e também por ter me proporcionado um crescimento profissional e acadêmico.

Aos Professores Doutores Ana Lúcia Barretto Penna, Crispin Humberto Garcia Cruz, Elisa Yoko Hirooka e Iracema de Oliveira Moraes, membros da banca examinadora, pelas valiosas sugestões e comentários que contribuíram para o enriquecimento deste estudo.

À Coordenação e aos professores do Curso de Pós Graduação, pela disposição e as trocas de informações e conhecimentos.

À Rosemar Rosa de Carvalho Brena pela contribuição e esclarecimentos nos auxílios prestados na Seção de Pós Graduação.

Às bibliotecárias principalmente a Gislaíne, Elaine e Elsa pelo carinho e amizade e principalmente a dedicação ao levantamento bibliográfico e as correções das referências.

À Tânia Maria Vinturim Gonçalves, auxiliar acadêmico do Laboratório de Microbiologia de Alimentos desta unidade, pelo carinho, disposição e paciência em auxiliar nos ensinamentos transmitidos durante o Mestrado.

A todos os colegas do curso de Pós Graduação, pelo apoio e amizade que se solidificaram durante o curso, especialmente à Juliana, Vânia, Ulisses, Maria Luiza e Viviane.

À Jacqueline Tanury Macruz Peresi, grande amiga, que é uma pessoa predestinada ao especial ! Uma estrela que viaja a todo instante pelo universo de todas as pessoas que toca.

À Maria José Balade Saad, grande amiga, que preenche os espaços do ambiente em que se encontra com a magia de sua energia e a plena convicção de que viver é beber da comunhão do amor que cada ser humano carrega.

À Julie, por ter reinado em nosso lar, demonstrando que a alegria é o combustível em cada novo alvorecer.

À vocês a minha eterna gratidão.

## SUMÁRIO

|                                                                  | Página |
|------------------------------------------------------------------|--------|
| ÍNDICE DE TABELAS.....                                           | xiv    |
| RESUMO.....                                                      | xv     |
| ABSTRACT.....                                                    | xvii   |
| 1 - INTRODUÇÃO.....                                              | 1      |
| 2 - OBJETIVOS.....                                               | 7      |
| 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....                                   | 8      |
| 3.1 - Produtos lácteos: soro de leite / leite / queijos.....     | 8      |
| 3.2 - Ricota.....                                                | 14     |
| 3.3 - Contaminação microbiana em leite e derivados.....          | 21     |
| 3.4 - Principais patógenos microbianos em leite e derivados..... | 28     |
| 3.4.1 - <i>Staphylococcus aureus</i> .....                       | 28     |
| 3.4.2 - Coliformes fecais - <i>Escherichia coli</i> .....        | 32     |
| 3.4.3 - <i>Listeria monocytogenes</i> .....                      | 35     |
| 3.4.4 - <i>Salmonella</i> spp.....                               | 39     |
| 3.5 - Bolores e leveduras .....                                  | 41     |
| 3.6 - Conservantes.....                                          | 50     |
| 4 - MATERIAL E MÉTODOS.....                                      | 59     |
| 4.1 - Obtenção das amostras.....                                 | 59     |
| 4.2 - Preparo das amostras.....                                  | 59     |
| 4.3 - Contagem de bactérias aeróbias mesófilas.....              | 60     |
| 4.4 - Enumeração de bolores e leveduras.....                     | 60     |





|                                                                               |            |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.15 - Técnica de "replica-plate".....                                        | 69         |
| <b>5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                                        | <b>71</b>  |
| 5.1 - Análises microbiológicas.....                                           | 71         |
| 5.2 - Isolamento das leveduras.....                                           | 79         |
| 5.3 - Resistência aos principais conservantes permitidos<br>em alimentos..... | 86         |
| 5.3.1 - Benzoato de sódio (INS - 211).....                                    | 86         |
| 5.3.2 - Propionato de sódio (INS - 281).....                                  | 89         |
| 5.3.3 - Sorbato de potássio (INS - 202).....                                  | 91         |
| 5.3.4 - Natamicina (INS - 235).....                                           | 94         |
| 5.4 - Sensibilidade ao tratamento térmico (63°C/30 min.).....                 | 96         |
| <b>6 - CONCLUSÕES.....</b>                                                    | <b>99</b>  |
| <b>7 - REFERÊNCIAS.....</b>                                                   | <b>100</b> |



**ÍNDICE DE TABELAS**

|                                                                                                                    | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Tabela 1. Qualidade microbiológica das amostras de ricota de diferentes marcas comerciais.....                     | 77     |
| Tabela 2. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.....      | 82     |
| Tabela 3. Frequência relativa do gênero de leveduras isoladas.....                                                 | 84     |
| Tabela 4. Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.....                    | 88     |
| Tabela 5. Leveduras sensíveis ao propionato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.....                  | 90     |
| Tabela 6. Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas.....                  | 93     |
| Tabela 7. Leveduras sensíveis a natamicina nas diferentes concentrações empregadas.....                            | 95     |
| Tabela 8. Frequência relativa do gênero de leveduras resistentes ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos..... | 97     |





## RESUMO

A ricota possui um alto teor de umidade e também é rica em proteínas do soro - lactoalbumina e lactoglobulina. Vinte e seis amostras de ricotas de diferentes marcas comerciais foram adquiridas no comércio varejista da cidade de São José do Rio Preto - SP e região. Estas foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias aeróbias mesófilas, enumeração de bolores e leveduras, contagem de *Staphylococcus aureus*, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e fecais (termotolerantes), pesquisa de *Escherichia coli*, de *Salmonella* spp. e também de *Listeria monocytogenes*. Dos resultados obtidos, observou-se que das 26 amostras, 23 (88,46%) foram classificadas como "produtos em condições sanitárias insatisfatórias" e, portanto, "produtos impróprios para o consumo humano", por apresentarem *Staphylococcus aureus* acima do padrão estabelecido pela legislação vigente. Destas amostras, foram ainda isoladas 82 leveduras (100,00%), que foram submetidas às provas taxonômicas, morfológicas, fisiológicas e de assimilação de várias fontes de carbono. Nas provas taxonômicas, verificou-se que esses microrganismos pertenciam ao gênero *Debaryomyces*, com duas espécies distintas: *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (97,56%) e *Debaryomyces vanrijae* var. *vanrija* (2,44%). Foi verificada também a resistência dessas leveduras em relação aos principais conservantes alimentícios contidos na legislação brasileira, como benzoato de sódio (INS - 211) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, propionato de sódio (INS - 281) nas de 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6%, sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4% e natamicina (INS - 235) nas de 0,002; 0,004 e 0,008%. Nas concentrações de 0,1 e 0,4% de conservante, o benzoato de sódio foi o mais eficaz. Na concentração de 0,2%, o mais eficaz foi o sorbato de potássio, sendo

ineficaz o propionato de sódio em qualquer concentração empregada. O emprego da natamicina permitiu o desenvolvimento de 38 leveduras (46,91%), quando empregada no dobro da concentração efetiva (0,008%) encontrada na literatura. Foi analisada ainda a sensibilidade das mesmas frente ao tratamento térmico de 63°C/30 minutos, daí verificando-se que, das 82 leveduras isoladas, 75 (91,46%) foram resistentes, sendo 73 (97,33%) representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. Recomenda-se, portanto como fundamental, tendo em vista os resultados obtidos, o contínuo monitoramento das diferentes etapas envolvidas no processo de elaboração desses produtos, para garantir a idoneidade à vida útil dos mesmos, bem como para minimizar os danos à saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** qualidade microbiológica; leveduras; conservantes alimentares; resistência ao tratamento térmico.





## ABSTRACT

Ricotta cheese has a high level of humidity, and is rich in whey proteins - lactoalbumine and lactoglobuline. Twenty-six samples of different brands of ricotta were acquired at open market of São José do Rio Preto, SP, and outskirts. They were submitted to the following microbiological analyses: aerobic mesophilic bacteria count, enumeration of moulds and yeasts, *Staphylococcus aureus* count, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and fecal coliforms (thermotolerants), analysis for the presence of *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, and *Listeria monocytogenes* as well. The results pointed out that 23 (88.46%) out of 26 were classified as "products in unsatisfactory sanitary conditions", therefore "inappropriate for human consumption", for bringing *Staphylococcus aureus* beyond the pattern established by the current legislation. Eighty-two (82) yeasts were isolated from the samples (100.00%), which were submitted to taxonomic, morphological and physiological tests, and to carbon source assimilation tests, as well. According to the taxonomic tests, those microorganisms belonged to genus *Debaryomyces*, with two different species: *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (97.56%), and *Debaryomyces vanriijae* var. *vanriijia* (2.44%). Resistance to these yeasts were also reported in relation to the main preservatives present in Brazilian legislation, such as sodium benzoate (INS - 211) at concentrations of 0.1; 0.2 and 0.4%, sodium propionate (INS - 281) at 0.1; 0.15; 0.2; 0.3; 0.4 and 0.6%, potassium sorbate (INS - 202) at 0.05; 0.1; 0.2 and 0.4%; and natamycin (INS - 235) at 0.002; 0.004 and 0.008%. At



the concentrations of 0.1 and 0.4%, the sodium benzoate was the most effective; at the concentration 0.2%, the most effective was the potassium sorbate. Sodium propionate was ineffective at any concentration. The use of natamycin allowed the development of 38 yeasts (46.91%), when used in the double of the effective concentration (0.008%) found in literature. Their sensitivity to thermal treatment of 63°C/30 minutes was analyzed, reporting that 75 (91.46%) out of 82 isolated yeasts were resistant to treatment. Of these 73 (97,33%) are represented by *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*. So, based on the results, the current monitoring of the different phases involved in the manufacturing process of these products is fundamental, in order to guarantee the capacity and their useful life as well as to minimize the damages to the consumer's health.

**Key-words:** microbiological quality, yeasts, food preservatives, thermal treatment resistance.



## 1 - INTRODUÇÃO

A ricota é um produto alimentício relativamente popular e de grande consumo. Apresenta elevado teor de nutrientes, principalmente água, lactose e sais minerais. Essa é uma das condições que geralmente facilita a sobrevivência ou a multiplicação dos microrganismos, que podem estar presentes no produto, originários da matéria prima, ou ainda, serem acrescentados ao mesmo no processamento, pelo não emprego das Boas Práticas de Fabricação (BPF), podendo vir posteriormente a deteriorá-lo, ou também, ocasionar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA).

O desenvolvimento microbiano depende de vários fatores, dentre eles aqueles inerentes ao alimento (atividade de água, pH, potencial de óxido-redução, composição em nutrientes, estruturas biológicas, etc) e os inerentes ao meio que o cerca (temperatura, umidade relativa, presença de gases, etc).

Por tais motivos, este trabalho é importante no que se refere a verificar a qualidade microbiológica do produto, com relação aos principais microrganismos patógenos e deteriorantes; identificar as leveduras encontradas no mesmo, que poderão alterar até as características sensoriais do alimento e verificar a sensibilidade dessas leveduras aos conservantes permitidos em alimentos e ao tratamento térmico, com a finalidade de, além de mencionar as recomendações básicas, como o treinamento de manipuladores, visando melhorar as condições higiênico-sanitárias do alimento, propor o emprego dos





conservadores e do tratamento térmico, como mais uma das barreiras propostas para controlar o desenvolvimento de microrganismos, aumentando a vida útil do produto e fornecendo ao consumidor um alimento inócuo. (ANNEVO, 1974).

A ricota é um produto originário da Itália, produzido através da precipitação das proteínas do soro, por meio de calor, associado à acidificação, sendo utilizado como matéria-prima o soro de queijo, leite fresco pasteurizado ou acidificado, ou ainda, a mistura destes (FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS, 1985; MODLER; EMMONS, 1989).

É denominada também “queijo de albumina”, por constituir-se basicamente desta proteína e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro e não coaguláveis por coalho (FURTADO; LOURENÇO NETO, 1994).

A ricota é constituída de lactoalbumina do soro que, a uma temperatura de 72°C, separa-se, coagulando em flocos que vêm sucessivamente prensados, expurgando-se o soro (BERTO; HOFFER, 1999).

O soro é um subproduto da indústria de leite, resultante da fabricação de queijos, que se separa do coágulo durante a fabricação, retendo 55% dos nutrientes iniciais. Cada litro de leite dá origem a 0,6 a 0,9 L de soro (ZALL, 1979; PONSANO; PINTO; CASTRO-GÓMEZ, 1992).

O soro, líquido residual da fabricação de queijos, é uma fonte protéica de elevado nível nutricional, apresentando taxa de eficiência protéica (PER) de 3,0-3,2, sendo superior ao da caseína, que é 2,5 (SCHINGOETHE, 1976).



A vida útil do soro como produto inalterado é extremamente curta, devido ao seu alto valor nutritivo (VIEIRA et al., 1985) e suas condições de umidade (MADRID, 1979), temperatura e pH (AMIEVA, 1974).

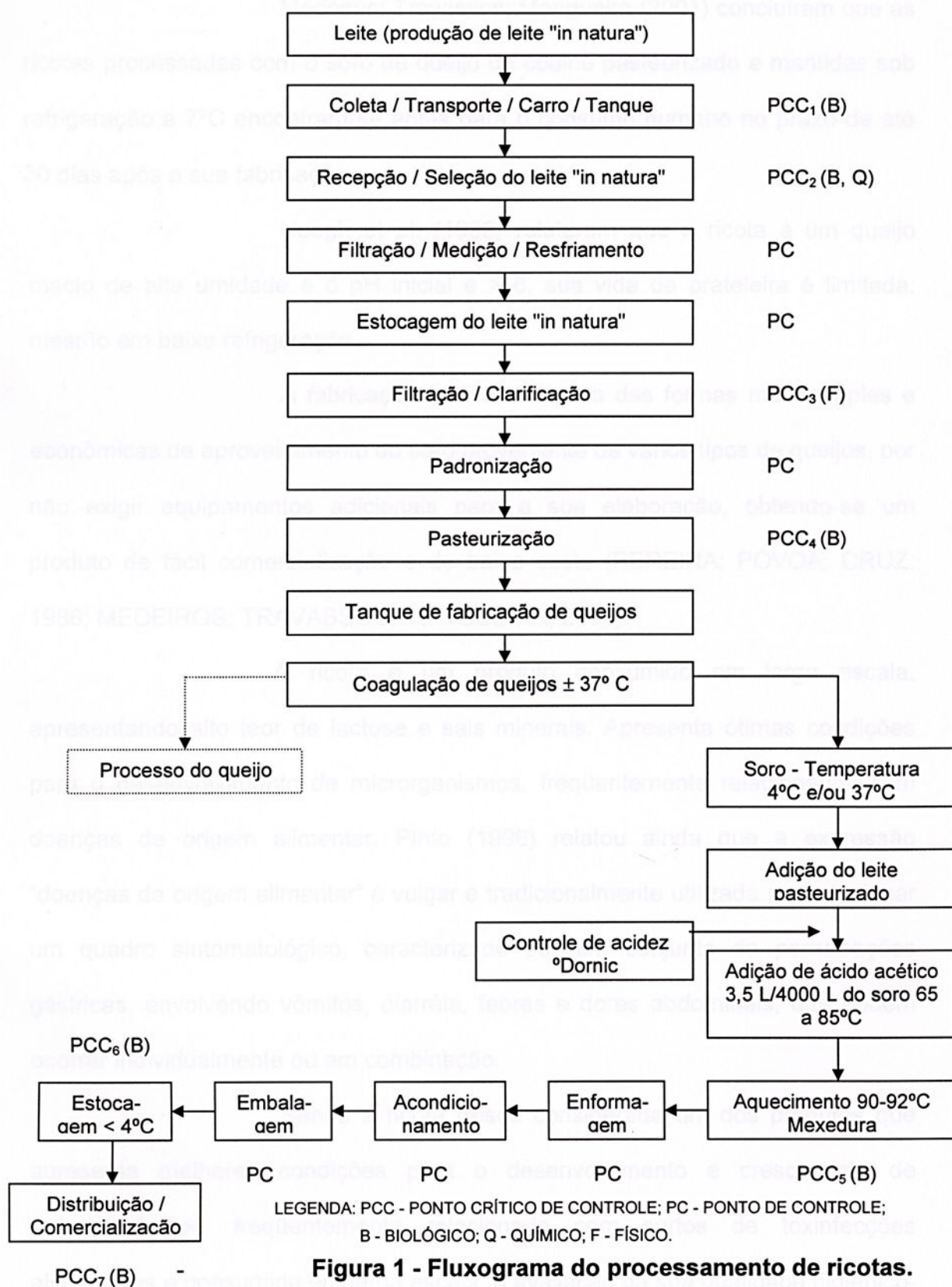
A tecnologia de fabricação de ricota é constituída das seguintes etapas: recepção do leite, filtração, pasteurização (63-65°C/30 min.), coagulação e obtenção da coalhada, separação do soro, aquecimento do soro (65°C), adição do leite (20% - ricota consistente ou 5% - ricota pastosa), acréscimo do ácido acético (67 mL/10 L de soro), aquecimento (90°C), enformagem, repouso e acondicionamento (7°C), segundo a Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, 1985.

Na Figura 1 encontra-se o fluxograma do processamento de ricotas (Fonte: Fábrica de Laticínios - Laticínios Tirolez Ltda. - Monte Aprazível - SP).

As principais características da ricota são um elevado conteúdo de água (cerca de 70%), textura delicada, sabor suave, levemente ácido e adocicado, rico em proteínas do soro - lactalbumina e lactoglobulina (MEDEIROS; TRAVASSOS; MANGUEIRA, 2001).

A ricota fresca, por apresentar um teor de umidade de 70 a 73%, fácil de deitar durante o seu transporte e demonstrar acondicionamento difícil, devido à necessidade de boas condições higiênicas, pode ter problemas em relação à sua preservação, recomendando-se assim consumi-la na região produtora (PANETTA, 1975).

Figura 1 - Fluxograma do processamento de ricotas.





Medeiros; Travassos; Manguiera (2001) concluíram que as ricotas processadas com o soro de queijo de coalho pasteurizado e mantidas sob refrigeração a 7°C encontram-se aptas para o consumo humano no prazo de até 30 dias após a sua fabricação.

Hough et al. (1999) relataram que a ricota é um queijo macio de alta umidade e o pH inicial é  $> 6$ , sua vida de prateleira é limitada, mesmo em baixa refrigeração.

A fabricação de ricota é uma das formas mais simples e econômicas de aproveitamento do soro proveniente de vários tipos de queijos, por não exigir equipamentos adicionais para a sua elaboração, obtendo-se um produto de fácil comercialização e de baixo custo (PEREIRA; PÓVOA; CRUZ, 1988; MEDEIROS; TRAVASSOS; MANGUEIRA, 2001).

A ricota é um produto consumido em larga escala, apresentando alto teor de lactose e sais minerais. Apresenta ótimas condições para o desenvolvimento de microrganismos, freqüentemente relacionados com doenças de origem alimentar. Pinto (1996) relatou ainda que a expressão “doenças de origem alimentar” é vulgar e tradicionalmente utilizada para designar um quadro sintomatológico, caracterizado por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo vômitos, diarreia, febres e dores abdominais, que podem ocorrer individualmente ou em combinação.

Sendo a ricota fresca considerada um dos produtos que apresenta melhores condições para o desenvolvimento e crescimento de microrganismos, freqüentemente relacionada com surtos de toxinfecções alimentares e consumida em larga escala, a avaliação da sua qualidade higiênico-



sanitária torna-se muito importante. Soma-se a estes aspectos o fato de que os microrganismos contaminantes também apresentam ações deletérias sobre os queijos, alterando suas características sensoriais (RANGEL; ORNELAS; SILVA, 2002).

2.1 - Realizar, previamente, as análises microbiológicas prescritas na legislação brasileira, assim como a contagem de colônias e leveduras, em diferentes amostras de queijos;

2.2 - Identificar as diversas leveduras isoladas das amostras de alimentos através dos resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de outras características;

2.3 - Verificar a resistência dessas leveduras em relação aos principais conservantes permitidos em alimentos, como o benzoato de sódio (INS - 211), nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%; propionato de sódio (INS - 281), nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%; sorbato de potássio (INS - 202), nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%; e reguladores de acidez (INS - 235), nas concentrações de 0,002; 0,004 e 0,008%;

2.4 - Analisar também a sensibilidade das mesmas frente ao tratamento térmico a 63°C por 30 minutos;

## 2 - OBJETIVOS

2.1 - Realizar, previamente, as análises microbiológicas prescritas na legislação brasileira, assim como a contagem de bolores e leveduras, em diferentes amostras de ricotas;

2.2 - Identificar as diversas leveduras isoladas deste tipo de alimento através dos resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras;

2.3 - Verificar a resistência dessas leveduras em relação aos principais conservantes permitidos em alimentos, como o benzoato de sódio (código INS - 211), nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%; propionato de sódio (INS - 281), nas de 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6%; sorbato de potássio (INS - 202), nas de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4% e natamicina (INS - 235), nas de 0,002; 0,004 e 0,008%; e

2.4 - Analisar também a sensibilidade das mesmas frente ao tratamento térmico a 63°C por 30 minutos.



### 3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 - Produtos lácteos: soro de leite / leite / queijos

O soro é um subproduto da indústria de leite, resultante da fabricação de queijos, que se separa do coágulo durante a fabricação, retendo 55% dos nutrientes iniciais. Cada litro de leite dá origem a 0,6 a 0,9 L de soro (ZALL, 1979; PONSANO; PINTO; CASTRO - GÓMEZ, 1992).

O soro é um líquido claro de cor amarelada, representando entre 80 e 95% do volume total do leite utilizado na produção de queijo, estando seus componentes distribuídos da seguinte forma: água 93-94%, lactose 4,5-5%, proteínas solúveis 0,6-0,8% e sais minerais 0,6-1,0%. O soro de leite contém ainda quantidades consideráveis de outras substâncias, como o ácido láctico, cítrico, compostos nitrogenados não protéicos e vitaminas do grupo B (VEISSEYRE, 1988). A lactose e as proteínas solúveis são os componentes mais importantes do ponto de vista nutricional, tecnológico e ambiental. As proteínas possuem alto valor nutricional e a lactose é fonte de material energético para os diversos processos biotecnológicos, assim como um componente utilizado na indústria farmacêutica e alimentícia (COSTA, 1995; GONZÁLEZ SISO, 1996; FERREIRA, 1997).

O aproveitamento do soro tem como um dos principais empecilhos o fato de ser visto como rejeito, recebendo assim tratamento



inadequado, o que facilita a contaminação e o crescimento microbiano (PONSANO; PINTO; CASTRO-GÓMEZ, 1992).

No Brasil, a sua disponibilidade tem aumentado significativamente. Entretanto, o seu aproveitamento está aquém do desejável. Da produção de 1,78 milhões de toneladas em 1986, somente 278,20 mil toneladas foram utilizadas para fins alimentícios, visando principalmente a produção de soro em pó, para consumo humano e animal. Portanto, 1,68 milhão de toneladas deixou de ser aproveitado, sendo descartado e causando sérios problemas de poluição ambiental, por ser um resíduo com alta concentração de matéria orgânica, representada principalmente por lactose e proteína. Estes impõem um alto valor de demanda bioquímica de oxigênio às plantas de tratamento de águas residuais, variando de 30.000 a 60.000 mg/L (ZALL, 1979; BRANDÃO, 1994).

Em 1999, no Brasil, foram produzidas 350.000 toneladas de queijo, gerando 3,5 milhões de toneladas de soro (RÉVILLION; BRANDELLI; AYUB, 2000).

Dentre as técnicas para sua valorização enquanto produto alimentício, o soro de leite pode ser utilizado desde a fabricação de ricota e bebida láctea, até ser concentrado e transformado em pó, na obtenção de seus componentes; sendo que cada alternativa deve ser precedida de uma análise técnica e econômica (RICHARDS, 1997; MACHADO; FREIRE; SILVA, 2001; PRIMO, 2001).

No Estado do Paraná, no ano de 1999, do soro de leite gerado no conjunto das indústrias de laticínios, 4,8% foi utilizado na produção de bebida láctea e 19,6%, na de soro de leite em pó, o correspondente a uma



utilização de apenas 24,4% do total, tendo ainda em volume uma quantidade de 198,4 milhões de litros que pode ser aproveitada enquanto componente alimentício (GIROTO, 2001).

A elaboração de queijos constitui uma das mais importantes atividades das indústrias de laticínios, sobretudo no Brasil, onde os tipos de maior consumo compreendem o queijo "Minas Frescal" e a mussarela (BEHMER, 1984; FELÍCIO FILHO, 1984). Estes representam cerca de 40% do montante comercializado no país, cuja produção se concentra, principalmente, em indústrias de pequeno e médio porte das regiões Sul e Sudeste (FELÍCIO FILHO, 1984).

Desde o RIISPOA (1952) existe a determinação para o uso de leite pasteurizado na elaboração do queijos frescos, mas a sua comercialização, a partir de leite não pasteurizado, é muito comum em nosso meio, tornando necessária uma maior fiscalização na seleção da matéria-prima, etapas de processamento e na sua comercialização.

