

## Artigo Técnico

# QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO PARMESÃO RALADO COMERCIALIZADO EM PONTA GROSSA, PARANÁ

## Physicochemical and microbiological quality of grated Parmesan-type cheese sold in Ponta Grossa, Paraná (Brazil)

Jéssica Caroline Bigaski RIBEIRO<sup>1</sup>

Carolina Rentz CARDOSO<sup>2</sup>

Luís Antônio ESMERINO<sup>3</sup>

Renata Dinnies SANTOS<sup>4</sup>

Ivo Mottin DEMIATE<sup>5\*</sup>

Alessandro NOGUEIRA<sup>6</sup>

### RESUMO

O queijo tipo Parmesão ralado está entre os mais consumidos e também entre os mais fraudados do país, visto que a fragmentação facilita a incorporação de diversos adulterantes. Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade físico-química e microbiológica de queijos ralados comercializados na região de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Diferentes marcas de queijos foram submetidas a análises físico-químicas de acidez, proteína, lipídios, umidade, cinzas, índice de peróxidos e teste com lugol; também foram realizadas análises microbiológicas de determinação do número mais provável de coliformes a 45 °C/g, contagem em placas de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), análise de *Salmonella* spp e *Enterococcus* spp. Os queijos ralados apresentaram diferenças significativas principalmente na quantidade de lipídios, umidade, cinzas e ácido lático, enquanto para os valores de proteína e índice de peróxidos a variação entre as marcas foi menor. Foi identificada fraude com amido em uma das marcas. As contagens de *Staphylococcus* spp (coagulase negativa) variaram de 4,1 a 6,0 x 10<sup>3</sup> UFC/g, porém não foi detectada a presença de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva). Não foi constatada presença de *Salmonella* spp e nem de coliformes termotolerantes (45°C) nas amostras. A presença de *Enterococcus faecium* sensível à vancomicina foi detectada em três lotes analisados, mas as contagens de microrganismos foram inferiores àquelas estabelecidas na legislação vigente o que

- 1 Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: jessicabigaski@hotmail.com
  - 2 Engenheira de Alimentos - Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: carol\_rcardoso@yahoo.com.br
  - 3 Professor Adjunto - Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: esmerino@uepg.br
  - 4 Professora Adjunto - Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: renatadinnies@gmail.com
  - 5 Professor Associado - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: demiate@yahoo.com
  - 6 Professor Adjunto - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: alessandronog@yahoo.com
- \* Autor para correspondência: Universidade Estadual de Ponta Grossa - Av. Carlos Cavalcanti, 4748, Campus Uvaranas, Ponta Grossa, PR, Brasil - CEP 84030-900. E-mail: demiate@yahoo.com

Recebido / Received: 16/02/2012

Aprovado / Approved: 13/04/2012

indica qualidade higiênico-sanitária aceitável para o queijo ralado em estudo. Por outro lado, a composição físico-química apresentou grande oscilação, sendo possível observar problemas de oxidação lipídica e fraude com amido em algumas amostras.

**Palavras-chave:** oxidação, amido, adulteração.

### ABSTRACT

The grated Parmesan-type cheese is among the most consumed and defrauded products in Brazil, because the fragmentation facilitates tampering. Thus, the objective of this study was to investigate the physicochemical and microbiological quality of grated cheeses sold in the region of Ponta Grossa, Paraná, Brazil. The physicochemical analysis of cheese samples included lactic acid, proteins, lipids, moisture, ash, peroxide index and Lugol's iodine test; microbiological analysis were carried out to determine the most probable number of coliforms at 45 °C/g, plate count of *Staphylococcus aureus* (positive coagulase), analysis of *Salmonella* spp and *Enterococcus* spp. The samples showed significant differences mainly in the levels of lipids, moisture, ash and lactic acid, while for the values of protein and peroxide index variations between brands were lower. Fraud with starch has been identified in one brand. The counts of *Staphylococcus* spp (coagulase negative) ranged from 4.1 to 6.0 x 10<sup>3</sup> CFU/g, but *Staphylococcus aureus* (positive coagulase) was not detected. The presence of *Salmonella* and coliforms (45 °C) were negative in all samples. The presence of *Enterococcus faecium* sensitive to vancomycin was detected in three lots, but microorganism counts were lower than those established in the legislation which proves acceptable sanitary quality for the studied grated cheese. On the other hand, the physicochemical composition showed great variation, indicating problems with fraud and lipid oxidation in the samples.