Os queijos em geral devem ser obtidos a partir do leite pasteurizado, integral ou padronizado, coagulados por meio de enzimas do coalho, podendo ser acrescidos de fermento lácteo, sal e outras substâncias permitidas (BRASIL, 1980).

Peresi et al. (2001) avaliaram no período de abril de 1998 a setembro de 1999, as condições higiênico-sanitárias de 30 amostras de queijo "Minas Frescal" artesanal, comercializadas em 10 feiras livres de São José do Rio Preto - SP e 30 industriais, coletadas em supermercados. A análise microbiológica foi realizada segundo a metodologia recomendada pela American



Public Health Association - APHA. Os resultados microbiológicos revelaram 7 (23,3%) amostras industriais e 23 (76,7%) artesanais em desacordo com os padrões previstos na legislação vigente, principalmente pela presença de coliformes fecais e/ou estafilococos coagulase positiva em níveis elevados. Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas, enquanto que *Salmonella* foi detectada em 2 (6,7%) artesanais. Peresi et al. (2001) concluíram que o monitoramento praticado no processo de fabricação, transporte e comercialização do queijo tipo "Minas Frescal" industrial, com intuito de atender às exigências dos órgãos fiscalizadores, reflete na melhor condição higiênico-sanitária do produto.

Cardoso; Araújo (2003) realizaram um estudo retrospectivo sobre a qualidade de queijos comercializados de 1997 a 2001 no Distrito Federal. Os dados analíticos foram obtidos de 189 laudos de amostras coletadas pelo Programa de Vigilância Sanitária. Destas amostras analisadas, 109 foram aprovadas (57,70%) e 80 (42,30%) apresentaram irregularidades quanto aos parâmetros analisados. Do total, 49 amostras eram clandestinas e 140 apresentaram o selo do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Com relação aos parâmetros microbiológicos, 26,5% das analisadas foram condenadas pela presença de coliformes totais, fecais e *Staphylococcus aureus* acima dos padrões legais. Relataram também que das 189 amostras avaliadas, 49 (25,90%) não continham rótulos.

Sá Barretto; Pereira (1999) coletaram 22 amostras de diferentes marcas comerciais de queijo "Minas Frescal", no período de abril a outubro de 1998, no município do Rio de Janeiro - RJ, e destas, 19 (86,36%), se





mostraram em desacordo com a legislação em vigor, apresentando contaminação por coliformes fecais (100,00%) e, destas, 6 apresentaram também *Staphylococcus aureus* (31,57%). Apenas 3 (13,63%) apresentaram padrões microbiológicos de acordo com a legislação.

Korber (1971) relatou que a ocorrência de mofos em queijos é uma constante fonte de aborrecimento, pois provocam alterações físicas no produto, levando a uma série de prejuízos, como a perda da mercadoria.

Florentino; Martins (1999) citaram que a presença de bolores e leveduras no queijo pode ser atribuída à má qualidade do produto e à forma irregular de armazenamento, ou seja, a refrigeração intercalada por longos períodos em que o produto fica exposto à temperatura ambiente.

O leite e seus derivados são produtos que, na distribuição e comercialização no varejo, estão sujeitos a sérias alterações. Por isso, devem ser cuidadosamente observadas as temperaturas e a carga das gôndolas de supermercados, assim como as sobrecargas e a temperatura ambiente, devendo também esta última ser motivo de preocupação, uma vez que o ar condicionado do ambiente também pode prejudicar o produto. O controle deve ser rigoroso, pois alguns graus a mais de temperatura ambiente levam a um comprometimento da vida de prateleira dos derivados (MACÊDO et al., 2000).

Tavares et al. (2003) analisaram a temperatura interna dos queijos "Minas Frescal" e das gôndolas no mercado varejista do município de Niterói - RJ. Estudaram também a correlação entre as temperaturas em 20 mercados diferentes, sendo 10 deles localizados em bairros considerados de alto poder aquisitivo e 10 de baixo, entre 7h30min. e 9h30min. Em cada



estabelecimento, realizaram a medição da temperatura interna de um queijo e da gôndola com termômetro digital com precisão de  $0,1^{\circ}\text{C}$ . Os resultados obtidos nos 10 mercados de maior poder aquisitivo foram para a temperatura da gôndola  $7,27^{\circ}\text{C}$  e do queijo  $8,95^{\circ}\text{C}$  enquanto que nos 10 mercados de baixo foram para a temperatura da gôndola  $10,57^{\circ}\text{C}$  e do queijo  $10,85^{\circ}\text{C}$ . Os autores observaram que a temperatura interna média encontrada nos queijos "Minas Frescal" no mercado varejista de Niterói - RJ não atendeu às normas regulamentares de  $< 8^{\circ}\text{C}$ , e concluíram que os estabelecimentos devem melhorar seu padrão de qualidade, no que diz respeito ao controle da temperatura e que os órgãos de fiscalização sanitária devem ser mais rígidos, ao exigirem o cumprimento da lei para proteger a saúde do consumidor.

Garrido et al. (2001) reafirmaram que o leite é considerado um alimento quase completo para a raça humana, por conter alto teor de nutrientes, sendo amplamente comercializado e consumido pela população, especialmente crianças e idosos.

Cruz; Gomes (2001) relataram que nem todos os componentes do leite estão presentes no queijo, pois a caseína, ao aglutinar-se, separa a fase sólida da água, resultando em um concentrado protéico gorduroso. As globulinas, as albuminas, a lactose e algumas vitaminas e sais permanecem na fase líquida, formando, junto com a água, o soro.

Segundo Froeder; Pinheiro; Brandão (1985); Oliveira (1976) a qualidade microbiológica do leite pode ser comprometida devido às condições de higiene durante a ordenha, de limpeza de utensílios e



equipamentos, antes e após a pasteurização, e até mesmo das condições climáticas da região, dentre outros fatores. O leite também oferece condições excelentes para a multiplicação de microrganismos em curto espaço de tempo.

Garrido et al. (2001) analisaram, no período de 1995 a 1998, 390 amostras de leite (123 de leite tipo C, 86 de B e 181 de leite tipo integral), provenientes de 16 mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP, sob a fiscalização do Serviço de Inspeção de São Paulo (SISP) ou Serviço de Inspeção Municipal (SIM). Quanto à qualidade microbiológica, pode-se observar que a porcentagem de amostras em desacordo com a legislação foi similar para os três tipos de leite provenientes de mini e micro-usinas da região de Ribeirão Preto/SP, ou seja, 32,5%, 32,6% e 31,0%, para o leite tipo C, B e integral, respectivamente.

### 3.2 - Ricota

Panetta (1975) citou que o soro proveniente da fabricação de queijos de massa crua (minas) e de filada (mussarela e provolone) produz ricotas de qualidade superior em relação aos de semicozida (prato e reino) ou cozida (parmesão e sardo), pelo fato do soro dos queijos semicozidos e cozidos ser bem mais ácido, o que acarreta à ricota as características negativas de flacidez, inconsistência e fragmentação.

Cruz; Gomes (2001) citaram que a ricota é um queijo obtido da concentração da albumina provocada pelo calor e por ácidos, tendo como matéria prima o soro e não o leite.



Segundo Modler; Emmons (1989) nos países da América Latina, esse produto também é conhecido como queijo "blanco".

A ricota possui textura suave, sabor levemente ácido e as análises microbiológicas sugerem curto período de vida útil (ROBINSON, 1995). Tronco (1996) referiu-se a esse alimento como um produto fresco de alto valor nutritivo e de elevada digestibilidade.

Souza et al. (2002) revelaram que não existe legislação específica para os queijos cottage e ricota. Baseando-se nos valores sugeridos na literatura, os queijos cottage e ricota são classificados como queijos magros (10-24,9% de gordura no extrato seco total) e muito alta umidade (> 55% de umidade).

Trinta amostras de ricotas de 5 marcas diferentes foram avaliadas em relação à umidade, das quais 1 (3,33%) poderia ser classificada como queijo de média umidade, 1 (3,33%) como de alta umidade e 28 (93,34%) de muito alta umidade (SOUZA et al., 2000).

Sakate; Santos; Brandão (1998) analisaram 20 amostras de ricota de diferentes marcas, coletadas no Mercado Central de Belo Horizonte - MG em dezembro de 1997 e janeiro de 1998. Das analisadas, 85% estavam com níveis superiores a 1100 NMP/g de coliformes totais; 25% com fecais acima do limite máximo permitido pela legislação; 85% com contagens superiores a  $1,0 \times 10^7$  UFC/g de psicrotróficos e 85% apresentaram-se com contagens de fungos e leveduras acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g. Portanto, a maioria das amostras apresentava-se em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, sendo



potenciais fontes de toxinfecções alimentares, além da redução dos níveis de qualidade e do prazo de validade.

Travassos; Medeiros; Manguiera (2001) verificaram, por meio da análise microbiológica, o comportamento de alguns microrganismos nas ricotas de leite de cabra, conservadas em temperatura de refrigeração de aproximadamente 7°C, com 24 horas, 15 e 30 dias após o processamento. Três ricotas foram elaboradas com soro de queijo de coalho de leite de cabra pasteurizado. Todos os resultados obtidos nas análises de *Salmonella sp* e *S. aureus* foram negativos nas três ricotas. A ricota consistente analisada nos três tempos (24 horas, 15 e 30 dias) apresentou 16,66% das amostras com níveis elevados de coliformes totais. Na análise de coliformes fecais, 100% das amostras das três ricotas analisadas com 24 horas, 15 e 30 dias apresentou com níveis abaixo do recomendado pelo Ministério da Saúde. Estes resultados devem-se à pasteurização realizada no leite de cabra antes do processo de elaboração das ricotas, assim como às condições higiênicas observadas durante o processamento dos produtos. De acordo com os resultados, pode-se concluir que as ricotas encontravam-se aptas para o consumo humano no prazo de até 30 dias.

Rangel; Ornelas; Silva (2002) avaliaram 60 amostras de queijos ricota quanto às características microbiológicas. Em desacordo com os padrões legais vigentes, estavam 27 (45,00%) das amostras, sendo todas com valores de Número Mais Provável de coliformes a 45°C superiores aos previstos. Os outros microrganismos analisados, ou seja, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Salmonella spp.* e *Listeria sp* não foram detectados em nenhuma





amostra. Os resultados microbiológicos encontrados servem de alerta para a importância do controle higiênico-sanitário não só das etapas de produção do queijo, mas sim das etapas de obtenção do leite (matéria-prima) e seu processamento.

Raimundo et al. (2002) analisaram o resultado das 4 amostras de ricotas denominadas com as letras A, B, C e D, das quais a amostra A apresentou contagem de coliformes totais e termotolerantes dentro dos limites. As demais apresentaram altos índices de coliformes totais e termotolerantes, aeróbios mesófilos e bolores e leveduras.

Bachmann et al. (2002) analisaram a qualidade microbiológica de 12 amostras de ricota tipo colonial, de marcas variadas, comercializadas na região de Blumenau - SC e obtiveram os seguintes resultados: bolores e leveduras variaram de  $1 \times 10^7$  a  $2,4 \times 10^7$  UFC/g. A média para *Staphylococcus aureus* foi  $3,3 \times 10^4$  UFC/g e a contagem de aeróbios foi  $1,73 \times 10^5$  UFC/g. Os coliformes totais apresentaram uma variação de  $8 \times 10^2$  a  $1,33 \times 10^4$  UFC/g. Para a *E. coli*, o resultado foi  $4 \times 10^3$  a  $6 \times 10^3$  UFC/g. Concluíram que a fabricação deste produto na região de Blumenau deveria ter uma fiscalização melhor pelos órgãos competentes, pois a contagem elevada do *Staphylococcus aureus* e da *Escherichia coli* podem trazer um grande problema de saúde para o consumidor.

Carminati et al. (2002) recolheram em três laticínios da região da Lombardia, 11 amostras de ricotas preparadas com soro de leite bovino. Por meio das análises microbiológicas, verificaram que elas apresentaram coliformes entre  $< 10$  a  $3,5 \times 10^6$  UFC/g, microrganismos mesófilos entre  $2,7 \times 10^4$



crescimento de microrganismos, como, por exemplo, pH mais baixo ou atividade de água (aw) ou conservantes, e, além de armazenar a frio, deve também ter uma vida de prateleira menor que 30 dias.

Palmas et al. (1994) realizaram um estudo na Itália com dois processos comparativos, por meio dos produtores de ricota feito com leite de ovelha, sendo um dos processos o tradicional, correspondente ao manual, e o outro, o qual inclui a manipulação mecanizada do coágulo, tratamento de calor intensivo, adição de ácido cítrico e láctico, empacotamento automático em recipientes lacrados e armazenamento a frio. Com este estudo, avaliaram que o rendimento do produto, a qualidade microbiológica e a vida de prateleira no processo mecanizado foram superiores do que o mesmo processo executado com o método tradicional. A composição e as propriedades sensoriais foram semelhantes para os dois tipos.

Lodi et al. (1999) analisaram no verão e no inverno um total de 32 amostras de ricotas produzidas em Milão, na Itália, e introduziram artificialmente os microrganismos *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Somente em uma amostra foi encontrado o *Staphylococcus aureus* no valor de 200 UFC/g. A *Escherichia coli* estava presente em 9 amostras no valor de  $> 10$  UFC/g, representando 28,12% das amostras. Os coliformes totais, os bolores e leveduras e as bactérias psicrófilas e lácticas indicaram que a qualidade microbiológica das ricotas produzidas no inverno foram superiores às produzidas no verão. Todas as amostras após 4 dias de vida de prateleira apresentaram alteração na



microbiota. Entretanto, o tempo de vida útil proposto por eles é de 2 dias para ricota fresca e sem sal.

Fadda et al. (1989) analisaram 52 amostras de produtos derivados de leite de ovelha, incluindo 14 queijos duros frescos, 18 queijos maturados, 5 queijos moles, 10 queijos de ricota fresca e 5 de ricota maturada salgada. Encontraram bactérias mesófilas nos queijos moles, no valor entre  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g; nos queijos duros, entre  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC/g; nos queijos de ricota fresca, no valor de  $< 10^9$  UFC/g e na ricota maturada salgada, no valor de  $> 10^9$  UFC/g. A *Escherichia coli* estava presente em 7 (50,00%) das amostras de queijos duros frescos e em 8 (44,00%) das de queijos maturados, mas não estava presente nos 5 queijos moles. Nas 10 amostras de ricota fresca, estava ausente, mas presente em 3 das 5 amostras de ricota maturada salgada, representando 60,00%. O *Enterococcus* estava presente em 30 e 60% de amostras de ricota maturada salgada e fresca, respectivamente.

Ottogalli; Rondinini; Capelletti (1981) verificaram que a qualidade microbiológica foi alterada em 54 amostras de ricotas que apresentaram bactérias mesófilas, enterobactérias, do ácido láctico, bolores e leveduras. Após o tratamento de aquecimento, a microbiota foi drasticamente reduzida, logo após houve a recontaminação pelo ar e alguns microrganismos encontrados na ricota estavam também presentes nas mãos dos trabalhadores. Nas primeiras 24 horas todos os grupos microbianos cresceram e, no período seguinte, os coliformes, os bolores e as leveduras estavam se desenvolvendo significativamente. Com pH elevado e isentas de sal, as ricotas podem conter





elevada contagem de microrganismos e representar um risco à saúde do consumidor.

A pasteurização do produto, a fabricação eventualmente em condições assépticas e uma atenta avaliação da vida de prateleira têm permitido estabelecer em um mês o tempo de conservação (COSSEDDU et al., 1997; COSENTINO et al., 1994).

### 3.3 - Contaminação microbiana em leite e derivados

No último século, houve grande avanço tecnológico. Os processos antes não explicados, principalmente em relação à transformação e produção de alimentos, tornaram-se compreendidos, possibilitando efetuar um controle mais seguro sobre a fabricação de alimentos. Todos os alimentos, de origem animal ou vegetal, frescos ou processados, incluindo a água, podem veicular diferentes microrganismos patogênicos, causadores de diversas perturbações fisiológicas nas pessoas que os consomem (BACHMANN et al., 2002).

Dentre os alimentos considerados de alto valor biológico, o leite ocupa um lugar de destaque. No entanto, os leites crus ou processados são bem conhecidos como veículos de muitas bactérias patogênicas (ADESIYUN; WEBB; RAHAMAN, 1995).

O leite deriva do latim *lacte* e pode ser definido como líquido branco secretado pelas glândulas mamárias, um pouco antes e após o parto dos animais mamíferos. Behmer (1984) definiu este produto como “uma

emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado”.

Entende-se, ainda, por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrompida, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outras espécies deve denominar-se segundo a espécie da qual proceda (BRASIL, 1997).

Fatores como pasteurização ineficiente, higiene deficiente na ordenha e no processo de fabricação são determinantes para a contaminação do produto, além de más condições de transporte, armazenamento e manipulação do leite no comércio varejista que também favorecerem o crescimento de microrganismos contaminantes pré-existentes (RABELO et al., 2001).

Valle (1995) ressaltou que a matéria-prima, equipamentos, embalagens e manuseio são as principais fontes de contaminação na indústria de queijos. Assim, sendo o leite um produto altamente perecível, torna-se um transmissor de microrganismos e infecções alimentares em potencial, podendo comprometer produtos com riscos inclusive à saúde pública, se não for adequadamente obtido, manuseado e processado.

A qualidade do leite cru está intimamente relacionada com o grau de contaminação inicial e com o tempo e temperatura de armazenamento, desde a ordenha até o momento do processamento, portanto, a qualidade microbiológica do queijo é dependente da qualidade da matéria-prima e das boas práticas de fabricação (VIEIRA et al., 2001).

No Brasil, a partir de 1994, o consumo de leite tem aumentado significativamente, tendo em vista a estabilidade da moeda que

estimulou a produção desse produto, contribuindo para o crescimento econômico do setor. Sobre esse assunto, Sant'Anna; Silva; Gomes (2001) afirmaram que, na última década, o Brasil passou a ser um dos maiores produtores de leite do mundo, com um crescimento médio anual de 4% (TEIXEIRA; SOUZA; MARTINS, 2001).

Feniman; Pasini; Mucelin (2003) relataram que os laticínios brasileiros produzem leites pasteurizados tipos A, B e C, além do leite tratado a ultra alta temperatura (UHT), conhecido como leite longa vida. A qualidade microbiológica do leite pasteurizado e as instalações para a sua obtenção e produção, estão vinculadas à classificação citada, onde de C para A, o produto tem, respectivamente, melhor qualidade.

A elevada proporção de casos de mastite no rebanho leiteiro, ao lado da deficiência na higiene da ordenha, constitui a principal causa da produção de leite com elevados teores de patógenos (GERMANO; GERMANO, 1995).

Um dos processos de tratamento do leite cru é a pasteurização que, de acordo com Veisseyre (1988) tem por finalidade reduzir a carga microbiana total, seja banal ou patogênica. Chiappini; Franco; Oliveira (1995) observaram que é efetivo contra os microrganismos, porém não destrói as enterotoxinas porventura presentes.

Hoffmann; Garcia-Cruz; Vinturim (1994); Garcia-Cruz; Hoffmann; Vinturim (1994) realizaram pesquisas sobre a qualidade microbiológica do leite tipo C, uma das matérias-primas que podem ser utilizadas para a produção de queijos. Com isso, verificaram que o mesmo por não apresentar



qualidade higiênico - sanitária satisfatória, poderá ser veículo de contaminação bacteriana, principalmente se não for adequadamente pasteurizado.

Paro et al. (2003) recolheram 10 amostras de leite "in natura" e 40 de leite pasteurizado, em 5 pontos do processamento de uma micro-usina de beneficiamento de leite tipo B situada no estado de São Paulo. Apesar de 4 (40,0%) amostras de leite cru terem apresentado contagens de microrganismos mesófilos acima de  $5 \times 10^5$  UFC/mL e de 4 (40,0%) terem se mostrado contaminadas por *Staphylococcus* coagulase positivas, as 40 (100,0%) amostras de leite pasteurizado analisadas apresentaram-se dentro dos padrões microbiológicos legais. Tais achados podem ser atribuídos à elevada (99,8%) eficiência do processo de pasteurização e aos cuidados higiênico-sanitários empregados durante o beneficiamento na micro-usina objeto desta investigação.

O leite pasteurizado tipo C vem perdendo mercado, uma vez que a qualidade da matéria prima é inferior e ainda por não possuir um controle tão rigoroso durante seu processamento. Isso propicia a ocorrência de constantes denúncias quanto à sua qualidade, fazendo com que o consumidor dê preferência a outros tipos de leite. Destaca-se que o crescente mercado do leite UHT tem conquistado a predileção do consumidor (PRIMO, 2001). Os consumidores têm exigido a melhoria da qualidade dos produtos industrializados, o que induz as indústrias a produzirem dentro de padrões específicos.

A embalagem é um outro ponto crítico que deve ser considerado no controle microbiológico do leite pasteurizado tipo C. De acordo com Santos; Fonseca (2001) embalagens contaminadas são fonte potencial de microrganismos contaminantes no leite, após a pasteurização. A embalagem



adequada para o acondicionamento desse produto deve estar livre de microrganismos patogênicos e de outros microrganismos deteriorantes que possam se desenvolver nas condições de estocagem e comercialização do mesmo.

Além do controle da temperatura de refrigeração do leite após a pasteurização, é necessário um controle higiênico durante todo o processo de fabricação, pois a microbiota alterante do leite pasteurizado é de dois tipos: bactérias termorresistentes, que sobrevivem ao calor e, principalmente, microrganismos contaminantes, que chegam ao leite após o tratamento térmico (VARNAN; SUTHERLAND, 1995).

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952), para a produção de queijo fresco é exigida a utilização de leite pasteurizado. Esta medida visa evitar que o queijo mantenha os microrganismos patogênicos que possam estar presentes na matéria prima, uma vez que todo produto elaborado a partir desta estaria sujeito a aumentar a contaminação do leite, além da adquirida durante o seu próprio processamento (FRAZIER, 1985).

As práticas de higiene para elaboração de queijos estarão de acordo com o estabelecido no Código Internacional Recomendado de Práticas, Princípios Gerais de Higiene dos Alimentos.

O leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetidos à pasteurização ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase residual negativa combinado ou não com outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto.





Fica excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 1997).

O crescimento dos microrganismos presentes no leite pasteurizado está relacionado com as condições em que o produto é armazenado antes de chegar ao consumidor. Hoffmann et al. (1999) ressaltaram que a manutenção desse produto em temperatura superior à indicada pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA, pode ser um fator determinante para que o mesmo esteja fora dos padrões microbiológicos recomendados.

Feniman; Pasini; Mucelin (2003) verificaram que a obtenção higiênica do leite possibilita diminuir a contaminação e o crescimento da população bacteriana presente. Quando a carga microbiana inicial do leite é elevada, os processos de beneficiamento e industrialização geralmente não são eficientes para a destruição de microrganismos deterioradores, até mesmos os patogênicos.

A pasteurização, segundo Ottogalli (1986); Forsythe (2002) efetuada a 72°C por 15 segundos, denominada alta temperatura por curto tempo, reduz a carga total de microrganismos patogênicos presentes no leite fresco, tais como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella* spp e *Brucella* spp. Os microrganismos que sobrevivem à pasteurização são os termodúricos que são os *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* e *Microbacterium lacticum*. Forsythe (2002) afirmou também que os esporos de



*Bacillus cereus* e de *Bacillus subtilis* sobreviverão ao tratamento térmico, sendo que o crescimento do *Bacillus cereus* causa a deterioração do leite conhecida como nata fina. Franco e Landgraf (2003) relataram também que a pasteurização pode ser atingida sob diferentes combinações de tempo e temperatura, sendo a mais comum denominada baixa temperatura por tempo longo (63°C por 30 minutos).

O soro de leite não é uma exceção. Amieva (1974) afirma que as operações normais de elaboração do queijo dão como resultado um soro carregado de microrganismos.

Os principais microrganismos produtores de intoxicações e de infecções humanas são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., transferidos direta ou indiretamente para os alimentos por diversas vias (EVANGELISTA, 2001).

Travassos; Medeiros; Mangueira (2001) citaram que a ricota fresca é considerada um dos produtos que apresentam melhores condições para o desenvolvimento e crescimento de microrganismos como *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*. Os coliformes totais e fecais, dentre outros, devido à presença de alguns componentes como a lactose e os sais minerais, podem comprometer a qualidade do produto em curto espaço de tempo.

Devido à ocorrência de surtos de intoxicação alimentar envolvendo derivados lácteos, torna-se muito importante a avaliação da qualidade higiênico-sanitária destes produtos (CASAROTTI; GALLO; CAMARGO, 1994).



### 3.4 - Principais patógenos microbianos em leite e derivados

A contaminação microbiana dos alimentos é a causa principal de doenças; além disso pode causar debilidade e até a morte. As doenças alimentares são, muitas vezes, causadas por bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella*, sendo umas das causas bacterianas mais comuns dos estimados 6,4 milhões de casos de doenças alimentares que ocorrem anualmente nos Estados Unidos (ARCHER; YOUNG, 1988).

#### 3.4.1 - *Staphylococcus aureus*

Um dos principais patógenos encontrados no leite é o *Staphylococcus aureus*, que pode se multiplicar e produzir toxinas. A intoxicação estafilocócica alimentar é uma doença cosmopolita causada pela ingestão de enterotoxinas pré-formadas no alimento por algumas linhagens de *S. aureus* (OLIVEIRA; HIROOKA, 1999).

As enterotoxinas estafilocócicas pertencem a um grupo de proteínas de cadeia simples de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 Daltons), produzidas por algumas espécies de estafilococos, principalmente *S. aureus*, que, quando ingeridas, podem causar gastroenterite (SU YI-CHENG; WONG, 1997).

Para Frazier (1985) a enterotoxina é produzida quando os estafilococos se multiplicam à razão de muitos milhões por mililitro. Devido ao risco que representa para a saúde pública a presença de enterotoxinas nos

alimentos, causadoras de gastroenterites ou inflamações da mucosa gástrica e intestinal, é necessário que a utilização de soro de queijo como ingrediente de alimentos seja acompanhada dos mesmos cuidados que a legislação prescreve para as demais matérias-primas e produtos alimentícios.

Melchíades et al. (1993) ressaltaram que microrganismos do gênero *Staphylococcus* presentes no leite cru podem representar um risco à saúde dos consumidores, pelo fato de algumas linhagens destas bactérias produzirem enterotoxinas termoestáveis, capazes de provocar intoxicação alimentar. Citam ainda que esta intoxicação pode ocorrer após a ingestão de leite e derivados crus ou pasteurizados, nos quais as cepas enterotoxigênicas, encontrando condições favoráveis à multiplicação, produzem enterotoxinas capazes de desencadear severos processos de gastroenterite, principalmente em crianças e idosos.

Segundo Forsythe (2002) a toxina estafilocócica é termo estável não podendo ser inativada por regimes de cocção padrão.

O problema da presença desta bactéria no leite é que, quando atinge níveis entre  $10^5$  -  $10^6$  UFC/mL (IARIA, 1991), pode produzir toxinas em quantidades suficientes para causar a intoxicação.

Os estafilococos estão difundidos na natureza. Eles podem ser encontrados no ar, na poeira, no homem e nos animais. O principal reservatório no organismo humano é a pele e a cavidade nasal (SU YI-CHENG; WONG, 1997; von EIFF et al., 2001).

A orofaringe é igualmente colonizada com frequência (SALVADOR; BARACCHINI; ITO, 1989). A presença nas mãos e em outras



superfícies corpóreas resulta de vínculo epidemiológico, decorrente de disseminação a partir dos principais sítios anatômicos (OLIVEIRA SANTOS; AGUILLAR; TAKAKURA, 1990; CARVALHO; SERAFINI, 1996; PEREIRA et al., 1999b).

Moutinho (2001) relatou que a intoxicação alimentar causada por toxinas pré-formadas de *Staphylococcus aureus* é uma das principais. O homem é considerado a principal fonte de contaminação por *S. aureus* de produtos submetidos à pasteurização, pois 30 a 50% das pessoas saudáveis são portadoras destes. O contato com as superfícies inadequadamente higienizadas dos equipamentos de produção ou a exposição do produto alimentício, também podem ser origem de contaminação por *S. aureus* (THATCHER; CLARK, 1973; TATINI; HOCVER; LACHICA, 1984).

Miller; Ledford (1977) analisaram o crescimento de estafilococos enterotoxigênicos em soro de queijo Cheddar e encontraram  $1,5 \times 10^4$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL) em soro cru e  $3,4 \times 10^8$  UFC/mL em soro aquecido a 62°C por 30 minutos, após 24 horas de incubação. Isto vem mostrar que o alimento processado propicia ao *S. aureus* coagulase positiva a ausência de competidores que impeçam seu crescimento e ação (TATINI; HOCVER; LACHICA, 1984).

Badini et al. (1996) analisaram 60 amostras de leite cru, coletadas em 2 cidades paulistas e encontraram 30 amostras, representando 50,0% delas, contaminadas por *Staphylococcus* coagulase-positiva. Isso demonstra os riscos que sofrem os consumidores de leite cru, ou de produtos lácteos, fabricados sem pasteurização do leite.



No período de 1992 a 1994 foram notificados 21 surtos, sendo o alimento suspeito o queijo tipo "Minas Frescal", sendo que 18 deles (85,71%) revelaram a presença de *Staphylococcus aureus* em contagem na faixa de  $10^5$  a  $10^9$  UFC/g do produto. A análise da sintomatologia e do período de incubação, associados à elevada contagem de *S. aureus* revelou este microrganismo como agente etiológico potencial dos surtos analisados neste período (DIAS et al. 1995).

Sabioni; Nascimento; Pereira (1994) descreveram um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus* que acometeu 11 pessoas que consumiram queijo Minas. O queijo foi produzido com leite cru e comercializado pelo próprio fabricante, sem refrigeração. Havia presença de cerca de  $10^8$  UFC/g de produto.

Garcia-Cruz; Hoffmann; Vinturim (1994) analisaram 11 amostras de queijo Minas Frescal, sendo que 10 delas apresentaram contaminação por *Staphylococcus aureus*. A amostra que não apresentou contaminação foi produzida em laboratório sob estritas condições higiênico-sanitárias.

Mandil et al. (1982) estudando 99 amostras coletadas no varejo do município de Belo Horizonte, quanto à presença de microrganismos potencialmente patogênicos, revelaram que 65 delas (65,70%) apresentaram *Staphylococcus aureus*.



### 3.4.2 - Coliformes fecais - *Escherichia coli*

Em consequência da freqüente precariedade das condições higiênico-sanitárias na produção de alimentos, é comum a presença de coliformes, inclusive da *Escherichia coli* (FEITOSA et al., 1985).

De acordo com Franco; Landgraf (2003) os coliformes a 30°C, além de serem encontrados em fezes humanas e animais, podem ser encontrados em outros ambientes como o solo, onde persistem por mais tempo que as bactérias patogênicas de origem intestinal como a *Salmonella* e *Shigella*.

A presença dos coliformes fecais com ênfase na *E. coli* tem sido relatada no leite usado como matéria-prima para produção de queijos. Por serem bactérias termossensíveis, sua presença no produto pasteurizado indicará contaminação, posterior à pasteurização ou então tratamento térmico deficiente (VESSONI PENNA; BARUFFALDI; COLOMBO, 1986).

A contaminação após pasteurização por equipamentos sujos ou falta de higiene durante o preparo, pode levar a uma elevação do grau de contaminação por coliformes de 10 para 100/mL em leite pasteurizado (ARCHAM-BAULT, 1954; LIGHTBODY, 1962) e apenas o registro no Serviço de Inspeção Federal - SIF, não tem sido suficiente para garantir o padrão microbiológico de coliformes fecais nos queijos frescos (PEREIRA et al., 1999a).

Badini et al. (1996) analisaram 60 amostras de leite cru, coletadas em 2 cidades paulistas e encontraram 11 (18,30%) delas contaminadas por coliformes fecais, demonstrando o risco de quem consome produtos lácteos sem pasteurização.





Tessari; Cardoso (2002) analisaram 50 amostras de leite tipo A pasteurizado que foram coletadas durante o período de agosto de 2000 a janeiro de 2001 na cidade de Descalvado, no estado de São Paulo. Com isso, verificaram que 18 amostras (36,00%) para contagem de coliformes totais e 9 amostras (18,00%) para contagem de coliformes fecais apresentaram valores acima dos padrões legais estabelecidos pelo Ministério da Saúde.

Segundo Dias et al. (1995) no período de 1992 a 1994, foram notificados 21 surtos de toxinfecção alimentar tendo como alimento suspeito o queijo tipo "Minas Frescal", sendo que 13 deles (61,90%) apresentaram coliformes fecais com valores entre  $10^3$  a  $10^5$  NMP/g, indicando suas más condições higiênico-sanitárias.

Hayes (1993) relatou que existem padrões microbiológicos específicos que devem ser seguidos, e dentro de tais padrões, o número de coliformes totais e coliformes fecais acima dos padrões indicam contaminação do leite, o que favorece a presença de patógenos de origem entérica.

O número de coliformes fecais acima do limite tolerável e a presença de *Escherichia coli* são indicadores de contaminação por material fecal humano e animal, segundo Ribeiro (1981).

A presença destes microrganismos em índices condenatórios, além de mostrar as más condições higiênicas, evidencia, também, a possibilidade de o produto veicular outros microrganismos patogênicos ao homem (PEREIRA et al., 1999a).

A verificação de coliformes fecais e de *Escherichia coli* nos alimentos, segundo Franco; Landgraf (2003), fornece informações seguras sobre

as condições higiênicas a que o produto foi submetido e indica possível presença de patógenos.

A *Escherichia coli* enterotoxigênica é causa comum da “diarréia de viajante”. Algumas linhagens, ao serem ingeridas com os alimentos, desenvolvem no intestino e produzem toxinas que originam hipersecreção no intestino delgado; a luz intestinal é distendida pelo líquido, provocando hipermotilidade e diarréia que duram alguns dias (1 a 3). O período de incubação é de 24 a 72 horas, ocorrendo vômito e diarréia, embora não exista febre (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

Leitão; Romeu; Cruz (1971/1972) verificaram que a presença de grande número de coliformes totais não é indicativa de perigo para a saúde, porém indica a falta de boas práticas sanitárias e constitui um alerta de que é possível encontrar também diferentes patógenos, como por exemplo *Shigella* spp e vibriões.

Os surtos de *Escherichia coli* estão relacionados a inadequadas temperaturas de cozimento em carnes bovinas em várias partes do mundo (MATTHEWS; THEIS, 1993).

Fantasia et al. (1975) relataram que o número de *Escherichia coli* em queijos pode ultrapassar  $10^5$  UFC/g, se conservados à temperatura ambiente e formar colônias em número maior que  $10^3$  UFC/g, quando conservados a 4°C, durante 10 dias. Isso demonstra a necessidade de mantê-los refrigerados e, principalmente, de se obter um produto com contaminação inicial baixa de microrganismos.

### 3.4.3 - *Listeria monocytogenes*

É um cocobacilo Gram positivo, não esporulado, não produtor de ácidos, aeróbio e anaeróbio facultativo, de ampla distribuição ambiental, com caráter ubiqüitário, tendo sido isolado de águas superficiais, esgotos domésticos, águas residuárias de indústrias de laticínios e de abatedouros, solos, insetos, adubo orgânico, fezes de animais e inclusive de humanos (KONEMAN et al., 1997; MIMS et al., 1999; NOJIMOTO; SOUZA; VALADÃO, 1997).

*Listeria sp* é normalmente encontrada no meio ambiente, sendo a silagem a principal fonte de contaminação para os ruminantes. *Listeria monocytogenes* é responsável por quadros de mastite, contaminando o leite cru. As toxinas produzidas causam quadros neurotóxicos em humanos, sendo graves em gestantes. Os surtos de listeriose humana na América do Norte têm sido associados a produtos lácteos contaminados, resultando em mortalidade de 33% do total de casos (EL MARRAKCHI; HAMAMA; EL OTHMANI, 1993).

Apesar da *Listeria monocytogenes* ser um patógeno estudado por mais de 60 anos, causando doenças em animais, somente a partir da década de 80 é que foi reconhecida a sua significância em saúde pública, associada a toxinfecções alimentares humanas (ARCHER, 1996; BRACKET, 1988; EMOND, 1993). Sem dúvida alguma, os principais surtos epidêmicos de listeriose humana originam-se de alimentos contaminados (FARBER; PETERKIN, 1991).





As manifestações clínicas comumente associadas a tais patogenias são: meningite, septicemia, formas tifóidicas e pulmonares, granulomatose séptica e aborto. Nas bacteremias por *L. monocytogenes* em adultos, o sintoma mais comum é a febre, podendo ocorrer fadiga, mal estar, náusea, vômitos, dores e diarreia (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Na microbiologia de alimentos, vêm sendo estudada, nos últimos anos, a presença de *Listeria sp* com predominância da espécie *monocytogenes*, assim como a diversidade de espécies do gênero. Contribui para este estudo um maior conhecimento destes patógenos nos seus aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, através do desenvolvimento de meios de cultura mais seletivos que favoreceram seu isolamento e identificação (FRASER; SPERBER, 1988; HAYES et al., 1992).

Segundo Dominguez Rodriguez et al. (1985) a presença de *Listeria* no leite e derivados pode ocorrer antes ou após a pasteurização. Tais autores examinando 95 amostras de leite cru refrigeradas, encontraram *Listeria grayi* em 89,5%, *L. monocytogenes* em 43 amostras (45,3%), *L. innocua* em 15,8%, *L. welshimeri* em 3,1% e *L. seeligeri* em 1,05%.

A sobrevivência de *L. monocytogenes* em vários tipos de queijos foram estudadas também por Dominguez Rodriguez et al. (1987) relatando que esse microrganismo sobrevivia por um período de 60 até 434 dias.

Cox et al. (1989) também detectaram *Listeria sp* em quase todas as amostras de efluentes de indústrias processadoras de queijos e concluíram que poderiam ser consideradas como uma importante fonte externa destes microrganismos.



por *L. monocytogenes*. Apesar dos vários relatos na literatura internacional sobre a ocorrência de listeriose associada à ingestão de alimentos, sendo os produtos de laticínios os mais freqüentemente envolvidos nos casos recentes de listeriose humana, no Brasil pouca atenção tem sido dada à possibilidade de veiculação do agente por alimentos (SILVA; VILARDI; TIBANA, 1998).

A grande freqüência de casos de listeriose, veiculada por queijos, evidencia a importância desse alimento e de outros derivados do leite na cadeia epidemiológica de transmissão de *Listeria sp* (RYSER; MARTH, 1991). Entretanto, são poucos, e em alguns casos discordantes, os resultados obtidos pelos pesquisadores Casarotti; Gallo; Camargo, 1994; Destro; Serrano; Kabuki, 1991; Vieira et al., 1993, sobre a incidência desse patógeno em queijos consumidos no nosso meio. Provavelmente a maioria dos laboratórios não se encontra familiarizada com a metodologia de isolamento e/ou devido aos diferentes procedimentos empregados.

No Brasil, existem vários registros da presença de *L. monocytogenes* em leites e derivados, conforme os trabalhos de Destro; Serrano; Kabuki, 1992; Furlanetto; Santos; Hara, 1996; Moura; Destro; Franco, 1993; Silva, 1997; Van Dender, 1995. Dentre eles, Silva; Hofer; Tibana (1998) pesquisaram sobre a contaminação em queijos produzidos no Rio de Janeiro, encontrando 19,6% das amostras positivas para *L. monocytogenes* e, ainda, as mesmas foram também positivas para *L. innocua* e *L. grayi*.

Silva; Vilardi; Tibana (1998) analisaram 103 amostras de diferentes tipos de queijos (gorgonzola, roquefort, cheddar, brie, camembert, "Minas Frescal" e ricota), sendo que 11 (10,8%) apresentaram-se contaminadas





por *L. monocytogenes*, 13 (12,7%) por *L. innocua*, 6 (5,8%) por *L. grayi* e 1 (0,97%) por *L. welshimeri*. Foram positivos para *L. monocytogenes* os queijos: gorgonzola, roquefort e "Minas Frescal". É relevante a incidência de *L. monocytogenes* em 5,7% dos queijos maturados (gorgonzola e roquefort) analisados, pois no Brasil inexitem dados a esse respeito.

Os queijos macios, brancos e frescos são submetidos ao mínimo processo antes do empacotamento e são muito perecíveis. Mesmo na refrigeração, possuem vida de prateleira muito pequena. Porém, devido ao fato da *Listeria monocytogenes* ser psicrotrófica e poder desenvolver nas temperaturas refrigeradas, a contaminação por este microrganismo poderia encadear para um fator de alto risco. Em 1985, o consumo de queijo contaminado, estilo mexicano (queijo branco) da marca Jalisco, fabricado no estado da Califórnia, ocasionou mais de 142 casos de listeriose, incluindo também 48 mortes (LINNAN et al., 1988).

Hayes et al. (1986) isolaram *Listeria monocytogenes* em 15 (12,0%) das 121 amostras de leite cru examinadas durante um surto de listeriose ocorrido nos Estados de Massachusetts e Connecticut, nos E.U.A. A presença de listeria foi detectada na Alemanha, em amostras de queijos embalados (WEBER et al., 1988), com isolamento de 60 linhagens nas 509 amostras examinadas, a saber: 29 *Listeria monocytogenes*, 31 *Listeria innocua*.





### 3.4.4 - *Salmonella* spp.

Por razões não bem compreendidas, a incidência de doenças entéricas parece estar aumentando. O maior surto de salmonela na história ocorreu em 1985 (RYAN et al., 1987).

Segundo Alves et al. (2001), a salmonelose, doença causada pela bactéria *Salmonella*, constitui-se num importante problema sócio-econômico em vários países do mundo, principalmente nos desenvolvidos, já que o agente etiológico desta enfermidade tem sido incriminado como o principal responsável pelos surtos das doenças transmitidas por alimentos (DTA).

Góes et al. (2001) comprovaram que a maioria dos casos de DTA ocorre via manipulador, o qual transmite o microrganismo patogênico, sem contudo apresentar sintomas da doença. Sua inobservância nos hábitos de higiene termina por comprometer a qualidade dos alimentos.

Trata-se de um patógeno muito envolvido em casos de surtos de doenças de origem alimentar em diversos países. Jay (2000) mencionou que esse agente, dentre os bastonetes Gram-negativos que causam gastroenterites de origem alimentar, é o mais importante.

As salmoneloses caracterizam-se por sintomas que incluem náuseas, vômitos, enxaqueca, calafrios, dores abdominais e diarreia. Os mesmos são usualmente acompanhados de prostração, dor muscular, desmaio, febre moderada, agitação e sonolência (JAY, 2000). A sintomatologia surge em média de 12 a 72 horas após a ingestão do alimento contaminado, com a duração

de 1 a 7 dias ou mais (CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC, 1999; HOBBS; ROBERTS, 1999).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal. Nos casos onde estão envolvidos produtos de laticínios, comumente há ligação com o consumo de leite cru ou pasteurizado de forma inadequada e também de queijos (JAY, 2000).

Jay (2000) citou também 2 dos maiores surtos de salmonelose registrados nos Estados Unidos, que ocorreram em circunstâncias incomuns. O primeiro e maior ocorreu em 1994 e envolveu mais de 224.000 pessoas, devido à *S. enteritidis*, atingindo 41 estados. O veículo de transmissão foi sorvete produzido com leite transportado num caminhão-tanque, que previamente tinha sido carregado com ovo líquido. O segundo ocorreu em 1995 e envolveu cerca de 200.000 pessoas, devido à *S. typhimurium*, proveniente de leite semi-desnatado.

A implantação das boas práticas de fabricação e dos princípios de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) são os instrumentos mais significativos para o controle das salmoneloses nas indústrias e estabelecimentos manipuladores dos alimentos (BARROS; PAIVA; PANETTA, 2002).



### 3.5 - Bolores e leveduras

Os bolores são formados por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio, sendo este responsável pelo aspecto característico das suas colônias. Estas podem apresentar aspecto cotonoso, serem secas, úmidas, compactas, aveludadas, gelatinosas, com variadas colorações. Por serem aeróbios, na maioria das vezes, o crescimento dos alimentos limita-se à superfície em contato com o ar (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os bolores podem desenvolver dois tipos de ações: não patogênica e patogênica. A primeira tem a participação de transformação da matéria orgânica do solo, deteriora alimentos e outros produtos e são agentes de processamentos industriais, enquanto a segunda provoca doenças em vegetais e animais (EVANGELISTA, 2001).

De acordo com Franco; Landgraf (2003) a produção de micotoxinas por bolores pode tornar-se um perigo à saúde pública.

As leveduras são microscópicas e pertencem à subdivisão das talófitas, designadas por Eumycetos, que por sua vez podem ser divididas em Ascomycetos (leveduras verdadeiras) e Deuteromycetos (leveduras falsas) (EVANGELISTA, 2001).

Os bolores e as leveduras mostram maior tolerância ao pH, sendo que os primeiros podem multiplicar-se em valores mais baixos que as leveduras, sendo estas, por sua vez, mais tolerantes que as bactérias a valores



baixos de pH. Entre as bactérias, verifica-se que as patogênicas são as mais exigentes (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Os bolores no queijo são comuns e que podem ser um problema para o produtor, durante a maturação, bem como para o varejista e consumidor, durante a estocagem, seja ele refrigerado ou não. Esse crescimento sempre foi considerado indesejável por causar perdas econômicas, devido às descolorações, aparência desagradável, perda de sabor e também por ser capaz de produzir metabólicos tóxicos, conhecidos como micotoxinas (TANIWAKI; VANDENDER, 1991).

Ao se comparar a velocidade de multiplicação de bactérias, de bolores e de leveduras, constataram que as primeiras apresentam o menor tempo de geração. Por isso, são os principais agentes deteriorantes quando o alimento oferece condições ideais para sua multiplicação. Se, no entanto, existirem condições seletivas, como pH ácido, atividade de água inferior a 0,94, temperatura entre 25-28°C e substrato rico em carboidratos e ácidos orgânicos, os microrganismos predominantes serão as leveduras (EVANGELISTA, 2001; FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Algumas espécies de fungos são dimórficas e têm a capacidade de desenvolver na forma de levedura ou bolor, dependendo das condições ambientais (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2000).

As leveduras são unicelulares, e, de modo geral, exigem menor umidade que a maioria das bactérias e maior que a maioria dos bolores. A temperatura ideal para o seu desenvolvimento varia entre 25 e 30°C e o pH ácido favorece o crescimento. Multiplicam-se melhor quando estão em aerobiose, mas



os tipos fermentativos desenvolvem-se bem também em anaerobiose. Os açúcares são a melhor fonte de energia (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Segundo Jawetz; Melnick; Adelberg (2000), leveduras são células isoladas, de forma geralmente esférica ou elipsóide, cujo diâmetro varia de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Na maioria das leveduras, a reprodução ocorre por brotamento, e algumas espécies produzem brotamentos que geralmente não se desprendem, tornando-se alongados. O processo contínuo de brotamento produz então uma cadeia de células alongadas de leveduras, denominada pseudohifa. Em geral, suas colônias têm consistência mole, são opacas e de cor creme, de 1-3 mm de tamanho. Como as colônias e a morfologia microscópica de numerosas leveduras são muito semelhantes, as espécies são identificadas com base em testes fisiológicos e em algumas diferenças morfológicas significativas. As produtoras de pigmentos, provocam o aparecimento das seguintes cores: branco, creme, rosa ou marrom (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

As leveduras podem representar o principal grupo de microrganismos que pode ocasionar deterioração em alimentos, sendo que seu crescimento é comumente acompanhado da formação de  $\text{CO}_2$  e álcool. Algumas também desenvolvem turbidez, floculação, película e depósito. Elas podem também degradar os ácidos orgânicos, promovendo o aumento do pH e formar o acetaldeído, contribuindo também para a fermentação do açúcar (WALKER, 1977; WALKER; AYRES, 1970).

Os métodos de preservação usualmente empregados para controlar o desenvolvimento de leveduras são altas temperaturas (para



desnaturar os esporos), conservantes com ácidos fracos (ácido sórbico) e antibióticos como natacilina. Algumas leveduras já adquiriram resistência ao ácido sórbico e podem degradá-lo, produzindo pentadieno de odor desagradável (FORSYTHE, 2002).

No período de 1914 a 1989, muitas leveduras foram isoladas de produtos derivados do leite e taxonomicamente identificadas, e, durante este período, ocorreram muitas mudanças na classificação e nomenclatura de leveduras (FLEET, 1990).

A presença de leveduras nos queijos pode ser originária do leite, de contaminações durante a sua fabricação, de equipamentos de processo, de meios de cultura para as bactérias ácido lácticas, de adição de sal ou cultura para fungos (MARTINEZ; TESONE; QUEVEDO, 1986).

Vários produtos de laticínios, como queijos e creme para fabricar manteiga, podem ser alterados por sua ação sobre a lactose; desse processo fermentativo, resulta enorme produção de  $\text{CO}_2$ , originando odor não agradável (EVANGELISTA, 2001).

Fleet (1990) além de relatar que a contaminação por leveduras está geralmente relacionada à adição de frutas e/ou a práticas ineficientes de higiene durante a operação de empacotamento, mencionou ainda que as leveduras em alguns queijos contribuem para a deterioração, mas, em outros, fazem uma contribuição positiva para o desenvolvimento do sabor, durante o estágio de maturação.

Fleet (1990/1992) relatou que as leveduras e os fungos estão geralmente envolvidos na deterioração de iogurtes, sendo responsáveis



pela perda do sabor, da qualidade e da textura, devido à produção de gás, estufamento e diminuição (FOSCHINO; GARZAROLLI; OTTOGALI, 1993).