**Keywords:** oxidation, starch, tampering.

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo de queijos no Brasil, apesar de ainda muito inferior ao de países como a Grécia e a França, teve um aumento significativo entre os anos de 2000 a 2008 de cerca de 30 % e tendências apontadas pela EMBRAPA indicam que atualmente a quantidade de queijo consumida no Brasil é de 4,0 kg/habitante/ano (LIMA FILHO; POMBO, 2010). Hoffmann (2007) afirma que o consumo vem acompanhando o crescimento econômico dos últimos anos e que a cada 10 % de aumento na renda do brasileiro, o consumo de queijos cresce 8 %.

Com o crescimento do consumo, aumenta também a preocupação com a qualidade dos produtos comercializados. No Brasil a Portaria Nº 357, de 04 de setembro de 1997, regulamenta o padrão de identidade e qualidade de queijo ralado (BRASIL, 1997b), RDC nº12, de 2 de janeiro de 2001, fixando os padrões microbiológicos para alimentos, limitando as contagens de coliformes à 45 °C/g em 5 x 10<sup>2</sup> UFC e de estafilococos coagulase positiva/g à 10<sup>3</sup> NMP para queijos de baixa umidade (ANVISA, 2001). *Salmonella* sp/25g deve estar ausente. Com a finalidade de investigar a qualidade higiênico-sanitária de queijos no Brasil vários estudos foram conduzidos por Salvador et al. (2001), Mesquita et al. (2001), Pimentel et al. (2002) e Maldonado et al. (2006), com diferentes tipos de produtos.

Salvador et al. (2001) avaliaram a qualidade

microbiológica de 30 amostras de queijo Prato e Parmesão ralado, coletadas em diferentes supermercados da cidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram índices de contaminação acima do permitido pela legislação em 11 das amostras de queijo prato e em quatro de queijo parmesão. Em uma amostra de queijo prato fatiado foi detectada a presença de *Salmonella arizonae*, que, segundo os autores, pode causar de graves toxinfecções.

Mesquita et al. (2001), em um estudo qualitativo da microbiota anaeróbia em amostras de queijo provolone, parmesão e prato, compararam amostras de queijos estufados e normais. Os autores observaram que nas amostras de queijo provolone e prato, consideradas estufadas, foram isoladas e identificadas, com maior frequência, *Clostridium butyricum* e *Streptococcus intermedius*, enquanto nas amostras normais, incluindo o parmesão, as espécies mais frequentes foram *Streptococcus intermedius*, *Actinomyces israeli* e *Actinomyces naeslundii*. Os autores concluíram que na quantificação das bactérias anaeróbias, as amostras consideradas normais e estufadas não mostraram diferenças significativas.

Na avaliação microbiológica de queijo ralado realizada por Pimentel et al. (2002), não foi detectada a presença de *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) e coliformes a 45 °C. Os autores concluíram que 22 % das amostras não estavam de acordo com os parâmetros físico-químicos

regulamentados, porém 100 % das amostras analisadas microbiologicamente atendiam à legislação vigente, mesmo sendo detectada a presença de  $10^5$  UFC/g de bolores e leveduras em uma amostra.

Maldonado et al. (2006) realizaram uma avaliação higiênico-sanitária em 29 amostras de queijo parmesão ralado na cidade de São Paulo. Os autores comentam o fato de que embora os valores médios para a atividade de água (0,916) e pH (5,62) não representassem um obstáculo para a multiplicação de microrganismos deteriorantes e potencialmente patogênicos, todas as amostras analisadas apresentaram resultados de coliformes fecais, *Salmonella* spp e estafilococos coagulase positiva em concordância com a legislação vigente.