A presença de bolores e leveduras em iogurte foi relatada em pesquisas, em Portugal (VAN UDEN; CARMO-SOUSA, 1957), Austrália (FLEET; MIAN, 1987; SURIYARACHCHI; FLEET, 1981) e Nigéria (GREEN; IBE, 1987). Foi relatado que mais de 60% das amostras apresentaram contagens superiores a  $10^4$  UFC/g. A contagem de bolores e leveduras estava entre  $10^4$  e  $10^5$  UFC/g no Egito (HARIDY, 1993; SAAD; MOUSTAFA; AHMED, 1987). No Reino Unido (DAVIS, 1974; DAVIS, 1975) e Canadá (ARNOTT; DUISTSCHAEVER; BULLOCK, 1974) mais de 30% das amostras mostraram contagens maiores que  $10^3$  UFC/g. O conteúdo de mais de  $10^2$  UFC/g foi relatado em 95% de iogurtes na Espanha (BRAZAL-GARCIA; RUIZ; DÍAZ, 1986). Nos Estados Unidos (HANKIN; SHIELDS, 1980) e na Holanda (HUP; STADHOULDERS, 1972) a contaminação foi um pouco menor.

Os trabalhos de Koburger (1971); Hup; Stadhouders (1972), Anagnostakis; Hankin (1975); Koburger; Farhat (1975); Henson et al. (1982); Brodsky et al. (1982); Williams (1986); Jarvis; Shapton (1986); Banks; Broad (1987) mostram que bolores e leveduras isoladas estão presentes em alimentos em geral. Há referências da ocorrência de leveduras em muitas amostras de queijos moles, semi-moles e duros. Em algumas amostras, as contagens de leveduras têm sido relatadas tão altas quanto  $10^6$  -  $10^8$  UFC/g.

No gênero *Debaryomyces*, as células vegetativas são esféricas e a reprodução ocorre por brotamento multilateral. Apresentam pouca atividade fermentativa (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Sua reprodução se faz não



só por gemação multipolar, como também por forma sexual (EVANGELISTA, 2001). Suas espécies possuem elevada tolerância ao sal (18 a 20%) e pertencem ao grupo das formadoras de película na superfície de alimentos salgados ou mantidos em salmoura (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Fleet; Mian (1987) relataram a espécie *Debaryomyces hansenii* como o contaminante mais comum de alimentos, apresentando os seguintes atributos: (a) habilidade de crescer bem em baixas temperaturas; (b) habilidade de fermentar sacarose e/ou lactose e resistência aos conservantes sorbato e benzoato.

Moreira et al. (2001) analisaram 72 amostras de iogurte e isolaram no total 577 leveduras, sendo que 191 (33,10%) delas foram identificadas como a espécie *Debaryomyces hansenii*.

Moreira et al. (2001) relataram também que a espécie *Debaryomyces hansenii* foi a mais freqüentemente isolada nas amostras de iogurtes da Austrália e do Reino Unido.

Fleet (1992) relatou um alto nível de não aceitação por contaminação de leveduras em iogurte em muitos países.

Segundo Barnett; Payne; Yarrow (2000), a espécie de levedura halotolerante *Debaryomyces hansenii* é encontrada em queijos, carnes, vinhos, cervejas, frutas, solo e água do mar. Esta é uma das espécies mais conhecidas como osmotolerantes (BANSAL; MONDAL, 2000) e comumente encontrada em todos os tipos de queijos (FLEET, 1990). Segundo Ramos et al. (1998), as linhagens de origem européia são pobremente fermentativas, enquanto as brasileiras têm capacidade de fermentação notável.





Fleet (1990) relatou também que a espécie *Debaryomyces hansenii* possui boa tolerância à concentração elevada de sal, o qual é o principal ingrediente usado na fabricação de alguns queijos. Acrescentou ainda que esta espécie tem habilidade variável para produzir enzima proteolítica e lipolítica para metabolizar as proteínas e a gordura do leite.

Levantamentos específicos realizados com 12 amostras de queijos importados da Europa e América do Norte indicaram que 5 delas apresentaram contagens de leveduras entre  $10^6$  -  $10^8$  UFC/g. As espécies mais freqüentemente isoladas foram *Debaryomyces hansenii* e *Candida lipolytica* (NAKASE; KOMAGATA, 1977).

Bôer; Kuik (1987); Nooitgedagt; Hartog (1988) verificaram por meio de análises feitas em 256 amostras de diferentes tipos de queijos ("Blue-veined", Brie, Camembert, Danablu, Roquefort e Gorgonzola), uma incidência muito elevada de leveduras. Oitenta e sete por cento das amostras de Gorgonzola e 77% das de Roquefort apresentavam resultados elevados para contagem de leveduras,  $10^7$  -  $10^8$  UFC/g. Após isolamento e taxonomia, a espécie *Debaryomyces hansenii* foi encontrada com maior freqüência, sendo também verificadas *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Yarrowia lipolytica*. As amostras de queijos Brie e Camembert, pesquisados na Holanda, revelaram que 60% destas apresentavam uma população de leveduras  $> 10^6$  UFC/g, sendo isoladas *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus* e algumas espécies de *Candida*, sendo que esta última predominava sobre as isoladas.





Ikemiya; Yasumi (1973) reportaram um bom crescimento de *Debaryomyces hansenii* na superfície de queijos processados. A determinação por julgamento subjetivo da deterioração do queijo ocasionada por leveduras durante a maturação é complicada, pois pode ser benéfica ou maléfica à qualidade do produto (FLEET, 1990).

Segundo Marth (1978), os gêneros *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Cândida* fazem várias contribuições no processo de cura: algumas espécies desses gêneros metabolizam o ácido láctico do coágulo de queijo, desse modo, fazendo o pH aumente de valor inicial 5,0 a aproximadamente 5,7. Esta diminuição da acidez encoraja o crescimento de bactérias, cujas atividades lipotítica e proteolítica são essenciais para a maturação do queijo.

Os autores Roth; Clegg; Stiles (1971); Hankin; Stephens; Dillman (1975); Guirald; Galzy (1976); Brocklehurst; Lund (1985); Engel (1986b); Engel et al. (1987) avaliaram que existe pouca dúvida que as leveduras possam deteriorar queijo cottage ou tipos semelhantes de queijo de maturação leve, tais como queijo quark. As leveduras que apresentam contagens entre  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g se desenvolvem no armazenamento refrigerado do produto final, levando a alterações no sabor e no odor, obtendo formação de gás e a presença de colônias na superfície. Entretanto, Suriyarachchi; Fleet (1981); Green; Ibe (1987) afirmaram que a deterioração se torna evidente quando as colônias de leveduras produzem gás através da fermentação e ocasionalmente são vistas na superfície da embalagem.

As espécies de leveduras e suas contagens podem variar entre as fábricas de laticínios bem como igualar-se entre dias consecutivos da mesma fábrica, como foi demonstrado por vários autores (WELTHAGEN; VILJOEN, 1998; SEILER; BUSSE, 1990). A diversidade de espécies observada em diferentes tipos de produtos pode ser atribuída a diferentes tipos de condições na produção da fábrica (COSENTINO et al., 2001).

Fleet (1990) revelou que algumas propriedades específicas são selecionadas para o crescimento e predominância de leveduras em produtos lácteos, dentre elas: fermentação ou assimilação de lactose, produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, assimilação de ácido lático e ácido acético, crescimento sob baixa temperatura e também elevada concentração de sal.

Peppler (1977); Miller (1979) realizaram uma avaliação geral de propriedades físicas e bioquímicas de leveduras em relação à sua atividade em alimentos. Diversas discussões relacionadas as diferentes propriedades de leveduras isoladas de produtos lácteos, foram também feitas por Schmidt; Graffard; Lenoir (1979), Baroiller; Schmidt (1984) e Fleet; Mian (1987).

Schmidt; Graffard; Lenoir (1979); Baroiller; Schmidt (1984); Schmidt; Daudin (1983) estudaram uma focalização taxonômica em leveduras isoladas dos queijos e a compilação das espécies. Isso poderia aparecer através das observações que produtos derivados do leite, em seu conjunto, apresentam um nicho ecológico único, selecionado para o crescimento e ocorrência de somente umas poucas espécies principais, como as *Debaryomyces hansenii* e *Kluyveromyces marxianus*, assim como de seus esporos equivalentes.



Moreira et al. (2001) verificaram que as espécies de *Debaryomyces* e *Kluyveromyces* foram também capazes de assimilar a lactose, sugerindo que o iogurte é um bom substrato para o crescimento delas. A presença de leveduras que não fermentam a lactose nos iogurtes pode ser explicada pela concentração mais alta de sacarose adicionada a este produto.

Alguns autores relataram que as leveduras estão disponíveis em ambos os leites, tanto no cru (FOSTER et al., 1957; INGRAM, 1958; RANDOLPH et al., 1973; ENGEL, 1986a) como no pasteurizado (JONES; LANGLOIS, 1977; FLEET; MIAN, 1987; VADILLO et al., 1987).

Cousin (1982); Bishop; White (1986) revelaram que a população  $< 10^3$  UFC/mL é a mais relatada, mas ocasionalmente pode ocorrer contagem  $> 10^4$  UFC/mL. Tais leveduras desenvolvem em leite durante a refrigeração e reproduzem-se rapidamente como as bactérias psicotróficas.

Segundo Fleet; Mian (1987); Vadillo et al. (1987), a ocorrência freqüente de leveduras em leite pasteurizado sugere que elas tenham algum grau de tolerância para o processo de pasteurização.

### 3.6 - Conservantes

A conservação de alimentos tem por objetivo oferecer ao indivíduo produtos alimentícios não só dotados de qualidades nutritivas, sensoriais e de palatabilidade normais, como principalmente isentos de microrganismos nocivos e suas toxinas (EVANGELISTA, 2001).



A mesma é feita por meio de processos tecnológicos de processamento, ou seja, o uso do calor, frio, fermentação, aditivos e radiação. O emprego de conservadores químicos, que atuam como agentes antimicrobianos, protege os alimentos contra a contaminação por fungos, leveduras e bactérias (KIMBLE, 1977; LÜCK, 1977; MARSH, 1966; TFOUNI; TOLEDO, 2001).

Os conservantes podem ainda ser usados isoladamente ou combinados com os métodos físicos, complementando as técnicas de conservação (LÜCK, 1977; CHIPLEY, 1993; SOFOS, 1995).

Conforme a legislação brasileira em vigor, os conservantes alimentícios são definidos como “substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas” (BRASIL, 1988).

Os aditivos conservadores ou preservadores são substâncias que retardam os processos de deterioração de produtos alimentícios, protegendo-os contra a ação de microrganismos ou de enzimas. Com essa ação, proporcionam também o aumento da vida útil do alimento (EVANGELISTA, 2001).

As substâncias químicas com propriedades antimicrobianas adicionadas aos alimentos, processados ou não, podem também ser denominadas de conservantes. A sua função no alimento é inibir o crescimento e/ou desenvolvimento de microrganismos, aumentando a vida útil e garantindo o consumo com segurança (ARAÚJO, 1988; BRASIL, 1965).

Os aditivos mais utilizados no Brasil são o ácido benzóico e o sórbico e seus respectivos sais de sódio, cálcio e potássio (TFOUNI; TOLEDO, 2001).



Forsythe (2002) relatou que os agentes conservantes são necessários para garantir a manufatura segura de alimentos e a não deterioração destes durante toda a sua vida de prateleira. Vários são efetivos sob baixos pHs: ácido benzóico ( $\text{pH} < 4,0$ ), propiônico ( $\text{pH} < 5,0$ ) e sórbico ( $\text{pH} < 6,5$ ).

A legislação tem restringido o uso de conservantes, estimulando o uso de barreiras combinado com higiene; permitindo um nível pré-definido dessas substâncias em diferentes alimentos. Isso tem causado problemas às indústrias de alimentos, uma vez que alguns microrganismos têm aumentado sua resistência frente àqueles mais comumente utilizados. Um exemplo disso é demonstrado por estudos que têm identificado leveduras deteriorantes resistentes a conservantes de baixa acidez (PIPER et al., 1998).

A ação antimicrobiana é mais eficiente em alguns do que em outros casos, podendo ser tais aditivos empregados de acordo com cada evento: o ácido benzóico e seus sais são eficazes contra as leveduras e as bactérias; o propiônico e seus sais contra os fungos (esporos) e as bactérias (*Bacillus mesentericus*) e o sórbico e seus sais, contra os fungos, as leveduras e também as bactérias (EVANGELISTA, 2001).

Araújo (1988) relatou que a adição de conservadores aos alimentos, em concentrações aceitáveis, promove a inibição de microrganismos, até que os conservantes sejam eliminados por volatilização, metabolismo, degradação ou por meio de interações químicas com outros componentes do próprio alimento.

Diferentes tipos de conservantes são empregados, dependendo do alimento, método de processamento, armazenamento e do



microrganismo envolvido. O controle do crescimento e/ou desenvolvimento de microrganismos em alimentos por meio do uso de conservantes também está relacionado com o pH do meio. A forma não dissociada da molécula confere a característica antimicrobiana dos mesmos. Os valores de  $pK_a$  da maioria dos conservantes encontram-se na faixa de pH entre 3,0 e 5,0; portanto, a concentração da forma não dissociada aumenta com a elevação da acidez do alimento, garantindo uma maior eficiência no controle de microrganismos (ANTUNES; CANHOS, 1986).

Tfouni; Toledo (2001) ressaltam também que das diferentes propriedades de um produto alimentício, o pH é possivelmente a que mais influencia no aumento da ação antimicrobiana do conservante.

A não dissociação das moléculas facilita a penetração destas pela membrana celular dos microrganismos, sobre os quais ocorrerá a ação inibidora, alterando a permeabilidade dessa membrana, a atividade de enzimas intracelulares e o mecanismo genético (ARAÚJO, 1988).

A maioria dos conservantes alimentícios é efetiva em pHs ácidos. Os ácidos orgânicos incluem o acético, o propiônico, o sórbico e o benzóico. Esses compostos, quando em suas formas não dissociadas, são solúveis à membrana. No citoplasma, dissociam-se e há liberação de prótons. A expulsão dos prótons em solução forma um ácido fraco, o carbônico. Ele previne o crescimento de *Pseudomonas* em níveis menores que 5%, enquanto as bactérias ácido lácticas não são afetadas; por este motivo, as embalagens com atmosfera modificada alteram a biota deteriorante (FORSYTHE, 2002).



Tfouni; Toledo (2001) consideraram que as substâncias químicas utilizadas como aditivos alimentares são, muitas vezes, estranhas ao organismo humano, podendo, portanto, ser tóxicas, e seu emprego em alimentos só é permitido por meio de diversos fatores. Dentre eles a real necessidade tecnológica e, principalmente, o estabelecimento de seu uso em pHs baixos, o que favorece a atividade antimicrobiana dos ácidos minerais fracos, que são o nitrito e o sulfito, e de ácidos lipofólicos fracos, que são o sórbico, o benzóico e o propiônico (SOFOS, 1995).

Os ácidos fracos atuam preferencialmente inibindo os microrganismos, ao invés de matá-los, prolongando a fase de latência e prejudicando o transporte ativo (STRATFORD; ANSLOW, 1998).

O ácido sórbico foi isolado pela primeira vez em 1859 pelo químico alemão A. W. Von Hofmann, a partir do fruto de *Sorbus aucuparia* L. (SOFOS; BUSTA, 1993). Entretanto, foi apenas por volta de 1939 que sua ação antimicrobiana foi descoberta por E. Muller, na Alemanha e por C. M. Gooding, nos Estados Unidos.

Dentre os conservadores, o ácido sórbico é o único ácido orgânico insaturado produzido sinteticamente e permitido em alimentos. Em face de sua característica neutra no sabor, é recomendável para uso em sucos e bebidas. É eficaz no controle de bolores e leveduras e pouco eficiente no de bactérias. Ele é ligeiramente solúvel em água e o seu sal de potássio é bastante solúvel. O pH ótimo de atuação estende-se até pH = 6,0 (ARAÚJO, 1988).

O uso do ácido sórbico (INS - 200) é bastante divulgado, podendo ser utilizado puro, ou ainda como sais de sódio (INS - 201), cálcio (INS - 203) ou potássio (INS - 202).

Os sorbatos são eficientes principalmente contra bolores e leveduras, embora ajam também sobre uma ampla diversidade de bactérias (JAY, 2000). Podem inibir a germinação de esporos, o crescimento e a divisão de células vegetativas (SOFOS et al., 1986).

Seu emprego mundial é bastante amplo, devido ao fato de ele não interferir no sabor e ser fisiologicamente inócuo (LÜCK, 1977). A sua principal desvantagem é o custo relativamente maior que o dos benzoatos e propionatos. Portanto, em produtos de maior pH, eles são geralmente usados em quantidades menores que os outros dois conservadores, de modo a obter o efeito desejado (ROBACH, 1980).

Jay (2000) relatou que a resistência das bactérias lácticas aos sorbatos, especialmente em pH 4,5 ou maior, permite o uso destes como agente fungistático em produtos que sofrem fermentação láctica. Leitão (1991) diz que, em pH inferior a 4,0 (alimentos muito ácidos), a microbiota capaz de se desenvolver é constituída principalmente por bolores e leveduras, ao lado de bactérias acéticas e lácticas.

Segundo Lück (1977), as faixas de mínima concentração de inibição para os sorbatos variam de 10 a 10000 ppm para bactérias, 25 a 400 ppm para leveduras e 10 a 1000 ppm para fungos.

Hankin; Shields; Hanna (1980) analisaram 141 queijos cottage e 19 ricotas, no período de abril a junho de 1980 e avaliaram a qualidade



microbiológica, sensorial e a presença de substância química (sorbato). Das amostras de queijo cottage, a maioria apresentou qualidade sensorial e microbiológica boa. O uso do sorbato foi declarado em aproximadamente 11% das amostras, embora tenha sido encontrado em 23% das amostras deste queijo. Quanto às amostras de ricota, as qualidades sensorial e microbiológica estavam satisfatórias, e a presença do sorbato não foi declarada no rótulo, mas ocorreu em 2 amostras deste queijo.

O ácido propiônico apresenta a estrutura  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ , podendo ser usado nesta forma ou na de sais, em alimentos como pães, produtos de panificação, confeitaria, pickles e chocolates, com o limite na faixa de 0,20 a 0,40 g/100 g, expresso em ácido propiônico (FRANCO; LANDGRAF, 2003; EVANGELISTA, 2001).

Os sais são bastante hidrossolúveis, sendo sua eficiência marcante na inibição do desenvolvimento de bolores, embora, nas concentrações permitidas, tal fato não ocorra em relação às leveduras. Estas características os tornam conservadores ideais para serem adicionados na formulação de produtos de panificação, nos quais geralmente são empregados os fermentos biológicos. O sal de cálcio é o mais utilizado nestes produtos, pois fornece a suplementação de cálcio e uma melhor eficácia do fermento na liberação de  $\text{CO}_2$  (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

O propionato de cálcio (INS - 282), potássio (INS - 283) e sódio (INS - 281), como mencionados, são usados na concentração de 0,20% em massas semiprontas, recheadas ou não, para preparo de produtos forneáveis, doces ou salgados, com umidade superior a 15%, em mistura para produtos de



panificação e confeitaria, picles, pizzas, pastéis, empadas, polentas pré-embaladas e com umidade superior a 15%, produtos de confeitaria e de panificação.

A ação antimicrobiana desses compostos é similar à dos benzoatos e sorbatos. O pKa do propionato é 4,87 e em pH 4,0, 88% do composto encontra-se não dissociado. A molécula não dissociada desse ácido lipofílico é necessária para sua atividade antimicrobiana (FRANCO; LANDGRAF, 2003).

Segundo Lück (1977), no século XIX, começou-se a utilizar o ácido benzóico e seus derivados, que são de grande aplicação na indústria de alimentos e, posteriormente, os sais de ácido propiônico e sórbico. A tendência desses sais se dissociarem é baixa, fazendo com que sejam mais ativos em alimentos de baixa acidez (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Pode ser empregado puro ou como sais de sódio (INS - 211), cálcio (INS - 213) ou potássio (INS - 212).

O ácido benzóico apresenta atividade contra bolores, leveduras e bactérias, mostrando maior eficiência sobre bactérias e leveduras do que sobre bolores (KIMBLE, 1977; SOFOS, 1995). Entretanto, quando é usado em alimentos ácidos, atua principalmente na inibição de bolores e leveduras, apesar de que valores de pH < 4,5 são geralmente suficientes para prevenir o desenvolvimento bacteriano nesses produtos (CHIPLEY, 1993; JAY, 2000; WAGNER; MOBERG, 1989).

Segundo Forsythe (2002) os métodos de preservação usualmente empregados para controlar o crescimento de fungos são: altas



temperaturas para desnaturar os esporos, conservantes como os ácidos fracos e antimicrobiano como a natamicina.

A natamicina (INS - 235) é um antimicrobiano produzido por *Streptomyces natalenses*, usado para inibir o crescimento indesejado de fungos e leveduras. Além da importância do seu uso nas superfícies de queijos, é usado também nas de carnes processadas como salsichão seco. É usualmente efetiva em baixas concentrações, além de atuar no controle da produção de micotoxinas. Pode apresentar ligação com o ergosterol e outros ésteres. Sendo o ergosterol um componente principal das membranas de células fúngicas, com esta ligação poderá ocorrer o rompimento da membrana e o aumento da permeabilidade, causando a saída de constituintes essenciais da célula, abaixando o pH intracelular e causando a lise celular. É relativamente estável ao calor em suspensão aquosa neutra (50 - 100°C). Tem baixa solubilidade em água: 60 - 200 ppm. A estabilidade é afetada pela exposição à luz ultravioleta, valores extremos de pH, peróxidos, oxidantes, cloro e metais pesados. O pH ótimo é de 5 - 7; o pH ativo varia entre 3 - 9; sendo que em pH 3 - 5 ocorre aproximadamente 10% da perda de atividade; em pH < 3 e > 9 ocorre perda de atividade de aproximadamente 30%. As suas vantagens são: múltipla ação em diversos tipos de fungos, não desenvolve resistência, ativo em baixas concentrações (1 - 40 ppm), ativo também em pH 3 - 9 e sua ação é eficaz por período longo, sendo também estável quimicamente (FRANCO; LANDGRAF, 2003; NICOLAU; TSUKAHARA, [s.d.]).



## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Obtenção das amostras

Foram obtidas do comércio varejista da cidade de São José do Rio Preto - SP e região 26 (100,00%) amostras de ricota de diferentes marcas comerciais (Tabela 1), sendo acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor), contendo gelo e transportadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, para pronta análise (INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS - ICMSF, 1978).

### 4.2 - Preparo das amostras

No Laboratório, cada amostra recebeu um número de identificação. A seguir, assepticamente, 10 g da mesma foram triturados em almofariz, com auxílio de pistilo e colocados em um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de água destilada estéril (diluição  $10^{-1}$ ). A partir desta diluição, foram efetuadas as demais diluições decimais seriadas, até  $10^{-13}$ . As treze diluições obtidas foram utilizadas, conforme necessárias, nas análises subseqüentes (ICMSF, 1974).





#### 4.3 - Contagem de bactérias aeróbias mesófilas

Foi pipetado assepticamente 1 mL das diluições previamente preparadas e colocado em placas de Petri devidamente identificadas. Adicionou-se a seguir 15 mL de Ágar Padrão para Contagem. Depois da homogeneização, foram incubadas a 35°C por 48 horas e calculou-se as unidades formadoras de colônias - UFC (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 1992).

#### 4.4 - Enumeração de bolores e leveduras

Pipetou-se com assepsia 1 mL das diluições e distribuiu-se em placas de Petri identificadas. Foram adicionados 15 mL de Ágar Batata Dextrose acidificado com ácido tartárico a 10% (pH=4,0) com homogeneização e, após solidificação, incubou-se a 25°C por 5 dias. As UFC foram calculadas de acordo com as diluições (HARRIGAN; MC CANCE, 1976; ICMSF, 1978).

#### 4.5 - Contagem de *Staphylococcus aureus*

Semeou-se em duplicata, sobre a superfície do Ágar Telurito-Gema de Ovo, contido nas placas de Petri, 0,1 mL de cada diluição selecionada, com auxílio da alça de Drigalsky. O inóculo (0,1 mL) foi espalhado



cuidadosamente por toda a superfície do meio de cultura até a total absorção. Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas. Calculou-se, de acordo com as diluições, as UFC, que se apresentavam negras, brilhantes, convexas e rodeadas por zonas claras de 2 a 5 mm de diâmetro, submetendo-as também aos testes bioquímicos de confirmação, principalmente de termonuclease e coagulase (SPECK, 1976).

#### 4.6 - Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais

Inoculou-se três séries de três tubos de ensaio, contendo cada um deles 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose, com 1 mL das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Foram homogeneizados e incubados a 35°C durante 48 horas. O cálculo do Número Mais Provável de coliformes totais foi realizado com o auxílio da tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).

#### 4.7 - Determinação do NMP de coliformes fecais

Utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o Caldo EC. Depois da inoculação, os tubos foram incubados a 44,5°C durante 24 horas (BRASIL, 1991/1992). O cálculo do NMP de coliformes fecais foi efetuado com a ajuda da tabela de Hoskins (ICMSF, 1978).



#### 4.8 - Pesquisa de *Escherichia coli*

Uma alíquota dos tubos com Caldo EC, que apresentavam turbidez, com ou sem gás no interior do tubo de Durhan, foi semeada em placas de Petri com Ágar Eosina Azul de Metileno. As colônias suspeitas, que possuíam de 2 a 3 mm de diâmetro e se apresentavam azuis com centro negro e bordas claras à luz transmitida, e brilho metálico-esverdeado à luz refletida, foram identificadas, utilizando-se testes bioquímicos, principalmente Indol/Vermelho de Metila/Voges-Proskauer/Citrato - IMVIC (MARTH, 1978).

#### 4.9 - Pesquisa de *Salmonella* spp.

Em 225 mL de Caldo Lactosado e Água Peptonada a 1%, foram homogeneizados, respectivamente, 25 g de cada amostra. Os dois meios de cultura continham 0,5% de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (ICMSF, 1978). Após a incubação a 35°C por 24 horas, 1 mL de cada cultivo foi transferido para 10 mL de Caldo Tetrationato de Kauffmann e 10 mL de Caldo Selenito Cistina, que foram incubados respectivamente a 35 e 43°C.

Depois de 24, 48 e 120 horas, foram feitas inoculações, em placas de Petri com Ágar *Salmonella Shigella* e Ágar Verde Brilhante, sendo as colônias suspeitas submetidas a testes bioquímicos (semeadura em Ágar Tríplice Açúcar e Ferro, Ágar Lisina e Ferro, prova de urease, degradação do



malonato, desaminação da fenilalanina e descarboxilação da lisina) e sorológicos (MARTH, 1978; BRASIL, 1991/1992).

#### 4.10 - Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

Em 225 mL de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (LEB), foram adicionados 25 g de cada amostra, homogeneizados e incubados a 30°C, por 24 e 48 horas (MC CLAIN; LEE, 1989). Após o período de 24 horas, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e inoculada em Caldo de Enriquecimento Secundário Fraser (FRASER; SPERBER, 1988), que foi incubada a 35°C por 24 horas.

Simultaneamente após a incubação, uma alçada dos referidos caldos (LEB e FRASER) foi semeada por esgotamento diretamente em duas placas de Petri contendo Ágar Seletivo PALCAM - *Listeria* (VAN NETTER et al., 1989) e incubadas a 35°C, em sistema de microaerofilia, por 24 e 48 horas (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2001).

#### 4.11 - Isolamento das culturas de leveduras

Procurou-se selecionar todos os tipos morfológicos existentes, sendo que as colônias mais numerosas no Ágar Batata Dextrose acidificado foram isoladas em maior proporção, visando conhecer aquelas predominantes. Em seguida, cada cultura pura recebeu um código de identificação e foi estocada em tubos de ensaio de 12 x 100 mm, contendo meio

“Gymp” (glicose, extrato de levedura, extrato de malte,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e ágar), para posterior identificação, sendo coberta então com óleo mineral, para evitar ressecamento e mantida a  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ . Posteriormente todas as culturas foram re-espalhadas em Ágar Sabouraud-Glicose, de onde foi feita a descrição da morfologia colonial (cor, forma, elevação e brilho). Após essa descrição macroscópica, foi realizado um exame microscópico para a análise do tamanho, forma e outras características celulares, bem como para novamente constatar a pureza das culturas.

#### 4.12 - Provas taxonômicas

Nos testes taxonômicos (morfológicos e fisiológicos), foram empregados os métodos descritos por Kreeger Van Rij (1984); Barnett; Payne; Yarrow (1983 e 1990).

A identificação das culturas foi realizada segundo as chaves descritas por Barnett; Payne; Yarrow (1990); Kurtzman; Fell (1998).

##### 4.12.1 - Provas morfológicas

Para a verificação da produção de esporos, foram utilizados o meio de cultura de Gorodkova (glicose, peptona,  $\text{NaCl}$  e ágar) e o Ágar Acetato de McClary (glicose,  $\text{KCl}$ , extrato de levedura, acetato de sódio e



ágar). As placas de Petri foram mantidas à temperatura ambiente e as observações feitas periodicamente entre 7, 14 e 21 dias.

#### 4.12.2 - Provas fisiológicas

##### 4.12.2.1 - Capacidade fermentativa

Para verificar a capacidade fermentativa das culturas, foi utilizado o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura). O mesmo foi colocado em tubos de ensaio de 12 x 100 mm, contendo tubo de Durham invertido. As soluções de açúcares foram esterilizadas por filtração separadamente do meio de cultura.

Inicialmente foi testada a capacidade fermentativa frente à glicose na concentração de 1%. As culturas que apresentaram resultado positivo foram então avaliadas quanto à capacidade fermentativa dos dissacarídeos: sacarose (2%), maltose e lactose (ambas a 1%).

Os tubos de ensaio foram mantidos em temperatura ambiente, sendo as leituras feitas periodicamente entre 7 e 21 dias. Foi considerado resultado positivo quando 1/3 a 3/3 do tubo de Durham estava preenchido com gás e negativo quando não houve produção de gás (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).





#### 4.12.2.2 - Crescimento em diversas temperaturas

Analizou-se a capacidade de crescimento a 35, 40 e 42<sup>0</sup>C, utilizando-se o meio básico para fermentação (peptona e extrato de levedura), acrescido de 2,0% de glicose. Para a temperatura de 35<sup>0</sup>C, os tubos de ensaio foram mantidos em estufa de incubação e, para as demais, foi utilizado o banho-maria. As leituras foram feitas por meio do Cartão de Whickerham (KREEGER VAN RIJ, 1984), após 48-72 horas de incubação. Foi considerado crescimento positivo quando as linhas do cartão não foram visíveis e negativo quando estas foram visualizadas.

#### 4.12.2.3 - Crescimento em meio de cultura contendo nitrato

Foi utilizado o "Yeast Carbon Base" (YCB-Difco), contendo 0,078% de KNO<sub>3</sub> como fonte de nitrogênio e 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### 4.12.2.4 - Resistência à pressão osmótica

Neste teste, foram utilizadas duas substâncias distintas. O meio básico foi o Ágar Sabouraud-Glicose. Para os testes, foram acrescentados, respectivamente, 50% de glicose e 10% de NaCl (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).



4.12.2.5 - Crescimento em meio de cultura contendo cicloheximida (actidione)

Para esta prova, foi utilizado o "Yeast Nitrogen Base" (YNB-Difco) acrescido de 1,0% de glicose, 2,0% de ágar e alíquotas de cicloheximida que variaram de acordo com a concentração desejada (100 ou 1000 partes por milhão-ppm), segundo metodologia descrita por Kreeger Van Rij (1984).

#### 4.12.2.6 - Síntese de amido

Para a verificação da produção de compostos amilóides, foi utilizado o Ágar Sabouraud-Glicose. Após o crescimento das culturas, gotejou-se sobre as mesmas uma solução de lugol. O aparecimento de coloração azul escura indicará resultado positivo (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### 4.12.3 - Provas de assimilação de fontes de carbono

Foram utilizadas as seguintes substâncias: glicose, galactose, L-sorbose, maltose, sacarose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melezitose, inulina, amido solúvel, D-xilose, L-arabinose, D-arabinose, D-ribose, L-ramnose, etanol, glicerol, eritritol, ribitol (adonitol), galactitol (dulcitol), D-manitol, D-glucitol (sorbitol), salicina, citrato, m-inositol e glicosamina. Todas as



substâncias foram utilizadas na concentração de 0,5%, exceto a rafinose, que foi a 1,0%, acrescidas ao "Yeast Nitrogen Base" (YNB-Difco), mais 2,0% de ágar (KREEGER VAN RIJ, 1984; BARNETT; PAYNE; YARROW, 1983 e 1990).

#### 4.13 - Ensaio de resistência aos principais conservantes permitidos em alimentos

Para esta prova, foi utilizado o Ágar Sabouraud-Glicose, pH = 5,1; no qual foi acrescentado os conservantes alimentícios benzoato de sódio (código INS - 211) nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%; propionato de sódio (INS - 281) nas de 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6%; sorbato de potássio (INS - 202) nas de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4% e natamicina (INS - 235) nas de 0,002; 0,004 e 0,008%. Para verificar o desenvolvimento microbiano, foi utilizado como controle o mesmo meio de cultura, porém sem a adição de conservante.

Para esta avaliação, o pH do meio foi ajustado para 5,1, porque é o médio encontrado para este produto e também porque neste valor se obtém uma ótima atividade antimicrobiana dos conservantes empregados. Foram também esterilizados separadamente, por autoclavagem ou filtração em membrana Millipore (0,45 nm), o meio básico (sem o ágar), o ágar e os conservantes, para se evitar, em primeiro lugar, a hidrólise do ágar durante o aquecimento, com a perda do poder de gelificação, e ainda com relação aos conservantes utilizados, eventuais perdas por hidrólise ou evaporação.



#### 4.14 - Prova de sensibilidade ao tratamento térmico (63°C/30 min.)

Neste teste, as respectivas culturas puras isoladas foram previamente inoculadas em tubos de ensaio, contendo Caldo Nutriente e incubadas a 25°C por 24 horas. Depois desse período, tais tubos foram aquecidos à temperatura de 63°C por 30 minutos em banho-maria, simulando um processo de pasteurização do tipo baixa temperatura, por longo tempo. Após o tratamento térmico, as leveduras foram então semeadas em placas de Petri com Ágar Nutriente, com posterior incubação a 25°C. As leituras foram feitas após 5 dias de incubação.

#### 4.15 - Técnica de "replica-plate"

A técnica de "replica-plate" foi utilizada para as provas descritas nos itens 4.12.1, 4.12.2.3 a 4.12.2.6, 4.12.3, 4.13 e 4.14.

Para o inóculo, culturas de 24-48 horas em meio "Gymp", exceto para os itens 4.13 e 4.14, foram transferidas e pré-incubadas, durante 3 a 5 dias, em temperatura ambiente em "Yeast Nitrogen Base" (YNB-Difco) líquido contendo 0,1% de glicose, sendo agitadas periodicamente para o consumo do endógeno. A partir daí, cada inóculo foi transferido assepticamente para um sistema "replica-plate multitipped", que permite a inoculação de 25 colônias/placa de Petri (LEDERBERG; LEDERBERG, 1952; SHEREE LIN; FUNG; COX, 1987).



**5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO** Todas as placas de Petri foram incubadas em estufa a 25°C, com leituras de 7, 14 e 21 dias de incubação, excetuando-se o item 4.14.

### 5.1 - Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados das análises microbiológicas foram avaliados de acordo com os padrões estabelecidos na legislação em vigor (BRASIL, 2001), para bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes totais, nestas análises as amostras foram também submetidas a análises para a verificação da qualidade e diversidade microbiana, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 1. Os resultados das análises microbiológicas foram avaliados de acordo com os padrões estabelecidos na legislação em vigor (BRASIL, 2001), para bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes totais, nestas análises as amostras foram também submetidas a análises para a verificação da qualidade e diversidade microbiana, sendo que os resultados são apresentados na Tabela 1.

Com relação à contagem de bactérias aeróbias mesófilas, das amostras analisadas, encontrou-se um crescimento: 1 amostra (3,85%) que apresentou o valor  $< 10$ ; 2 (7,69%)  $1,5 \times 10^1$  a  $3,2 \times 10^1$ ; 5 (19,23%)  $8,9 \times 10^1$  a  $2,9 \times 10^2$ ; 3 (11,54%)  $2,4 \times 10^2$  a  $6,6 \times 10^2$ ; 8 (30,77%) de  $1,4 \times 10^3$  a  $9,2 \times 10^3$  e 7 (26,92%) de  $1,0 \times 10^4$  a  $2,6 \times 10^4$  UFC/g.

Cossadue et al. (1997) revelaram que, em 32 amostras de alimentos, a contagem de bactérias aeróbias mesófilas variou de  $< 10$  a  $2,6 \times 10^4$  UFC/g, sendo que 14 amostras (43,80%) de  $< 5 \times 10^1$  UFC/g, em 6 (18,80%) de  $> 5 \times 10^1$  a  $2,6 \times 10^4$  UFC/g.

## 5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 - Análises microbiológicas

Os resultados das análises microbiológicas efetuadas estão apresentados na Tabela 1.

Independentemente da existência de padrão microbiológico na legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2001), para bactérias aeróbias mesófilas, bolores e leveduras e coliformes totais, nestes produtos, as amostras foram também submetidas a estas análises para a verificação da qualidade e diversidade microbiana, bem como das condições higiênico-sanitárias do alimento, que muito provavelmente, poderão refletir as da matéria-prima, do ambiente de trabalho e do pessoal. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas variou de  $< 10$  a  $2,6 \times 10^{12}$  UFC/g, a de bolores e leveduras, de  $2,5 \times 10^3$  a  $2,8 \times 10^{12}$  UFC/g e o Número Mais Provável de coliformes totais, de  $< 3$  a  $> 1100$  NMP/g.

Com relação à contagem de bactérias aeróbias mesófilas das amostras analisadas, encontra-se em ordem crescente: 1 amostra (3,85%) que apresentava o valor  $< 10$ ; 2 (7,69%)  $1,5 \times 10^5$  a  $3,2 \times 10^5$ ; 5 (19,23%)  $8,9 \times 10^6$  a  $9,9 \times 10^8$ ; 3 (11,54%)  $2,4 \times 10^{10}$  a  $6,5 \times 10^{10}$ ; 8 (30,77%) de  $1,4 \times 10^{11}$  a  $9,2 \times 10^{11}$  e 7 (26,92%) de  $1,0 \times 10^{12}$  a  $2,6 \times 10^{12}$  UFC/g.

Cosseddu et al. (1997) revelaram que, em 32 amostras de ricotas, a contagem de bactérias aeróbias mesófilas resultou nos seguintes valores: 14 amostras (43,80%) de  $\leq 5 \times 10^4$  UFC/g, em 6 (18,80%) variaram de  $>$



$5 \times 10^4$  a  $10^5$  UFC/g; em 2 (6,30%) variaram de  $> 5 \times 10^5$  a  $10^6$  UFC/g e em 10 (31,30%) foram  $> 10^6$  UFC/g, enquanto Fadda et al. (1989) relataram, em 10 amostras de ricotas frescas e 5 amostras de ricotas com sal, a contagem destas bactérias com os valores  $< 10^9$  UFC/g e  $> 10^9$  UFC/g, respectivamente.

Uma melhor qualidade da matéria prima e o uso de Boas Práticas de Fabricação (BPF), são alguns dos aspectos que podem ter colaborado na obtenção, para a amostra 1, de baixas contagens de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, assim como a ausência de patógenos.

Os resultados encontrados foram similares aos relatados por outros autores em relação a contagem de bolores e leveduras.

Sakate; Santos; Brandão (1998) relataram em seu estudo de 20 amostras de ricotas que 17 apresentavam contagem de bolores e leveduras acima de  $1,0 \times 10^7$  UFC/g, sendo este resultado semelhante as 12 amostras de ricotas que foram estudadas por Bachmann et al. (2002) na variação de  $1,0 \times 10^7$  a  $2,4 \times 10^7$  UFC/g.

Com relação à contagem de bolores e leveduras deste estudo 53,85% das amostras analisadas apresentaram valores compreendidos entre  $10^7$  a  $10^9$ , entretanto 96,15% das mesmas apresentaram contagem  $> 10^5$ , enquanto que Cosentino et al. (2001) obtiveram contagem para leveduras  $> 10^5$  somente em 3,1% das amostras analisadas.

Nakase; Komagata (1977) verificaram que, nas pesquisas realizadas com 12 amostras de queijos importados da América do Norte e Europa, 5 (41,66%), apresentaram contagem de leveduras entre  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g.



Das 23 amostras de queijo Cheddar da Austrália e 19 amostras de Cottage analisadas por Fleet; Mian (1987) 11 (48,00%) apresentaram contagem de leveduras entre  $10^4$  a  $10^6$  UFC/g e 7 (37,00%), entre  $10^5$  a  $10^7$  UFC/g, respectivamente.

De acordo com a Tabela 1, o Número Mais Provável para coliformes totais variou de  $< 3$  a  $> 1100$  NMP/g, sendo que 16 (61,54%) das amostras apresentaram contaminação acima de 1100 NMP/g. As altas contagens de coliformes totais indicam geralmente contaminação pós-processamento, limpeza e sanitização inadequadas ou o conjunto destes fatores.

Os resultados da qualidade microbiológica obtidos por Sakate; Santos; Brandão (1998); Raimundo et al. (2002); Rangel; Ornelas; Silva (2002) referentes aos coliformes totais acima do limite permitido pela lei vigente foram 17 amostras (85,00%), 3 (75,00%) e 27 (45,00%), respectivamente.

As elevadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas podem geralmente indicar matérias-primas excessivamente contaminadas, limpeza e desinfecção inadequadas de superfícies e higiene insuficiente na produção ou a combinação destas circunstâncias. As altas contagens de bactérias aeróbias mesófilas e de bolores e leveduras, obtidas para a amostra 23, poderão estar relacionadas a esses fatores, apesar da mesma não ter sido contaminada por patogênicos.

De acordo com a Tabela 1, o Número Mais Provável para coliformes fecais variou de  $< 3$  a 460 NMP/g. Considerando o padrão vigente para coliformes fecais neste tipo de produto de  $5 \times 10^2$  ou  $5 \times 10^3$ , todas as amostras (100,00%) atendiam ao padrão estabelecido pela legislação. Essa porcentagem



foi superior aos 25,00% e 75,00% obtidos, respectivamente, por Raimundo et al. (2002); Sakate; Santos; Brandão (1998).

Foi constatada e/ou confirmada a presença de *Escherichia coli* em 16 amostras, representadas pelos números 2, 5 a 8, 11 a 18, 20 a 21 e 26 (61,54%). Os resultados do IMVIC, para os microrganismos desses produtos, foram os seguintes: indol (+), vermelho de metila (+), Voges-Proskauer (-) e citrato (-).

Como a legislação federal (BRASIL, 2001) estabelece para *Staphylococcus aureus* padrão de  $5 \times 10^2$  ou  $10^3$  UFC/g, as amostras de números 2 a 9, 11 a 22 e de 24 a 26 (88,46%) foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias” e portanto “produtos impróprios para o consumo humano” (Tabela 1). Os microrganismos destas amostras apresentaram também resultados típicos aos testes bioquímicos empregados.

O *Staphylococcus aureus* pode ser transmitido ao alimento pelo manipulador, uma vez que possui como habitat as cavidades nasais, mãos, boca e outras regiões do corpo humano (ICMSF, 1978; ICMSF, 1980). Portanto o manipulador de alimentos portador de *S. aureus* enterotoxigênico representa um importante elo na cadeia epidemiológica dos surtos de doenças veiculadas por alimentos (PEREIRA et al., 1999b).

O resultado deste estudo foi, como esperado, similar aquele obtido por Carnicel et al. (2002), que analisaram amostras de ricotas e observaram que 86,96% delas apresentavam *Staphylococcus aureus* acima do limite permitido, estando portanto em desacordo com o padrão estabelecido na legislação vigente.





A quantidade de toxina necessária para provocar doença de origem alimentar é produzida por  $10^5$  microrganismos por grama de alimento (FORSYTHE, 2002). Neste estudo, 14 (53,85%) das 26 amostras analisadas apresentaram valores iguais ou maiores que  $10^5$ , representando assim um risco potencial à saúde dos consumidores.

Resultados similares obtidos neste trabalho foram relatados por Bachmann et al. (2002) que encontraram *Staphylococcus aureus* com média de  $3,3 \times 10^7$  UFC/g, em 12 amostras de ricotas analisadas. Resultados inferiores foram observados quando comparados aos de Lodi et al. (1999). Segundo estes, de 33 amostras de ricotas analisadas, em apenas 1 (3,03%) verificaram a presença de *Staphylococcus aureus* no valor de  $2,0 \times 10^2$  UFC/g. Carminati et al. (2002) obtiveram *Staphylococcus aureus* em quantidade inferior a 10 UFC/g em 11 amostras de ricotas analisadas na região da Lombardia. As contagens não elevadas, poderão estar relacionadas a diferentes fatores, ou seja, incentivos governamentais, melhor qualidade do leite, contaminação menor, temperatura do ambiente de processo, higiene no processamento e emprego de menor temperatura no armazenamento.

Travassos; Medeiros; Manguiera (2001); Cosseddu et al. (1997) não encontraram, apesar de realidades diferentes, *Staphylococcus aureus* em nenhuma das amostras por eles analisadas.

A presença de *Salmonella* spp. não foi constatada e/ou confirmada em nenhuma das 26 (100,00%) amostras analisadas, o que está de acordo com o padrão de ausência em 25 g estabelecido na legislação (BRASIL, 2001).



Nas 26 amostras analisadas (100,00%), também não foi constatada a presença de *Listeria monocytogenes*.

Os resultados obtidos neste trabalho, com relação, respectivamente, *Staphylococcus aureus*, a coliformes fecais, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, foram maiores, menores e/ou iguais àqueles de Rangel; Ornelas; Silva (2002).



Tabela 1. Qualidade microbiológica das amostras de ricota de diferentes marcas comerciais.

| Amostra<br>nº.                                | Bactérias<br>aeróbias<br>mesófilas<br>( UFC/g ) | Bolores<br>e<br>leveduras<br>( UFC/g ) | <i>Staphylococcus<br/>aureus</i><br>( UFC/g ) | Coliformes<br>totais<br>( NMP/g ) | Coliformes<br>fecais<br>( NMP/g ) | <i>Escherichia<br/>coli</i><br>( confirmativo ) | <i>Salmonella</i><br>spp.<br>( -/+ ) | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i><br>( -/+ ) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|
| 1                                             | < 10                                            | $2,5 \times 10^3$                      | < 100                                         | < 3                               | < 3                               | -                                               | -                                    | -                                            |
| 2                                             | $3,1 \times 10^8$                               | $4,4 \times 10^6$                      | $1,5 \times 10^5$                             | > 1100                            | 150                               | +                                               | -                                    | -                                            |
| 3                                             | $2,4 \times 10^{10}$                            | $1,0 \times 10^9$                      | $3,2 \times 10^5$                             | 1100                              | < 3                               | -                                               | -                                    | -                                            |
| 4                                             | $6,5 \times 10^{10}$                            | $2,7 \times 10^7$                      | $5,0 \times 10^3$                             | 4                                 | < 3                               | -                                               | -                                    | -                                            |
| 5                                             | $5,4 \times 10^{10}$                            | $1,7 \times 10^8$                      | $2,1 \times 10^5$                             | > 1100                            | 15                                | +                                               | -                                    | -                                            |
| 6                                             | $5,9 \times 10^{11}$                            | $5,7 \times 10^6$                      | $8,3 \times 10^3$                             | 120                               | 39                                | +                                               | -                                    | -                                            |
| 7                                             | $1,9 \times 10^{12}$                            | $8,4 \times 10^8$                      | $6,8 \times 10^3$                             | 1100                              | 4                                 | +                                               | -                                    | -                                            |
| 8                                             | $3,3 \times 10^8$                               | $1,6 \times 10^7$                      | $4,2 \times 10^4$                             | > 1100                            | 11                                | +                                               | -                                    | -                                            |
| 9                                             | $5,1 \times 10^{11}$                            | $9,0 \times 10^8$                      | $7,4 \times 10^5$                             | < 3                               | < 3                               | -                                               | -                                    | -                                            |
| 10                                            | $3,2 \times 10^5$                               | $2,4 \times 10^5$                      | < 100                                         | > 1100                            | < 3                               | -                                               | -                                    | -                                            |
| 11                                            | $1,4 \times 10^{11}$                            | $2,6 \times 10^9$                      | $6,0 \times 10^5$                             | > 1100                            | 4                                 | +                                               | -                                    | -                                            |
| 12                                            | $1,3 \times 10^{12}$                            | $2,2 \times 10^{10}$                   | $9,5 \times 10^5$                             | > 1100                            | 210                               | +                                               | -                                    | -                                            |
| 13                                            | $1,5 \times 10^{12}$                            | $2,4 \times 10^{10}$                   | $9,2 \times 10^3$                             | > 1100                            | 460                               | +                                               | -                                    | -                                            |
| Padrão Federal<br>(Brasil, 2001) <sup>a</sup> |                                                 |                                        | $5 \times 10^2$                               |                                   | $5 \times 10^2$                   |                                                 | ausência em<br>25 g                  | ausência em<br>25 g                          |
| Padrão Federal<br>(Brasil, 2001) <sup>b</sup> |                                                 |                                        | $10^3$                                        |                                   | $5 \times 10^3$                   |                                                 | ausência em<br>25 g                  | ausência em<br>25 g                          |

<sup>a</sup> de muito alta umidade: umid. 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, minas frescal, mussarela (mozzarella, muzzarella) e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas.

(continua)

<sup>b</sup> de muito alta umidade: umid. 55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluído o Minas frescal correspondente.