A legislação brasileira estabelece limites apenas para umidade e gordura nos Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Queijos Parmesão e de Queijo Ralado. Estes limites são frequentemente extrapolados conforme demonstrado por diversos estudos realizados em diferentes regiões do Brasil, como Barros et al. (2011), Justus et al. (2011), Pimentel et al. (2002).

No trabalho realizado por Barros et al. (2011), foram encontrados valores de umidade cerca de 15 % acima do limite previsto para queijos de baixa umidade. Justus et al. (2011) relataram a falta de padronização na produção dos queijos em estudo, onde 87,5 % da amostras apresentaram diferenças significativas na composição e em Pimentel et al. (2002), apenas 22 % das amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação vigente.

Por ser um queijo com alto teor de gordura e longo período de maturação, o queijo Parmesão está sujeito à oxidação lipídica, que é um dos fatores que diminuem a qualidade sensorial e estabilidade do produto durante o armazenamento, causando principalmente a formação de *off-flavours* e alterações de cor (KRISTENSEN; SKIBSTED, 1999). Essa reação pode causar grandes danos sensoriais como ocorrido com requeijão cremoso no trabalho realizado por Alves et al. (2007). O processo de oxidação pode ser estimulado por diversos fatores, sendo o principal deles o tipo de embalagem utilizada, exposição à luz e ao oxigênio (SCHÄR; BOSSET, 2002).

Portanto, considerando-se a vulnerabilidade desse produto a fraudes e não conformidades com a legislação, o objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade físico-química e microbiológica de queijos ralados comercializados na região de Ponta Grossa, Paraná, Brasil.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de mesmos lotes de queijo ralado de nove marcas com data de fabricação e prazo de validade expressos nas embalagens e com

rotulagem contendo registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) foram adquiridas ao acaso em estabelecimentos comerciais da cidade de Ponta Grossa (25° 09' S, 50° 16' W), Paraná, Brasil. Três embalagens (50 ou 100 g) de cada marca foram misturadas para a obtenção de uma amostra que foi empregada em todo o trabalho.

### Análises físico químicas

Para a análise de acidez, uma alíquota de queijo foi macerada em álcool etílico p.a. durante 6 horas, e então titulado o extrato com NaOH 0,1 N e indicador fenolftaleína até aparecimento de coloração rósea. Para a composição foram mensuradas quantidades de proteínas através do método de micro-Kjeldahl, de lipídios em butirômetro especial para queijo, de umidade por gravimetria após dessecação em estufa à 105 °C, de minerais por gravimetria após incineração em mufla à 550 °C. A gordura para avaliação do índice de peróxidos foi extraída pelo método de Bligh-Dyer e titulada com tiosulfato de sódio 0,01 N e indicador amido 1 % até desaparecimento da coloração escura. A presença de amido nos queijos foi verificada por intermédio de gotejamento de lugol sobre a amostra (IAL, 2008) e observação das amostras em microscopia óptica. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados submetidos a ANOVA seguida de teste Tukey ( $p < 0,05$ ) para discriminação de médias, quando necessário.

### Análises microbiológicas

A qualidade microbiológica foi avaliada com relação aos parâmetros estabelecidos pela Resolução ANVISA Nº. 12 de 2 de janeiro de 2001 (ANVISA, 2001) e as análises foram efetuadas com base no *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (SILVA et al., 2007). Para todas as análises microbiológicas, cinco amostras do mesmo lote de queijo ralado foram empregadas.

No laboratório, a superfície externa das embalagens foi limpa com álcool 70 % antes de ser aberta. A seguir, foram feitas diluições em água peptonada tamponada estéril 0,1 %,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ , sendo os frascos homogeneizados por inversão 25 vezes num arco de 30 cm (SILVA et al., 2007).

Para a contagem de *Staphylococcus aureus* foi utilizado o meio Ágar Baird Parker e a técnica de semeadura em superfície. A confirmação das colônias típicas de *Staphylococcus aureus* foi realizada pelo teste de coagulase utilizando como controle a linhagem padrão de *S. aureus* ATCC 25923 (coagulase positiva) e *S. epidermidis* ATCC (coagulase negativa).