**Tabela 1. Qualidade microbiológica das amostras de ricota de diferentes marcas comerciais ( continuação ).**

| Amostra<br>n°.                                | Bactérias<br>aeróbias<br>mesófilas<br>( UFC/g ) | Bolores<br>e<br>leveduras<br>( UFC/g ) | <i>Staphylococcus<br/>aureus</i><br>( UFC/g ) | Coliformes<br>totais<br>( NMP/g ) | Coliformes<br>termotolerantes<br>( NMP/g ) | <i>Escherichia<br/>coli</i><br>( confirmativo ) | <i>Salmonella</i><br>spp.<br>( -/+ ) | <i>Listeria<br/>monocytogenes</i><br>( -/+ ) |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------------|
| 14                                            | $4,7 \times 10^{11}$                            | $1,4 \times 10^{10}$                   | $3,6 \times 10^4$                             | > 1100                            | 210                                        | +                                               | -                                    | -                                            |
| 15                                            | $9,9 \times 10^8$                               | $3,0 \times 10^6$                      | $7,2 \times 10^5$                             | > 1100                            | 9                                          | +                                               | -                                    | -                                            |
| 16                                            | $9,2 \times 10^{11}$                            | $2,9 \times 10^8$                      | $4,5 \times 10^7$                             | > 1100                            | 240                                        | +                                               | -                                    | -                                            |
| 17                                            | $4,0 \times 10^{11}$                            | $1,6 \times 10^7$                      | $1,2 \times 10^6$                             | > 1100                            | 11                                         | +                                               | -                                    | -                                            |
| 18                                            | $1,0 \times 10^{12}$                            | $5,8 \times 10^9$                      | $3,8 \times 10^6$                             | > 1100                            | 20                                         | +                                               | -                                    | -                                            |
| 19                                            | $1,9 \times 10^{11}$                            | $4,3 \times 10^8$                      | $1,1 \times 10^7$                             | > 1100                            | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
| 20                                            | $1,5 \times 10^5$                               | $1,3 \times 10^7$                      | $2,7 \times 10^3$                             | 9                                 | 4                                          | +                                               | -                                    | -                                            |
| 21                                            | $2,6 \times 10^{12}$                            | $2,8 \times 10^{12}$                   | $1,5 \times 10^6$                             | > 1100                            | 20                                         | +                                               | -                                    | -                                            |
| 22                                            | $1,5 \times 10^{12}$                            | $2,8 \times 10^{11}$                   | $1,1 \times 10^4$                             | 43                                | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
| 23                                            | $9,0 \times 10^{11}$                            | $4,3 \times 10^{11}$                   | < 100                                         | < 3                               | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
| 24                                            | $7,6 \times 10^8$                               | $5,1 \times 10^5$                      | $7,4 \times 10^6$                             | > 1100                            | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
| 25                                            | $8,9 \times 10^6$                               | $1,1 \times 10^7$                      | $7,3 \times 10^4$                             | 11                                | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
| 26                                            | $1,5 \times 10^{12}$                            | $3,3 \times 10^9$                      | $6,7 \times 10^7$                             | > 1100                            | 21                                         | +                                               | -                                    | -                                            |
| Variação                                      | < 10                                            | $2,5 \times 10^3$                      | < 100                                         | < 3                               | < 3                                        | -                                               | -                                    | -                                            |
|                                               | a                                               | a                                      | a                                             | a                                 | a                                          | a                                               |                                      |                                              |
|                                               | $2,6 \times 10^{12}$                            | $2,8 \times 10^{12}$                   | $6,7 \times 10^7$                             | > 1100                            | 460                                        | +                                               |                                      |                                              |
| Padrão Federal<br>(Brasil, 2001) <sup>a</sup> |                                                 |                                        | $5 \times 10^2$                               |                                   | $5 \times 10^2$                            |                                                 | ausência em<br>25 g                  | ausência em<br>25 g                          |
| Padrão Federal<br>(Brasil, 2001) <sup>b</sup> |                                                 |                                        | $10^3$                                        |                                   | $5 \times 10^3$                            |                                                 | ausência em<br>25 g                  | ausência em<br>25 g                          |

<sup>a</sup> de muito alta umidade: umid. 55%, incluindo os queijos de coalho com umidade correspondente, minas frescal, mussarela (mozzarella, muzzarella) e outros, elaborados por coagulação enzimática, sem a ação de bactérias lácticas.

<sup>b</sup> de muito alta umidade: umid. 55%, com bactérias lácticas abundantes e viáveis, incluído o Minas frescal correspondente.

## 5.2 - Isolamento das leveduras

Das 26 amostras de ricotas analisadas, foram isoladas 82 leveduras, sendo tais microrganismos submetidos aos testes taxonômicos, apresentados na Tabela 2.

Estas foram divididas, de acordo com a discordância em alguns dos resultados em relação à descrição padrão, em 12 grupos (Tabela 3), todos eles contendo leveduras do gênero *Debaryomyces*, com duas espécies distintas: *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* e *Debaryomyces vanriijae* var. *vanriijia*.

Do total de leveduras isoladas (100,00%), verificou-se que 80 (97,56%) representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* estavam contidas nos grupos I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, X, XI e XII e 2 (2,44%) por *Debaryomyces vanriijae* var. *vanriijia* contida no grupo IX.

As mesmas apresentaram discordâncias em alguns dos resultados, em relação à descrição padrão, conforme demonstra a Tabela 2. As leveduras dos grupos I, IV, V, VII, VIII, X e XII diferiram da descrição padrão tanto por assimilarem m-inositol e nitrato bem como se desenvolverem à 40°C. O grupo II diferiu da descrição padrão por assimilar m-inositol e nitrato, por desenvolver-se à 40°C e apresentar colônia "pink". O III diferiu da descrição padrão por não assimilar ribitol e manitol, assimilar m-inositol e nitrato e desenvolver-se à 40°C. O VI diferiu da descrição padrão por não assimilar manitol, assimilar m-inositol e nitrato e desenvolver-se à 40°C. O IX diferiu da descrição padrão por assimilar





lactose, m-inositol e nitrato e desenvolver-se à 40°C. O XI diferiu da descrição padrão por não assimilar maltose, assimilar m-inositol e nitrato e desenvolver-se à 40°C.

Cosentino et al. (2001) em estudo das propriedades bioquímicas das *Debaryomyces hansenii*, relataram boa tolerância ao NaCl, apresentando habilidade para crescer em baixas temperaturas e assimilar lactose, lactato e citrato.

Cosentino et al. (2001) isolaram colônias de leveduras em 160 amostras de queijos feitos com leite de ovelha da região da Sardenha, sendo 56 amostras de ricotas, 40 de feta, 32 de pecorino e 32 de caciotta. Foi caracterizada a capacidade de fermentar ou assimilar a lactose, a glicose, a galactose, o lactato, o citrato e o ácido láctico. Os resultados mostraram que as 281 linhagens isoladas pertenciam a 16 gêneros e 25 espécies, sendo que a levedura isolada dominante (28,80%) foi representada por *Debaryomyces hansenii*. Nas 56 amostras, somente de ricotas, isolaram 75 colônias de leveduras pertencentes aos seguintes gêneros e espécies: 5 colônias de *C. catenulata* (6,67%), 1 de *C. intermedia* (1,33%), 1 de *C. maltosa* (1,33%), 1 de *C. zeylanoides* (1,33%), 2 de *Cryptococcus albidus* (2,67%), 3 de *Cry. laurentii* (4,00%), 15 de *D. hansenii* (20,00%), 1 de *Dek. bruxellensis* (1,33%), 1 de *Endomyces* spp. (1,33%), 6 de *Geotrichum candidum* (8,00%), 4 de *K. lactis* (5,34%), 9 de *K. marxianus* (12,00%), 9 de *Pichia fermentans* (12,00%), 6 de *P. membranaefaciens* (8,00%), 6 de *R. rubra* (8,00%), 1 de *S. cerevisiae* (1,33%), 2 de *Sporobolomyces roseus* (2,67%) e 2 de *Trichosporon* spp. (2,67%).



Das espécies representadas por *Debaryomyces hansenii* (COSENTINO et al., 2001), foi constatado o crescimento de 48 (59,00%) das 81 leveduras em NaCl a 10%. No entanto, os resultados obtidos em neste estudo indicaram que as linhagens foram representadas por 90,24% de *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*.

Com relação à classificação, verificou-se que o percentual das linhagens isoladas, neste trabalho, representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* foi 97,56%, sendo superior aos 84,17% obtido por Coelho (2001), 54,84% por Silva (2003) e 8,70% por Mansor (2001).

Os resultados obtidos neste trabalho (97,56%) também foram superiores aos encontrados por Cosentino et al. (2001).

Nakase; Komagata (1977) em pesquisas realizadas em 12 amostras de queijos importados, constataram que, das espécies isoladas, as predominantes foram *Debaryomyces hansenii* e *Candida lipolytica*.

Neste trabalho também constatou-se a importância das leveduras da espécie *Debaryomyces hansenii*, com relação a sua difusão e particulares características bioquímicas. Seu uso como iniciador de cultura, especialmente para produção de queijos, também tem sido proposto por muitos autores (DEIANA et al., 1984; FATICHENTI et al., 1983).

Ikemiya; Yasumi (1973) como anteriormente citado relataram um bom crescimento de *Debaryomyces hansenii* na superfície de queijos processados. A determinação por julgamento subjetivo da deterioração do queijo ocasionada por leveduras durante a maturação é complicada, podendo ser maléfica ou benéfica à qualidade do produto (FLEET, 1990).

Tabela 2. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras.

| Provas/Grupos  | I | II | III | IV | V | VI |
|----------------|---|----|-----|----|---|----|
| Pigmento       | C | P  | C   | C  | C | C  |
| Esporos        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| F. glicose     | - | -  | -   | -  | - | -  |
| F. maltose     | - | -  | -   | -  | - | -  |
| F. sacarose    | - | -  | -   | -  | + | -  |
| F. lactose     | - | -  | -   | -  | - | -  |
| Glicose        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Galactose      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| L-sorbose      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Glicosamina    | + | +  | +   | +  | + | +  |
| D-ribose       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| D-xilose       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| L-arabinose    | + | +  | +   | +  | + | +  |
| D-arabinose    | + | +  | +   | +  | + | +  |
| L-ramnose      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Sacarose       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Maltose        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| D-trealose     | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Celobiose      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Salicina       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Melibiose      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Lactose        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Rafinose       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Melezitose     | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Inulina        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Amido solúvel  | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Glicerol       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Eritritol      | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Ribitol        | + | +  | -   | +  | + | +  |
| D-glucitol     | + | +  | +   | +  | + | +  |
| D-manitol      | + | +  | -   | +  | + | -  |
| Galactitol     | + | +  | +   | +  | + | +  |
| M-inositol     | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Citrato        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Etanol         | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Nitrato        | + | +  | +   | +  | + | +  |
| T = 35°C       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| T = 40°C       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| T = 42°C       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Ciclo.100 ppm  | + | +  | -   | -  | - | -  |
| Ciclo.1000 ppm | + | +  | +   | -  | - | +  |
| Glicose 50%    | + | +  | +   | +  | + | +  |
| NaCl 10%       | + | +  | +   | +  | + | +  |
| Sínt. amido    | - | -  | -   | -  | - | -  |

Legenda: C = creme; P = "pink"; F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido  
 (\*) não se desenvolveram em NaCl 10% = R19,1; R19,2; R21,8; R21,9; R21,10 e R24,1.

(continua)



Tabela 2. Resultados das provas morfológicas, fisiológicas e de assimilação apresentados pelas leveduras (continuação).

| Provas/Grupos  | VII | VIII | IX | X | XI | XII |
|----------------|-----|------|----|---|----|-----|
| Pigmento       | C   | C    | C  | C | C  | C   |
| Esporos        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| F. glicose     | -   | -    | -  | - | -  | -   |
| F. maltose     | -   | -    | -  | - | -  | -   |
| F. sacarose    | -   | +    | -  | - | -  | -   |
| F. lactose     | -   | -    | -  | - | -  | -   |
| Glicose        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Galactose      | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| L-sorbose      | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| Glicosamina    | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| D-ribose       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| D-xilose       | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| L-arabinose    | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| D-arabinose    | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| L-ramnose      | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Sacarose       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Maltose        | +   | +    | +  | + | -  | +   |
| D-trealose     | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Celobiose      | +   | +    | +  | - | +  | +   |
| Salicina       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Melibiose      | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Lactose        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Rafinose       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Melezitose     | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Inulina        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Amido solúvel  | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Glicerol       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Eritritol      | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Ribitol        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| D-glucitol     | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| D-manitol      | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Galactitol     | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| M-inositol     | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Citrato        | +   | +    | -  | + | +  | +   |
| Etanol         | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Nitrato        | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| T = 35°C       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| T = 40°C       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| T = 42°C       | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| Ciclo.100 ppm  | +   | +    | +  | + | +  | -   |
| Ciclo.1000 ppm | -   | +    | +  | + | +  | +   |
| Glicose 50%    | +   | +    | +  | + | +  | +   |
| NaCl 10%       | +   | +    | +  | - | -  | +   |
| Sínt. amido    | -   | -    | -  | - | -  | -   |

Legenda: C = creme; P = "pink"; F. = fermentação de; Ciclo = cicloheximida e Sínt. amido = Síntese de amido.



Tabela 3. Frequência relativa do gênero de leveduras isoladas.

| Grupo | Gênero / Espécie             | Código das leveduras                                                                                                                                                                      | Número de culturas | Porcentagem (n = 82) |
|-------|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
| I     | <i>Debaryomyces hansenii</i> | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R5 <sub>1</sub> ; R5 <sub>2</sub> ; R11 <sub>3</sub> ; R12 <sub>2</sub> ; R13 <sub>1</sub> ; R13 <sub>2</sub> ; R13 <sub>3</sub> ;  | 40                 | 48,78%               |
|       | var. <i>fabryii</i>          | R14 <sub>3</sub> ; R17 <sub>1</sub> ; R17 <sub>2</sub> ; R18 <sub>1</sub> ; R18 <sub>3</sub> ; R19 <sub>1</sub> ; R19 <sub>2</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>1</sub> ;                |                    |                      |
|       |                              | R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>7</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>7</sub> ; R23 <sub>10</sub> ; R23 <sub>13</sub> ; R24 <sub>1</sub> ; R24 <sub>2</sub> ;              |                    |                      |
|       |                              | R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>5</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R24 <sub>9</sub> ; R24 <sub>10</sub> ; R25 <sub>1</sub> ;               |                    |                      |
|       |                              | R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R26 <sub>3</sub> .                                                                                                                                  |                    |                      |
| II    | <i>Debaryomyces hansenii</i> | R1 <sub>3</sub> .                                                                                                                                                                         | 01                 | 1,22%                |
|       | var. <i>fabryii</i>          |                                                                                                                                                                                           |                    |                      |
| III   | <i>Debaryomyces hansenii</i> | R12 <sub>1</sub> .                                                                                                                                                                        | 01                 | 1,22%                |
|       | var. <i>fabryii</i>          |                                                                                                                                                                                           |                    |                      |
| IV    | <i>Debaryomyces hansenii</i> | R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R11 <sub>1</sub> ; R11 <sub>2</sub> ; R12 <sub>4</sub> ; R21 <sub>9</sub> ; | 19                 | 23,17%               |
|       | var. <i>fabryii</i>          | R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R23 <sub>12</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>8</sub> ; ; R26 <sub>1</sub> ; R26 <sub>2</sub> .             |                    |                      |

Legenda: RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.

(continua)

Tabela 3. Frequência relativa do gênero de leveduras isoladas (continuação).

| Grupo | Gênero / Espécie                                     | Código das leveduras                                                        | Número de culturas | Porcentagem (n = 82) |
|-------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------|
| VI    | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R12 <sub>3</sub> .                                                          | 01                 | 1,22%                |
| VII   | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R25 <sub>7</sub> . | 04                 | 4,88%                |
| VIII  | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R18 <sub>2</sub> .                                                          | 01                 | 1,22%                |
| IX    | <i>Debaryomyces vanriijiae</i> var. <i>vanriijia</i> | R14 <sub>1</sub> ; R14 <sub>2</sub> .                                       | 02                 | 2,44%                |
| X     | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R16 <sub>1</sub> .                                                          | 01                 | 1,22%                |
| XI    | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R17 <sub>3</sub> .                                                          | 01                 | 1,22%                |
| XII   | <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>     | R23 <sub>6</sub> .                                                          | 01                 | 1,22%                |

Legenda: RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.

### 5.3 - Resistência aos principais conservantes permitidos em alimentos

#### 5.3.1 - Benzoato de sódio (INS - 211)

Apesar de não ser um conservante específico para ricota, segundo a legislação vigente, na concentração de 0,2%, poderá ser empregado em queijo fundido.

A Tabela 4 apresenta as leveduras sensíveis a este aditivo alimentar nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%.

De acordo com a mesma e considerando-se os percentuais de leveduras sensíveis, isto é, 25,61; 34,14 e 67,07%, pode então ser verificada respectivamente a porcentagem de leveduras resistentes, frente às concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, de 74,39; 65,86 e 32,93%, demonstrando que, mesmo quando utilizado no dobro da concentração permitida para o queijo fundido, houve o desenvolvimento de 27 leveduras.

A sensibilidade a este conservante, nas mesmas concentrações empregadas, apresentou resultados superiores àqueles obtidos por Carnicel et al. (2003) na concentração de 0,1% (14,58%), na de 0,2% (22,92%) e na de 0,4% (60,42%).

Ao compararmos com Coelho (2001); Mansor (2001); Silva (2003), verifica-se que este resultado, onde empregou-se no teste o pH de 5,1, apresentou valores inferiores àqueles obtidos por Coelho (2001), que relatou na concentração de 0,1% a porcentagem de 99,16% e na de 0,2% a de 100,00%. Mansor (2001) relatou que, nas concentrações de 0,1 e 0,2% todas as leveduras



isoladas foram sensíveis e Silva (2003) verificou que, nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, todas também foram sensíveis.

Tabela 4 Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas

| Concentração (%) | Código das culturas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Nº de culturas | Porcentagem (n = 24) |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 0,1              | R1 <sub>1</sub> , R1 <sub>2</sub> , R2 <sub>1</sub> , R10 <sub>1</sub> , R18 <sub>1</sub> , R20 <sub>1</sub> , R23 <sub>1</sub> , R25 <sub>1</sub> , R25 <sub>2</sub> , R25 <sub>3</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 24             | 25,61%               |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                      |
| 0,2              | R1 <sub>1</sub> , R1 <sub>2</sub> , R2 <sub>1</sub> , R3 <sub>1</sub> , R10 <sub>1</sub> , R18 <sub>1</sub> , R20 <sub>1</sub> , R23 <sub>1</sub> , R24 <sub>1</sub> , R25 <sub>1</sub> , R25 <sub>2</sub> , R25 <sub>3</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 28             | 34,34%               |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                      |
| 0,4              | R1 <sub>1</sub> , R1 <sub>2</sub> , R1 <sub>3</sub> , R2 <sub>1</sub> , R3 <sub>1</sub> , R3 <sub>2</sub> , R3 <sub>3</sub> , R3 <sub>4</sub> , R5 <sub>1</sub> , R6 <sub>1</sub> , R10 <sub>1</sub> , R10 <sub>2</sub> , R13 <sub>1</sub> , R18 <sub>1</sub> , R18 <sub>2</sub> , R18 <sub>3</sub> , R20 <sub>1</sub> , R20 <sub>2</sub> , R20 <sub>3</sub> , R23 <sub>1</sub> , R23 <sub>2</sub> , R23 <sub>3</sub> , R24 <sub>1</sub> , R24 <sub>2</sub> , R24 <sub>3</sub> , R25 <sub>1</sub> , R25 <sub>2</sub> , R25 <sub>3</sub> , R25 <sub>4</sub> , R25 <sub>5</sub> , R25 <sub>6</sub> | 56             | 87,07%               |
|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                |                      |

Legenda:  
Rn<sub>i</sub>, onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada

Tabela 4. Leveduras sensíveis ao benzoato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.

| Concentrações (%) | Código das culturas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Nº de culturas | Porcentagem (n = 82) |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 0,1               | R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>6</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> ; R26 <sub>3</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 21             | 25,61%               |
| 0,2               | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>6</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R23 <sub>12</sub> ; R24 <sub>1</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> ; R26 <sub>3</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 28             | 34,14%               |
| 0,4               | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>2</sub> ; R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R5 <sub>1</sub> ; R5 <sub>2</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R13 <sub>1</sub> ; R13 <sub>2</sub> ; R13 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R19 <sub>1</sub> ; R19 <sub>2</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>6</sub> ; R23 <sub>7</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R23 <sub>12</sub> ; R24 <sub>1</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>5</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R24 <sub>9</sub> ; R24 <sub>10</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> ; R26 <sub>3</sub> . | 55             | 67,07%               |

Legenda:

RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.

### 5.3.2 - Propionato de sódio (INS - 281)

Apesar de não ser usado especificamente como conservador em ricota e em nenhum outro tipo de queijo, foi também verificada a sensibilidade das leveduras isoladas nas concentrações de: 0,1; 0,15; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,6%.

Na Tabela 5, constata-se considerando os percentuais de leveduras sensíveis, que na concentração de 0,1%, 98,78% das leveduras foram resistentes, sendo que, a partir de 0,15%, 95,12% também apresentaram resistência.





Tabela 5. Leveduras sensíveis ao propionato de sódio nas diferentes concentrações empregadas.

| Concentrações (%) | Código das culturas                                                        | Nº de culturas | Porcentagem (n = 82) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 0,1               | R25 <sub>4</sub> .                                                         | 01             | 1,22%                |
| 0,15              | R1 <sub>4</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> . | 04             | 4,88%                |
| 0,2               | R1 <sub>4</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> . | 04             | 4,88%                |
| 0,3               | R1 <sub>4</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> . | 04             | 4,88%                |
| 0,4               | R1 <sub>4</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> . | 04             | 4,88%                |
| 0,6               | R1 <sub>4</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> . | 04             | 4,88%                |

Legenda:

RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.



### 5.3.3 - Sorbato de potássio (INS - 202)

Apesar de não ser usado especificamente como conservador em ricota, de acordo com a legislação vigente, na concentração de 0,1%, poderá ser empregado em queijos em geral, queijo fundido, pasteurizado, cremoso, em fatias pré-embaladas, requeijão e 0,2% em queijo ralado.

A Tabela 6 apresenta as leveduras sensíveis a este aditivo alimentar nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,4%. Considerando-se os percentuais de leveduras sensíveis pode então ser verificada respectivamente, a porcentagem de leveduras resistentes: 91,46; 81,71; 62,20 e 52,44%, demonstrando que, mesmo quando utilizado na concentração de 0,4%, não houve inibição de um grande número de leveduras.

Os resultados de Coelho (2001); Mansor (2001); Silva (2003), em relação ao sorbato de potássio, revelaram a sensibilidade de diferentes leveduras isoladas de diversos produtos lácteos a este aditivo em diferentes concentrações.

Neste estudo, o sorbato de potássio na concentração de 0,05% inibiu o crescimento de 7 leveduras isoladas, representando 8,54% das testadas. O resultado foi superior ao de Coelho (2001), que relatou a inibição de 16 (6,67%) leveduras isoladas, nessa mesma concentração. Estes resultados foram inferiores ao de Mansor (2001); Silva (2003), que relataram que todas as isoladas foram sensíveis. Nas concentrações de 0,1 e 0,2%, obtiveram-se 15 (18,29%) e 31 (37,80%), respectivamente, percentuais inferiores aos de Coelho

(2001), que obteve, 99,58% e 100,00%, enquanto que Mansor (2001); Silva (2003) obtiveram todas isoladas sensíveis nestas concentrações.

Ao comparar-se os três conservantes alimentares empregados nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4%, pode ser verificado que, na primeira e na terceira, o mais eficaz foi o benzoato de sódio; na segunda, o sorbato de potássio, tendo sido ineficaz o propionato de sódio em qualquer concentração empregada.





Tabela 6. Leveduras sensíveis ao sorbato de potássio nas diferentes concentrações empregadas.

| Concentrações (%) | Código das culturas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Nº de culturas | Porcentagem (n = 82) |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 0,05              | R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 07             | 8,54%                |
| 0,1               | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>3</sub> ; R10 <sub>1</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ;<br>R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 15             | 18,29%               |
| 0,2               | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>2</sub> ; R1 <sub>3</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R5 <sub>1</sub> ;<br>R10 <sub>1</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>7</sub> ;<br>R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>7</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R24 <sub>2</sub> ;<br>R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>6</sub> ;<br>R25 <sub>7</sub> .                                                                                                                                                            | 31             | 37,80%               |
| 0,4               | R1 <sub>1</sub> ; R1 <sub>2</sub> ; R1 <sub>3</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R5 <sub>1</sub> ;<br>R10 <sub>1</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R11 <sub>3</sub> ; R12 <sub>4</sub> ; R13 <sub>1</sub> ; R13 <sub>2</sub> ; R13 <sub>3</sub> ;<br>R14 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R17 <sub>3</sub> ; R19 <sub>3</sub> ; R20 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ;<br>R20 <sub>7</sub> ; R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>7</sub> ; R23 <sub>8</sub> ;<br>R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>9</sub> ; R25 <sub>4</sub> ;<br>R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> . | 39             | 47,56%               |

Legenda: RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.

5.3.4 - Natamicina (INS - 235)

Apesar de não ser um conservante específico para ricota, poderá ser empregada na crosta de queijos no limite máximo de 2 mg/100 cm<sup>2</sup>, não devendo haver migração para a parte comestível do queijo.

A Tabela 7 apresenta as leveduras sensíveis a este aditivo alimentar nas concentrações de: 0,002; 0,004 e 0,008%. Considerando-se os percentuais de sensibilidade pode então ser verificada, respectivamente, a seguinte porcentagem de leveduras resistentes às concentrações citadas: 59,26; 51,85 e 46,91%, demonstrando que, mesmo quando empregado no dobro da concentração efetiva encontrado na literatura (0,008%), houve o desenvolvimento de 38 leveduras.

Tabela 7. Leveduras sensíveis a natamicina nas diferentes concentrações empregadas.

| Concentrações (%) | Código das culturas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Nº de culturas | Porcentagem (n = 81) |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| 0,002             | R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R13 <sub>3</sub> ; R14 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> .                                                                                                                                                                                             | 33             | 40,74%               |
| 0,004             | R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R13 <sub>3</sub> ; R14 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R19 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> .                                                                             | 39             | 48,15%               |
| 0,008             | R1 <sub>3</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R3 <sub>2</sub> ; R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> ; R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R11 <sub>1</sub> ; R11 <sub>2</sub> ; R13 <sub>2</sub> ; R13 <sub>3</sub> ; R14 <sub>3</sub> ; R16 <sub>1</sub> ; R17 <sub>2</sub> ; R19 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R23 <sub>1</sub> ; R23 <sub>2</sub> ; R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>7</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ; R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> . | 43             | 53,09%               |

Legenda: RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.  
Não Realizada = R26<sub>1</sub>.





#### 5.4 - Sensibilidade ao tratamento térmico (63°C/30 min.)

Das 82 (100,00%) leveduras isoladas, 75 (91,46%) delas foram resistentes ao tratamento térmico aplicado, sendo que dessas 73 (97,33%) estão representadas por *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* e as 2 leveduras (2,67%) por *Debaryomyces vanriijae* var. *vanriijia* (Tabela 8). As 7 leveduras restantes (8,54%) foram sensíveis ao tratamento térmico (63°C/30 minutos) e foram representadas pela *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*.

Ao se comparar a resistência das leveduras *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii*, após o tratamento térmico, pode-se observar um valor superior ao resultado obtido por Coelho (2001); Silva (2003), que relataram, respectivamente, o percentual de 78,46% e 47,61%, de resistência.

Tabela 8. Frequência relativa do gênero de leveduras resistentes ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos.

| Gênero/Espécie                                      | Código das culturas                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Nº de Culturas | Porcentagem (n = 75) |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------|
| <i>Debaryomyces hansenii</i> var. <i>fabryii</i>    | R1 <sub>2</sub> ; R1 <sub>4</sub> ; R2 <sub>3</sub> ; R3 <sub>1</sub> ; R3 <sub>2</sub> R3 <sub>4</sub> ; R3 <sub>5</sub> R3 <sub>6</sub> ; R3 <sub>7</sub> ; R5 <sub>1</sub> ; R5 <sub>2</sub> ;<br>R10 <sub>1</sub> ; R10 <sub>2</sub> ; R10 <sub>3</sub> ; R11 <sub>1</sub> ; R11 <sub>2</sub> ; R11 <sub>3</sub> ; R12 <sub>1</sub> ; R12 <sub>2</sub> ;<br>R12 <sub>3</sub> ; R12 <sub>4</sub> ; R13 <sub>1</sub> ; R13 <sub>2</sub> ; R13 <sub>3</sub> ; R14 <sub>3</sub> ; R17 <sub>2</sub> ; R17 <sub>3</sub><br>R18 <sub>1</sub> ; R18 <sub>2</sub> ; R18 <sub>3</sub> ; R19 <sub>1</sub> ; R19 <sub>2</sub> ; R20 <sub>1</sub> ; R20 <sub>3</sub> ; R20 <sub>6</sub> ;<br>R20 <sub>7</sub> ; R20 <sub>9</sub> ; R21 <sub>8</sub> ; R21 <sub>9</sub> ; R21 <sub>10</sub> ; R21 <sub>13</sub> ; R23 <sub>1</sub> R23 <sub>2</sub> ;<br>R23 <sub>3</sub> ; R23 <sub>4</sub> ; R23 <sub>5</sub> ; R23 <sub>6</sub> ; R23 <sub>7</sub> ; R23 <sub>8</sub> ; R23 <sub>9</sub> ; R23 <sub>10</sub> ;<br>R23 <sub>11</sub> ; R23 <sub>12</sub> R23 <sub>13</sub> ; R24 <sub>1</sub> ; R24 <sub>2</sub> ; R24 <sub>3</sub> ; R24 <sub>4</sub> ; R24 <sub>5</sub> ;<br>R24 <sub>6</sub> ; R24 <sub>8</sub> ; R24 <sub>10</sub> ; R25 <sub>1</sub> ; R25 <sub>2</sub> ; R25 <sub>3</sub> ; R25 <sub>4</sub> ; R25 <sub>5</sub> ;<br>R25 <sub>6</sub> ; R25 <sub>7</sub> ; R25 <sub>8</sub> ; R26 <sub>1</sub> ; R26 <sub>2</sub> ; R26 <sub>3</sub> . | 73             | 97,33%               |
| <i>Debaryomyces vanriijae</i> var. <i>vanriijae</i> | R14 <sub>1</sub> ; R14 <sub>2</sub> .                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 02             | 2,67%                |

Legenda:

RN<sub>n</sub> onde: R = Ricota; N = Número da amostra; n = Número da levedura isolada.

Finalizando, sabe-se que a qualidade higiênica da ricota fresca tradicional depende do asseio do processo e do respeito às corretas condições de conservação, dado que os microrganismos geralmente encontrados nestes produtos são indicadores de escassas condições de higiene. Mesmo um rápido consumo representa risco particular à saúde do consumidor, pois microrganismos patogênicos, podem estar normalmente presentes. Esses riscos podem aumentar mesmo durante a conservação, uma vez que a ricota é um produto de fácil deterioração, capaz de manter inalteradas as próprias características em condições de refrigeração por poucos dias. Em caso de abuso térmico na fase de conservação, a microbiota presente leva a uma redução adicional da vida de prateleira. É recomendável que as Boas Práticas de Fabricação (BPF) sejam aplicadas e respeitadas, para iniciar a implantação do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), propiciando o treinamento e a capacitação do pessoal no gerenciamento da segurança do produto. A necessidade de produzir alimentos mais seguros é uma maneira de estabelecer os pontos de monitoramento, principalmente nesta linha de produção, com a finalidade de garantir a segurança do produto final, desde a origem (ordenha) até o consumidor.





## 7 - REFERÊNCIAS

## 6 - CONCLUSÕES

1. Das 26 amostras de ricotas analisadas (100,00%), 23 (88,46%) estavam em desacordo com a legislação vigente em relação ao *Staphylococcus aureus*, sendo consideradas potencial fonte de toxinfecção alimentar, podendo ainda ocasionar a redução do nível de qualidade e do prazo de validade. Quanto aos coliformes fecais ou termotolerantes, a *Salmonella* spp. e a *Listeria monocytogenes*, todas elas se apresentaram dentro do padrão microbiológico estabelecido.

2. As leveduras isoladas das amostras analisadas foram *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* (97,56%) e *Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijia* (2,44%).

3. Nas concentrações de 0,1 e 0,4%, o conservante, benzoato de sódio foi o mais eficaz. Na concentração 0,2% o mais eficaz foi o sorbato de potássio, sendo ineficaz o propionato de sódio em qualquer concentração empregada. O emprego da natamicina permitiu o desenvolvimento de 38 leveduras (46,91%), quando empregada no dobro da concentração efetiva (0,008%), encontrada na literatura.

4. Ao tratamento térmico de 63°C por 30 minutos, setenta e cinco (91,46%) das leveduras isoladas foram resistentes, sendo 73 (97,33%) da espécie *Debaryomyces hansenii* var. *fabryii* e 2 (2,67%) *Debaryomyces vanriijiae* var. *vanriijia*.



## 7 - REFERÊNCIAS

ADESIYUN, A. A.; WEBB, L.; RAHAMAN, S. Microbiological quality of raw cow's milk at collection centers in Trinidad. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 2, p. 139-146, 1995.

ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N.; SILVA, M. I. S.; SALES, S. S.; CORREA, M. R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella enteritidis*: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 57-58, 2001.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Technical committee on microbiological methods for foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2. ed. Washington: Speck, 1992, 1219 p.

AMIEVA, M. R. O aproveitamento do soro de queijarias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 29, n. 171, p. 5-11, 1974.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 38, n. 10, p. 570-572, 1975.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. P. **Aditivos em Alimentos**. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. 1986, 178 p.

ARAÚJO, J. M. A. **Conservadores químicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1988. 16 p. (Universidade Federal de Viçosa; 269).

ARCHAM-BAULT, J. Coliform densities in pasteurized dairy products. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 17, p. 342-346, 1954.





ARCHER, D. L.; YONG, F. E. Contemporary issues: diseases with a food vector. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 1, p. 377, 1988.

ARCHER, D. P. *Listeria monocytogenes*: the science and police. **Food Control**, v. 7, p. 181-182, 1996.

ARNOTT, D. R.; DITSCHAEVER, C. L.; BULLOCK, D. H. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontario. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 37, n. 1, p. 11-13, 1974.

BACHMANN, F.; GERASIMENKO, C.; CAVALHERI, N. A.; REITER, M. G. R. Avaliação da qualidade de diferentes marcas de ricota colonial. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p.162-164, 2002.

BADINI, K. B.; NADER FILHO, A.; DO AMARAL, L. A.; GERMANO, P. M. Health risk due to the consumption of raw milk commercialized without due authorization. **Revista de Saúde Pública**, v. 30, n. 6, p. 549-552, 1996.

BANKS, J. G.; BOARD, R. G. Some factors influencing the recovery of yeasts and moulds from chilled foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 197-206, 1987.

BANSAL, P. K.; MONDAL, A. K. Yeast sequencing report. Isolation and sequence of the HOG1 homologue from *Debaryomyces hansenii* by complementation of the hog strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 16, p. 81-88, 2000.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, 881 p.

BRANDÃO, S. O. C. Soró: Um desafio para as técnicas de queijo. **Leite & Derivados**, n. 15, p. 13-14, 19-16, 1994.



BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 2<sup>rd</sup>. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1990, 1002 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. 3<sup>rd</sup>. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000, 1020 p.

BAROILLER, C.; SCHMIDT, J. L. Mise au point d'une grille simplifiée d'identification des principales espèces de levures presentes dans les fromages. **Le Laté**, v. 64, p. 16-28, 1984.

BARROS, V. R. M.; PAIVA, P. C.; PANETTA, J. C. *Salmonella spp*: sua transmissão através dos alimentos. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 91, p.15-19, 2002.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações. 13. ed. São Paulo: Nobel, 1984. 322 p.

BERTO, T.; HOFFER, M. **Sabori d'Italia**: formaggi. Rimini: Idea Libri, 1999. p. 116-122.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Assessment of dairy product quality and potencial shelf life a review. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 9, p. 739-753, 1986.

BÔER, E.; KUIK, D. A survey of the microbiological quality of blue-veined cheeses. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 41, n. 3, p. 227-237, 1987.

BRACKET, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, v. 4, p. 162-164, 1988.

BRANDÃO, S. C. C. Soro: um desafio para as fábricas de queijo. **Leite & Derivados**, n. 15, p. 13-14, 16-18, 1994.



BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n. 30.691, de 29 de março de 1952. Rio de Janeiro - RJ, 1952, alterados pelos decretos 1.255, de 25 de junho de 1962; 1.236, de 2 de setembro de 1964; 1.812, de 8 de fevereiro de 1996 e 2.244, de 4 de junho de 1997. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, Ministério da Agricultura. 1997. p.128-130.

BRASIL. Decreto n. 55871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto n. 50040 de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprego de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto n. 681 de 13 de março de 1962. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 de maio de 1965.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Brasília, 1980.

BRASIL. Resolução n. 04, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III, IV e VII, todos do Decreto n. 55871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 19 dezembro, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Defesa Animal. Coordenação Geral de Laboratório Animal. **Métodos de análise microbiológica para alimentos**. Brasília, 1991/1992, 136 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos**. Brasília, 04 de setembro de 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado**. Brasília, 04 de setembro de 1997.





BRASIL. Leis, decretos, etc. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001. Seção 1, p. 45 - 53.

BRAZAL-GARCIA, T.; RUIZ, L. R. A.; DÍAZ, M. E. Microbiología sanitaria de los yogures, naturales y com sabores, de consumo en la provincia de Alicante. **Alimentaria**, v. 177, p. 39-42, 1986.

BROCKLEHURST, T. F.; LUND, B. M. Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at + 7°C. **Food Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 207-233, 1985.

BRODSKY, M. H.; ENTIS, P.; ENTIS, M. P.; SHARPE, A. N.; JARVIS, G. A. Determination of aerobic plate and yeast and mould counts in foods using an automated hydrophobic grid-membrane filter technique. **Journal of Food Protection**, v. 45, p. 301-304, 1982.

CARDOSO, L.; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal no período de 1997-2001. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 32, 2003.

CARMINATI, D.; BELLINI, E.; PERRONE, A.; NEVIANI, E.; MUCCHETTI, G. Traditional ricotta cheese: survey of the microbiological quality and its shelf-life. **Industrie Alimentari**, v. 41, n. 414, p. 549-555, 2002.

CARNICEL, F. A.; HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; PERESI, J. T. M.; GONÇALVES, T. M. V. Estudo da qualidade microbiológica de ricotas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DOS ALIMENTOS, 2002, São Paulo, **Anais**, 2002. p. 29.



CARNICEL, F. A.; SILVA, J. V.; PERESI, J. T. M.; PENNA, A. L. B.; HOFFMANN, F. L. Determinação da atividade antimicrobiana "IN VITRO" de benzoato de sódio sobre leveduras isoladas de ricotas. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 35, 2003.

CARVALHO, C. O.; SERAFINI, A. B. Grupos de microrganismos isolados da orofaringe, nasofaringe e das mãos dos trabalhadores do restaurante da Universidade Federal de Goiás. **Higiene Alimentar**, v. 10, p. 19-24, 1996.

CASAROTTI, V. T.; GALLO, C. R.; CAMARGO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba - SP. **Archivos Latino Americano Nutricion**, v. 44, n. 3, p.158-163, 1994.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION - CDC. *Salmonella*. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/od/oc/media/fact/salmonella.htm> >. Acesso em: 16 jul. 1999.

CHERCHI, A.; PORCU, M.; SPANEDDA, L.; TUBEROSO, C. I. G. Physical-chemical - organoleptic and microbiological traits of sheep ricotta produced in Sardinia. **Rivista di Scienza dell'Alimentazione**, v. 28, n. 3, p. 307-314, 1999.

CHIAPPINI, C. C. J.; FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T. Avaliação do soro de queijo quanto à *Staphylococcus aureus*. In: XIII CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 1995, Juiz de Fora. **Anais**. 1995. p. 259-263.

CHIPLEY, J. R. Sodium benzoate and benzoic acid. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.). **Antimicrobials in Foods**. New York: Marcel Dekker, 1993, Cap. 2, p. 11-48, 1993.



COELHO, A. R. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de sorvetes**. 2001. 106p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

COSENTINO, S.; FADDA, M. E.; DEPLANO, M.; MULARGIA, A. F.; PALMAS, F. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1/2, p. 53-58, 2001.

COSENTINO, S.; TUBEROSO, C.; MELONI, V.; CHERCHI, A.; MULARGIA, A. F.; PORCU, M.; PALMAS, F. Valorization of Sardinian honeys: microbiological, palinological and physico-chemical characteristics. **Rivista di Scienza dell'Alimentazione**, v. 23, n. 2, p. 199-207, 1994.

COSSEDDU, A. M.; SANTIS, E. P. L. de; MAZZETTE, R.; FRESI, A.; LAI, G.; De-SANTIS, E. P. L. Packaged fresh Ricotta cheese made from cow milk: microbiological characteristics relevant to health and hygiene. **Igienico sanitario Latte**, v. 22, n. 7, p. 76-81, 1997.

COSTA, R. C. **Obtenção de lactose a partir de permeado de soro de queijo e permeado de leite**. 1995, 75 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1995.

COUSIN, M. A. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. **Journal of Food Protection**, v. 45, n. 2, p. 172-207, 1982.

COX, L. J.; KLEISS, J. L.; CORDIER, C.; CORDELLANA, C.; KONKEL, P.; PEDRAZZINI, C.; BEUMER, R.; SIEBENGA, A. *Listeria spp.* in food processing non-food and domestic environments. **Food Microbiology**, v. 6, p. 46-61, 1989.



CRUZ, C. D.; GOMES, M. I. F. V. Avaliação do teor de lipídios em queijos Minas Frescal industrializados e artesanais e em ricotas comercializados na região de Botucatu - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p.102-109, 2001.

DAVIS, J. G. Yogurt in the United Kingdom: chemical and microbiological analysis. **Dairy Industries**, v. 39, p. 149-157, 1974.

DAVIS, J. G. The microbiology of yogurt. In: CARR, J. G.; CUTTING, C. V.; WHITING, G. C. **Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food**. London: Academic Press, 1975. p. 245-266.

DEIANA, P.; FATICHENTI, F.; FARRIS, G. A.; MOCQUOT, G.; LODI, R.; TODESCO, R.; CECCHI, L. Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. **Lait**, v. 64, p. 380-394, 1984.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, v. 2, p.110-112, 1991.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A.M.; KABUKI, D. Y. Comparison of two plating media for the isolation of *Listeria sp* from some Brazilian dairy and meat products. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 256-259, 1992.

DIAS, R. S.; SILVA, S. O.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, M. B. C. M. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS CEPE-ILCT-EPAMIG, 13, Juiz de Fora, **Anais**, p. 143-144, 1995.



DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F.; VAZQUEZ, J. A.; BLANCO, J. L.; SUAREZ, G. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of semi-hard cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 4, n. 6, p.125-127, 1987.

DOMINGUEZ RODRIGUEZ, L.; FERNANDEZ GARAYZABAL, J. F.; VELASQUEZ BOLAND, J. A.; RODRIGUES FERRE, G.; SUAREZ FERNANDEZ, J. Isolation de microorganismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humaine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n.12, p. 939-941, 1985.

EL MARRAKCHI, A.; HAMAMA, A.; EL OTHMANI, F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. **Journal of Food Protection**, v. 56, n. 3, p. 256-259, 1993.

EMOND, E. A ribosomal DNA fragment of *Listeria monocytogenes* and its use as a genus specific probe in an aqueous-phase hybridization assay. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2690-2697, 1993.

ENGEL, G. Occurrence of yeasts in fresh cheese - organoleptic influence. **Milchwissenschaft Milk Science International**, v. 41, n. 11, p. 692-694, 1986b.

ENGEL, G. Yeasts in silage and raw milk. **Milchwissenschaft Milk Science International**, v. 41, n. 10, p. 633-637, 1986a.

ENGEL, G.; EINHOF, K.; PROKOPEK, D.; TEUBER, M. Relationship between yeast species, numbers of yeasts and yeast-dependent defects in skim milk quarg after adding defined yeast. **Milchwissenschaft Milk Science International**, v. 42, n. 7, p. 428-430, 1987.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2001. 652 p.

FADDA, M. E.; PALMAS, F.; COSENTINO, S.; CAGIANO, R. Evaluation of microbial contamination of dairy products. **Igiene Moderna**, v. 92, n. 3, p. 408-417, 1989.

FARBER, T. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FANTASIA, L. D.; MESTRANDREA, L.; SCHERADE, J. P.; YAGER, J. Detection on growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 179-185, 1975.

FATICHENTI, F.; BERGERE, J. L.; DEIANA, P.; FARRIS, G. A. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. butyricum*. **Journal of Dairy Research**, v. 50, p. 449-457, 1983.

FEITOSA, T.; MAIA, G. A.; VASCONCELOS, M. E. L., FÉ, J. A. M.; ORIÁ, H. F. Aspecto higiênico e sanitário do queijo tipo "coalho" do estado do Ceará. **Ciência Agrônômica**, v. 16, n. 2, p. 27-32, 1985.

FELÍCIO FILHO, A. Eficiência econômica de estocagem de queijos. **Informe Agropecuário**, v. 10, n. 115, p. 6-11, 1984.

FENIMAN, C. M.; PASINI, G.; MUCELIN, C. A. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Medianeira-PR. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 77-86, 2003.

FERREIRA, C. L. L. Relevância da utilização de soro e leite na indústria de laticínios. **Indústria de Laticínios**, v. 2, n. 11, p. 39-40, 1997.





- FLEET, G. Yeasts in dairy products. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 3, p. 199-211, 1990.
- FLEET, G. Spoilage yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 12, n. 1-2, p. 1-44, 1992.
- FLEET, G. H.; MIAN, M. A. The occurrence and growth of yeasts in dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 145-155, 1987.
- FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do "queijo de coalho" produzido no estado da Paraíba. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 5, p. 43-48, 1999.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. tradução Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Teonhardt, Porto Alegre : Artmed, 2002, 424 p.
- FOSCHINO, R.; GARZAROLLI, C.; OTTOGALI, G. Microbial contaminants cause swelling and inward collapse of yoghurt packs. **Lait**, v. 73, p. 395-400, 1993.
- FOSTER, E. M.; NELSON, F. E.; SPECK, R. N.; DOETSCH, R. N.; OLSON, J. L. **Dairy Microbiology**. New Jersey: Prentice Hall, 1957.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003. 182 p.
- FRASER, J. A.; SPERBER, W. H. Rapid detection of *Listeria spp.* in food and environmental samples by aesculin hydrolysis. **Journal of Food Protection**, v. 51, n. 10, p. 762-765, 1988.



FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los Alimentos**. 3. ed. Zaragoza: Acríbia, 1985. 522 p.

FROEDER, E.; PINHEIRO, A. J. R.; BRANDÃO, S. C. C. Variação da qualidade microbiológica de leite cru tipo "C" da Região de Viçosa. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 40, n. 241, p. 55-68, 1985.

FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Manual para fabricação de laticínios**. Belo Horizonte: CETEC, 1985. v. 1 (Série de publicações técnicas, n. 014).

FURLANETTO, S. M. P.; SANTOS, M. A. A. dos; HARA, C. *Listeria spp* avaliação da eficiência de quatro meios de plaqueamento no seu isolamento. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 46, p. 30-34, 1996.

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos: manual técnico para a produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar. 1994. p.104-105.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMANN, F. L.; VINTURIM, T. M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas - Frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 2, p. 78-82, 1994.

GARRIDO, N. S.; MORAIS, J. M. T.; BRIGANTI, R. C.; OLIVEIRA, M. A. de; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, S. A. V. de; FÁVARO, R. M. D. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 60, n. 2, p. 141-146, 2001.



GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene do leite: aspectos gerais das mastites. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 12-16, 1995.

GIROTO, J. M. **Soro de leite nos laticínios do estado do Paraná**: potencial, oportunidades e restrições. 2001. 120 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

GÓES, J. A. W.; FURLANETO, D. M. N.; VELOSO, I. S.; SANTOS, J. M. Capacitação dos manipuladores de alimentos e a qualidade da alimentação servida. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 82, p. 20-22, 2001.

GONZÁLEZ SISO, M. I. **The Biotechnological Utilization of Cheese Whey: a review**. London: Elsevier Science, 1996.

GREEN, M. D.; IBE, S. N. Yeasts as primary contaminants in yogurts produced commercially in Lagos, Nigeria. **Journal of Food Protection**, v. 50, p. 193-198, 1987.

GUIRALD, J.; GALZY, P. Rôle d'une levure dans un accident de fabrication chez des fromages à pâte fraîche. **Le Lait**, v. 56, p. 496-497, 1976.

HANKIN, L.; SHIELDS, D. Quality of yogurt. **Connecticut Agricultural Experimental Station Bulletin**, New Haven, n. 785, p. 1-11, 1980.

HANKIN, L.; SHIELDS, D.; HANNA, J. G. Quality of Cottage cheese and Ricotta cheese. **Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin**, n. 791, p. 1-16, 1980.

HANKIN, L.; STEPHENS, G. R.; DILLMAN, W. F. Quality control significance of special media for enumeration of microbial groups in cottage-type cheese. **Journal of Milk and Food Technology**, v. 38, n. 12, p. 738-744, 1975.





HARIDY, M. S. A. Occurrence of yeasts in yogurt, cheese and whey. **Cryptogamie Mycologie**, v. 14, n. 4, p. 255-262, 1993.

HARRIGAN, W. F.; MC CANCE, M. E. **Laboratory Methods in Food Dairy Microbiology**. New York: Academic Press, 1976. 353 p.

HAYES, P. R. **Microbiologia e Higiêne de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. 369 p.

HAYES, P. S.; FEELEY, J. C.; GRAVES, L. M.; AJELLO, G. W.; FLEMING, D. W. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 438-440, 1986.

HAYES, P. S.; GRAVES, L. M.; SWAMINATHAN, B.; AJELLO, G. W.; MALCOLM, G. B.; WEAVER, R. E.; RANSOM, R.; DEEVER, K.; PLIKAYTIS, B. D.; SCHUCHAT, A.; WENGER, J. D.; PINNER, R. W.; BROOME, C.V. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **Journal of Food Protection**, v. 55, n.12, p. 952-959, 1992.

HENSON, O. E.; HALL, P. A.; ARENDS, R. E.; ARNOLD, J. R.; KNECHT, R. M.; JOHNSON, C. A.; PUSCH, D. J.; JOHNSON, M. G. Comparison of 4 media for the enumeration of fungi in dairy products: a collaborative study. **Journal of Food Science**, v. 47, n. 3, p. 930-932, 1982.

HOBBS, B. C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e Controle Higiênico Sanitário de Alimentos**. Tradução Silvia Panetta Nascimento e Marcelo Arruda Nascimento. São Paulo: Varela, 1999. 425 p.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA - CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" vendido na região de São José





do Rio Preto - SP. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 12, n. 1, p. 17-24, 1994.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA - CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M.; FAZIO, M. L. S. Microbiologia do leite tipo "C", comercializado na região de São José do Rio Preto - SP. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 65, p. 51-54, 1999.

HOUGH, G.; PUGLIESO, M. L.; SANCHEZ, R.; MENDES da SILVA, O. Sensory and microbiological shelf-life of a commercial Ricotta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 3, p. 454-459, 1999.

HUP, G.; STADHOULDERS, J. Comparison of media for the enumeration of yeasts and moulds in dairy products. **Netherlands Milk and Dairy Journal**, v. 26, n. 3/4, p. 131-140, 1972.

IARIA, S. T. *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS, 1991, Goiânia. **Anais**. 1991. p. 64-76.

IKEMIYA, M.; YASUMI, K. A strain of *Debaryomyces hansenii* isolated from processed cheese. **Journal of Fermentation Technology**, v. 51, p. 761-767, 1973.

INGRAM, M. Yeasts in food spoilage. In: **The Chemistry and Biology of Yeasts**. ed. COOK, A. H. New York: Academic Press, 1958. p. 603-633.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in Foods: 2. sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. Toronto: University of Toronto Press, 1974. 213 p.

LEBOURGER, J. A. Fungi in foods. VI. A comparison of media to enumerate yeasts and molds. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 38, n. 5, p. 465-468, 1975.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganisms in Foods: their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1978. 434 p. v. 1.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microbial Ecology of Foods**. New York: Academic Press, 1980. 997 p. v. 2.

JARVIS, B.; SHAPTON, N. A comparison of DRBC and DG18 media for enumerating molds and yeasts in cheddar cheese and milk powder. In: KING, A. P.; PITT, J. I.; BEUCHAT, I.; CORRY, J. E. (Ed.). **Methods for the Mycological Examination of Food**. New York: Plenum Press, 1986. p. 101-103.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 612 p.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. Maryland: Aspen, 2000. 679 p.

JONES, F. T.; LANGLOIS, B. E. Microflora of retail fluid milk products. **Journal of Food Protection**, v. 40, n. 10, p. 693-697, 1977.

KIMBLE, C. H. Chemical food preservatives. In: BLOCK, S. S. (Ed.) **Desinfection, Sterilization and Preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, Cap. 41, p. 834-858, 1977.

KOBURGER, J. A. Fungi in foods. II. Some observations on acidulants used to adjust media pH for yeast and mold counts. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 34, n. 10, p. 475-477, 1971.

KOBURGER, J. A.; FARHAT, B. Y. Fungi in foods. VI. A comparison of media to enumerate yeasts and molds. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 38, n. 8, p. 466-468, 1975.



KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR, W. C. **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 5. ed. New York: Lippincott, 1997. 1395 p.

KORBER, R. A conservação do queijo com ácido ascórbico. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 156/157, p. 21-22, 1971.

KREEGER VAN RIJ, N. J. W. (Ed.) **The Yeasts: a Taxonomy Study**. Amsterdam: Elsevier, 1984. 1082 p.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.) **The Yeasts: a Taxonomic Study**. (4<sup>th</sup> ed.), Amsterdam: Elsevier, 1998. 1055 p.

LEDERBERG, J.; LEDERBERG, E. M. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 63, p. 399-406, 1952.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia dos alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1991. 126 p. v. 2.

LEITÃO, M. F. F.; ROMEU, A. P.; CRUZ, R. R. Coliformes totais e fecais como indicadores de contaminação. II. Evolução do teste para caracterização dos coliformes fecais. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 9, n. 4, p. 13-21, 1971/1972.

LIGHTBODY, L. G. Coliform organisms in queensland cheddar cheese. **Queensland Journal of Agricultural Science**, n. 19, p. 305-307, 1962.





LINNAN, M. J.; MASCOLA, L.; LOU, X. D.; GOULET, V.; MAY, S.; SALMINEN, C.; HIRD, D. W.; YONEKURA, M. L.; HAYES, P. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 13, p. 823-828, 1988.

LODI, R.; BAIO, A.; CAPULLI, S.; CECCHI, L. Quality and shelf-life of artisanal Ricotta cheeses. **Industria del Latte**, v. 35, n. 3/4, p. 33-58, 1999.

LUCK, E. **Conservacion Quimica de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1977.

14<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, 1978. 418 p.

MACÊDO, J. A. B. de; AMORIM, J. M.; LIMA, D. C.; SILVA, P. M. da ;VAZ, U. P. Avaliação da temperatura de refrigeração nas gôndolas de exposição de derivados lácteos em supermercados da região de Juiz de Fora - MG. **Leite & Derivados**, v. 9, n. 53, p. 20-30, 2000.

MACHADO, R. M. G.; FREIRE, V. H.; SILVA, P. C. da. Alternativas tecnológicas para o controle ambiental em pequenas e médias indústrias de laticínios. Disponível em <http://www.cepis.ops-oms.org/residuossolidos>. Acesso em 15 de maio 2001.

MC CLAIN, J. L. E. W. H. FMS method for the isolation and identification

MADRID, A. Treatment of whey before processing. **Industrias Lacteas**, v. 28, n. 6, p.18, 21, 23-24, 1979.

(Laboratory Communication, n. 57)

MANDIL, A.; MORAIS, V. A. D.; PEREIRA, M. L.; FAGUNDES, J. M. S.; CARMO, L. S.; CORREIA, M. G.; CASTRO, E. P.; GOMEZ, M. J. V. M. *Staphylococcus aureus* em queijos tipo "Minas". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 2, p. 233-241, 1982.

315, p. 43-45, 2001.

MANSOR, A. P. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes tipos de manteiga**. 2001. 120p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2001.

MARSH, E. H. Antibiotics in foods - naturally occurring, developed and added. **Residue Review**, v. 12, p. 65, 1966.

MARTH, E. E. **Standard Methods for the Examination of Dairy Products**. 14<sup>th</sup> ed. Washington: APHA, 1978. 416 p.

MARTINEZ, E. B.; TESONE, S.; QUEVEDO, F. Survey of the microbiological quality of adult bovine rennet extracts. **Journal of Food Protection**, v. 49, p. 507-509, 1986.

MATTHEWS, M.; THEIS, M. Relationship between the environment, the food supply, and the practice of dietetics. In: RESEARCH AGENDA FOR DIETETICS CONFERENCE PROCEEDINGS. Chicago: American Dietetic Association. 1993.

MC CLAIN, D.; LEE, W. H. **FHIS method for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from processed meat and poultry products**. Betsville: Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, 1989. (Laboratory Communication, n. 57).

MEDEIROS, R. S.; TRAVASSOS, A. E. R.; MANGUEIRA, T. F. B. Determinação dos componentes físico-químicos de ricota produzida com leite de cabra no brejo paraibano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 318, p. 42-45, 2001.

MELCHIADES, L. E. A.; VEIGA, V. M. O.; RIBEIRO, M. T.; DUTRA, I. S. Produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* isolados de mastite subclínica bovina. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 48, n. 288, p. 80-81, 1993.

MILLER, M. W. Yeasts in food spoilage: and update. **Food Technology**, v. 33, p. 76-80, 1979.

MILLER, J. S.; LEDFORD, R. A. Potencial for growth of enterotoxigenic *Staphylococci* in cheddar cheese whey. **Journal of Dairy Science**, v. 60, n.11, p.1689-1692, 1977.

MIMS, C. A.; PLAYFAIR, J. H. L.; ROITT, I. M.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**. 2. ed., Manole: São Paulo, 1999. 584 p.

MODLER, H. W.; EMMONS, D. B. Production and yield of whole-milk ricotta manufactured by a continuous process. I. Material and methods. **Milchwissenschaft.**, v. 44, n. 11, p. 673-676, 1989.

MOREIRA, S. R.; SCHWAN, R. F.; CARVALHO, E. P. de; WHEALS, A. E. Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yogurts in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 117-122, 2001.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Indice of *Listeria* species in raw and pasteurized milk processed in São Paulo, Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 229-237, 1993.

MOUTINHO, F. F. B. Ocorrência de um surto de intoxicação alimentar por toxinas de *Staphylococcus aureus* no município de Paraty - RJ. In: IV



CONGRESSO ESTADUAL DE SAÚDE PÚBLICA DE ALIMENTOS, 2001, Nova Friburgo-RJ. **Anais**. 2001.

NAKASE, T.; KOMAGATA, K. Microbiological studies on cheese. I. Yeast flora in cheese imported from Europe and North America. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**, v. 18, p. 346-352, 1977.

NICOLAU, A. E. A.; TSUKAHARA, L. Conservantes de alimentos. **Danisco Cultor**. [s.d.]. 21 p.

NOJIMOTO, I. T. I.; SOUZA, S. R.; VALADÃO, L. M. Ocorrência de *Listeria spp* em crianças da cidade de Goiânia - Goiás. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 29, n. 2, p. 73-74, 1997.

NOOITGEDAGT, A. J.; HARTOG, B. J. A survey of the microbiological quality of Brie and Camembert cheese. **Netherlands Milk & Dairy Journal**, v. 42, p. 57-72, 1988.

OLIVEIRA, J. S. Qualidade microbiológica do leite. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 31, n. 186, p. 15-20, 1976.

OLIVEIRA, T. C. R. M.; HIROOKA, E. Y. Low cost production and purification of polyclonal antibodies to staphylococcal enterotoxin A. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 2, p. 120-124, 1999.

OLIVEIRA SANTOS, B. M.; AGUILLAR, O. M.; TAKAKURA, M. S. Colonização simultânea de *Staphylococcus aureus* na cavidade nasal e mãos de portadores são de um hospital escola. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 309-314, 1990.

OTTOGALLI, G. Caratteristiche e significato della microflora dei formaggi. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 36, p. 207-225, 1986.



OTTOGALLI, G.; RONDININI, G.; CAPELLETTI, C. Some microbiological and hygienic aspects of Ricotta cheese. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 31, p. 77-87, 1981.

PALMAS, F.; CARTA, A.; COSENTINO, S.; FADDA, M. E.; GILIBERTO, G.; MULARGIA, A. F. New technology for the production of ewe milk Ricotta cheese: characterization and evaluation of the preservation parameters. **Rivista della Società Italiana di Scienza dell'Alimentazione**, v. 23, n. 4, p. 467-472, 1994.

PANETTA, J. C. Ricota, produto dietético ideal. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 177, p. 13-14, 1975.

PARO, F. M.; SCHOKEN-ITURRINO, R. P.; NADER FILHO, A.; AVILA, F. A. de. Características microbiológicas do leite tipo B, processado por uma micro-usina de beneficiamento do estado de São Paulo. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 66-70, 2003.

PEPPLER, H. J. Yeast properties adversely affecting food fermentations. **Food Technology**, v. 31, p. 62-65, 1977.

PEREIRA, A. J. G.; PÓVOA, M. E. B.; CRUZ, G. R. Influência da velocidade de aquecimento sobre a qualidade da ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 43, n. 257, p. 11-14, 1988.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999a.



PEREIRA, M. L.; PEREIRA, J. L.; SERRANO, A. M.; BERGDOLL, M. S. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 66-67, p. 48-55, 1999b.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. Queijo Minas tipo Frescal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 83, p. 63-70, 2001.

PINTO, A. F. M. A. **Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos**. Portugal, p. 91-100, 1996.

PIPER, P.; MAHE, Y.; THOMPSON, S.; PANDJAITAN, R.; HOLYOAK, C.; EGNER, R.; MUEHLBAUER, M.; COOTE, P.; KUCHLER, K. The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 17, n. 15, p. 4257-4265, 1998.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. Soro de leite: obtenção, características e aproveitamento: revisão. **Semina**, v. 13, n. 1, p. 92-96, 1992.

PRIMO, W. M. Restrições ao desenvolvimento da indústria brasileira de laticínios. Disponível em: < <http://www.terra.viva.com.br/estudos/analises> >. Acesso em: 5 de set. 2001.

RABELO, J. A.; MOULIN, M. R. I.; SQUILASSI, K. M. B. S.; SOUZA, W. M.; VIEIRA, M. C. M.; SOUZA, C. M. Qualidade microbiológica de Queijo Minas Frescal comercializado no Estado de Goiás no período de junho a dezembro de 1999. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 119, 2001.





RAIMUNDO, I. C.; VALE, R. H. P.; ABREU, L. R.; FIORINE, J. E. Avaliação microbiológica de ricotas comercializadas no município de Alfenas - MG. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA DOS ALIMENTOS, 2002, São Paulo, **Anais**, 2002. p. 17.

RAMOS, J. P.; VALENTE, P.; HAGLER, A. N.; LEONCINI, O. Restriction analysis of the ITS region for characterization of the *Debaryomyces* species. **Journal Gen. Applied Microbiology**, v. 44, p. 399-404, 1998.

RANDOLPH, H. E.; CHAKRABORTY, B. K.; HAMPTON, O.; BOGART, O. L. Microbial counts of individual producer and commingled grade. A raw milk. **Journal of Milk & Food Technology**, v. 36, n. 3, p. 146-151, 1973.

RANGEL, F. F.; ORNELAS, E. A.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos ricota comercializados em Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 186-188, 2002.

RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 246-249, 2000.

RIBEIRO, A. S. M. G. **Coliformes em queijos tipo minas frescal. Avaliação de metodologia para enumeração e isolamento**. 1981. (Dissertação-Mestrado-Escola Superior de Agricultura de Lavras). Lavras, 1981.

RICHARDS, N. S. P. S. Emprego racional de soro láctico. **Indústria de Laticínios**, p. 67-69, 1997.

ROBACH, M. C. Use of preservatives to control microorganisms in food. **Food Technology**, v. 34, n.10, p. 81-84, 1980.



ROBINSON, R. K. Some typical varieties of fresh cheeses. In: **A Color Guide to Cheese and Fermented Milks**. 1995. p. 151-169.

ROTH, L. A.; CLEGG, L. F. L.; STILES, M. E. Coliforms and shelf-life of commercially produced cottage cheese. **Canadian Institute of Food Technology Journal**, v. 4, n. 3, p.107-111, 1971.

RYAN, C. A.; NICKELS, M. K.; HARGRETT, B. N. T.; POTTER, M. E.; ENDO, T.; MAYER, L.; LANGKOP, C. W.; GIBSON, C.; MCDONALD, R. C.; KENNEY, R. T. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. **JAMA**, v. 258, n. 22, p. 3269-3274, 1987.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. New York, Marcel Dekker, 1991. 632 p.

SAAD, N. M.; MOUSTAFA, M. K.; AHMED, A. A. H. Microbiological quality of yoghurt produced in Assiut City. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 19, n. 37, p. 87-91, 1987.

SÁ BARRETTO, E. S.; PEREIRA, C. R. P. Avaliação da qualidade das marcas de queijo Minas tipo Frescal consumidas no município do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v. 13, n. 61, p. 53, 1999.

SABIONI, J. G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto (MG) 1992. **Higiene Alimentar**, v. 8, n. 33, p. 22-24, 1994.

SAKATE, R. I.; SANTOS, F. L.; BRANDÃO, S. C. C. Características microbiológicas de ricota fresca comercializada no município de Belo Horizonte - MG. In: XVI CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 1998, Rio de Janeiro. **Anais Rio de Janeiro, SBCTA**, 1998.



SALVADOR, S. L. S.; BARACCHINI, O.; ITO, I. Y. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* na saliva, orofaringe e fossas nasais de indivíduos sadios. **Revista de Microbiologia**, v. 20, n. 2, p. 165-169, 1989.

SANT'ANNA, D. D.; SILVA, C. A. B.; GOMES, S. T. Análise de risco da implantação da coleta de leite a granel em propriedades rurais. **Indústria de Laticínios**, n. 34, p. 76-78, jul./ago. 2001.

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

SCHINGOETHE, D. J. Whey utilization in animal feeding. A summary and evolution. **Journal of Dairy Science**, v. 59, p. 556-570, 1976.

SCHMIDT, J. L.; DAUDIN, J. J. Etude de phomogénéité d'une population de levures isolées à partir de fromage de Camembert. **Annales Microbiologie** (Institute de Pasteur), v. 134 A, p. 399-409, 1983.

SCHMIDT, J. L.; GRAFFARD, C.; LENOIR, J. Contribution à l'étude des aptitudes biochimiques de levures isolées du fromage de Camembert. **Le Lait**, v. 59, p. 142-163, 1979.

SEILER, H.; BUSSE, M. The yeasts of cheese brines. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 289-304, 1990.

SHEREE LIN, C. C.; FUNG, D. Y. C.; COX, N. A. Conventional and rapid methods for yeast identification. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 273-289, 1987.





SILVA, J. V. **Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijos tipo "Minas Frescal"**. 2003. 112 p. Dissertação (Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, 2003.

SILVA, M. C. D. **Caracterização físico-química de queijos comercializados em São Horizonte -**

SILVA, M. C. D. ***Listeria monocytogenes* em queijos: ocorrência, avaliação de métodos e caracterização de cepas isoladas de queijos**. 1997. 117 p. (Tese de Doutorado), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1997.

SILVA, M. C. D. **Caracterização físico-química de queijo cottage e queijos comercializados em São Horizonte - MG**

SILVA, M. C. D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 354-356, 1998.

SILVA, M. C. D. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination**

SILVA, M. C. D.; VILARDI, T. C. C.; TIBANA, A. Avaliação de métodos para detecção de *Listeria* em queijos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, p. 150-155, 1998.

SILVA, N. **Caracterização físico-química de queijos comercializados em São Horizonte - MG**

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 133-139.

SILVA, N. **Caracterização físico-química de queijos comercializados em São Horizonte - MG**

SOFOS, J. N. Antimicrobial agents. In: MAGA, J. A.; TU, A. T. (Ed.) **Food Additive Toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. Cap. 11, p. 501-529.

SOFOS, J. N. **Caracterização físico-química de queijos comercializados em São Horizonte - MG**

SOFOS, J. N.; BUSTA, F. F. Sorbic acid and sorbates. In: DAVIDSON, P. M.; BRANEN, A. L. (Ed.) **Antimicrobials in Foods**, New York: Marcel Dekker, 1993. Cap. 3, p. 49-94.

SOFOS, J. N. **Caracterização físico-química de queijos comercializados em São Horizonte - MG**

TANIWAKI, M. H.; VAN DENBERG, A. G. F. **Polímeros orgânicos de uréia em queijos: ocorrência e significado**. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-200, 2001.

SOFOS, J. N.; PIERSON, M. D.; BLOCHER, J. C.; BUSTA, F. F. Mode of action of sorbic acid on bacterial cells and spores. **International Journal of Food Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-17, 1986.

SOUZA, M. R.; MORAIS, C. F. A.; CORRÊA, E. S.; RODRIGUES, R. Características físico-químicas de ricotas comercializadas em Belo Horizonte - MG. **Higiene Alimentar**, v. 11, n. 73, p. 68-71, 2000.

SOUZA, R. M. B.; RANGEL, F. F.; RAPINI, L. S.; PENNA, C. F. A. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R. Avaliação de características físico-químicas de queijo cottage e ricota comercializados em Belo Horizonte - MG. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 57, n. 327, p. 291-294, 2002.

SPECK, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 1976. 702 p.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic "Weak Acid Preservative". **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 203-206, 1998.

SURIYARACHCHI, V. R.; FLEET, G. H. Occurrence and growth of yeasts in yogurts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p. 574-579, 1981.

SU YI-CHENG; WONG, A. C. L. Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 2, p. 195-202, 1997.

TANIWAKI, M. H.; VAN DENDER, A. G. F. Bolors produtores de toxinas em queijos: ocorrência e significado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 187-200, 1991.





TATINI, S. R.; HOCVER, D. G.; LACHICA, R. V. F. Methods for the isolation and enumeration of *Staphylococcus aureus*. In: SPECK, M. L. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 2<sup>rd</sup>. ed. Washington: APHA, 1984. p. 411-427.

TAVARES, D. S. B.; FIALHO RIBEIRO, S. R. M.; SILVA, T. J. P.; ABREU, L. R. Avaliação da temperatura de conservação de queijos tipo Minas Frescal no mercado varejista no município de Niterói-RJ. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 104/105, p. 209, 2003.

TEIXEIRA, S. R.; SOUZA, H. M.; MARTINS, A. E. Consumo x qualidade do leite. **Indústria de Laticínios**, n. 34, p. 79-81, 2001.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Qualidade microbiológica do leite tipo "A" pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado - SP. **Higiene Alimentar**. v. 16, n. 96, p. 65-68, 2002.

TFOUNI, S. A. V.; TOLEDO, M. C. de F. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico - uma revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 35, n. 1/2, p. 41-53, 2001.

THATCHER, F. S.; CLARK, D. S. **Análisis Microbiológico de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1973. 271 p.

TRAVASSOS, A. E. R.; MEDEIROS, R. S.; MANGUEIRA, T. F. B. Análise de microrganismos indicadores, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* em ricota de leite de cabra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 56, n. 321, p. 116-121, 2001.

TRONCO, M. **Aproveitamento do leite: elaboração de seus derivados na propriedade rural**. Guaíba: Agropecuária, 1996. 146 p.





VADILLO, S.; PAYA, J.; CUTULI, M. T.; SUAREZ, G. Mycoflora of milk after several types of pasteurization. **Le Lait**, v. 67, p. 265-273, 1987.

VALLE, J. L. E. Riscos na produção de queijos e princípios da lavagem e desinfecção de equipamentos. **Leite e Derivados**, v. 4, n. 21, p. 67-68, 1995.

VAN DENDER, A. G. F. *Listeria monocytogenes*: um problema em leite e produtos lácteos. **Informe Agropecuário**, v.13, n. 155, p. 19-23, 1995.

VAN NETTER, P.; PERALIS, I.; MOOSDIJK, A.; VAN DE CURTIS, G. D. W.; MOSSEL, D. A. A. Liquid and solid selective differential media for the detection of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* **International Journal of Food Microbiology**, v. 9, p. 299-316, 1989.

VAN UDEN, N.; CARMO-SOUSA, I. D. Presumptive tests with liquid media for coliform organisms in yogurt in the presence of lactose fermenting yeasts. **Dairy Industries**, v. 22, p. 1028-1029, 1957.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología**. Zaragoza: Acribia, 1995.

VEISSEYRE, R. Tecnologia de los productos derivados del lactosuero y la mazada. In: **Lactología Técnica**. Zaragoza: Acribia, Zaragoza, 1988. p. 573-592.

VESSONI PENNA, T. C.; BARUFFALDI, R.; COLOMBO, A. J. Estudo das condições higiênico-sanitárias e das características físico-químicas do leite pasteurizado teor de gordura 3,2% m/v, vendido na cidade de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 6, n. 1, p. 57-74, 1986.

VIEIRA, A. B.; VIEIRA, J. M. S.; RAIMUNDO, S. M. C.; ROBBS, P. G. Comportamento de *L. monocytogenes* em queijo Minas Frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1993, Santos. **Anais**. 1993.

VIEIRA, M. C.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R.; GUIMARÃES, W. V. Conservação do soro de queijo minas com peróxido de hidrogênio. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 40, n. 240, p. 17-28, 1985.

VIEIRA, M. C. M.; MESQUITA, A. J.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; RABELO, J. A.; LIMA, S. V.; SILVA, E. V. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo "Minas Frescal" produzido no estado de Goiás. **Higiene Alimentar**, v. 15, n. 80/81, p. 113, 2001.

von EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 11-16, 2001.

WAGNER, M. K.; MOBERG, L. J. Present and future use of traditional antimicrobials. **Food Technology**, v. 43, n. 1, p. 143-147, 1989.

WALKER, H. W. Spoilage of foods by yeasts. **Food Technology**, v. 31, p. 61-65, 1977.

WALKER, H. W.; AYRES, J. C. Yeasts as spoilage organisms. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J. S. (Ed.). **The Yeasts**. New York: Academic Press, 1970. v. 3. p. 463-527.

WEBER, V. A.; BAUMANN, C.; POTEL, J.; FRIESS, H. Nachweis van *Listeria monocytogenes* und *Listeria innocua* in Käse. **Berlin und Muenchen Tierärztliche Wochenschrift**, v. 101, n. 11, p. 373-375, 1988.

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

WILLIAMS, A. P. A comparison of DRBC, RBC and MEA media for the enumeration of molds and yeasts in pure culture and in foods. In: KING, A. D.; PITT, J. I.; BEUCHAT, L.; CORRY, J. E. **Methods for the Mycological Examination of Food**. New York: Plenum Press, 1986. p. 85-89.

ZALL, R. R. Whey treatment and utilization. **Food Processing Waste Management**. Westport: AVI, 1979. p.175-201.