Para a determinação de coliformes totais e termotolerantes (45 °C) foi utilizado o método

do Número Mais Provável (NMP). No teste presuntivo utilizou-se o caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e no confirmativo o Caldo Lactosado Verde Brilhante (Bile 2 %) para coliformes totais e Caldo *Escherichia coli* (EC) para coliformes termotolerantes. Os tubos positivos em Caldo EC foram semeados em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e as colônias suspeitas de ser *Escherichia coli* foram submetidas a provas bioquímicas específicas utilizando o Manual de Identificação de Enterobactérias (NEWPROV, 2006). Na pesquisa utilizou-se como controle positivo a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Na análise de *Salmonella* spp as amostras foram pré-enriquecidas a 35 °C/24 h e transferidas para Caldo Tetrationato (35 °C/6 a 8 h) para enriquecimento. Decorrido este tempo, as culturas obtidas foram homogeneizadas e semeadas, em duplicata, em Ágar Salmonella-Shigella (SS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). Colônias suspeitas de cada meio de cultura foram inoculadas em Ágar Ferro Tríplice Açúcar (TSI). Cepas apresentando reações sugestivas, ou seja, inclinação alcalina (vermelha) e de fundo ácido (amarelo) com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio) foram submetidas à confirmação através de prova de soro-aglutinação com anti-soro polivalente somático PROBAC®. Na pesquisa de *Salmonella* spp utilizou-se como controle positivo a linhagem de *S. typhimurium* ATCC 13311.

Para a análise de *Enterococcus* spp as amostras foram inoculadas em Caldo Dextrose Azida. Cada tubo positivo foi semeado em Ágar Bile Esculina Azida. O crescimento indica resistência à bile e, o escurecimento do ágar indica hidrólise da esculina. Os enterococos crescem na presença de bile e hidrolisam a esculina (SILVA et al., 2007). As colônias típicas em Ágar Bile Esculina Azida foram semeadas em Caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) contendo 6,5 % de NaCl. A maioria dos enterococos cresce em 6,5 % NaCl e o teste da arabinose diferencia os *E. faecalis* (negativo) do *E. faecium* (positivo). Em função de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes à vacamicina já terem sido relatadas no Brasil (COSTA et al., 1998), para as cepas isoladas foram realizados os antibiogramas para verificar possível resistência a esse antibiótico (CLSI, 2010). Na análise utilizou-se como controle positivo a cepa de *Enterococcus faecalis* ATCC 13311.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A legislação vigente não permite adição de amido em queijo ralado, sendo apenas permitida a adição de conservante e antiaglutinante. Por intermédio do teste de lugol foi verificada a presença de amido/material amiláceo em uma das

marcas de queijo ralado analisada. Adulterações com amidos resultam em coloração azul escura quando a solução de lugol é adicionada. Resultados normais, sem fraudes, apresentam coloração amarelada/avermelhada. Entre as oito amostras de queijo analisadas, somente a marca J apresentou resultado positivo para o teste, ou seja, presença de coloração azul escura. Com este resultado, pode-se afirmar que o queijo ralado J foi fraudado, pois contém amido, o que foi observado em microscopia óptica (resultado não mostrado).

Nos resultados das análises físico-químicas (Tabela 1) podem ser observadas que as principais diferenças entre as amostras de queijo ralado encontram-se nos teores de lipídios, umidade, cinzas, ácido láctico e índice de peróxidos. Os valores de proteína não variaram muito, exceto o da marca "J", que foi inferior aos demais. Em relação ao índice de peróxidos, houve diferenças entre as amostras.

A marca "J" apresentou diferença significativa em relação aos demais em todos os itens, exceto cinzas, com resultados não condizentes com a composição média para queijo ralado, devido à fraude detectada com amido. A marca "G" não pode ser analisada por falta de quantidade suficiente para as análises físico-químicas.

As Portaria nº 353 (BRASIL, 1997a) e 357 (BRASIL, 1997b) de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, regulamentam os Padrões de Identidade e Qualidade de queijo Parmesão e de queijo ralado, respectivamente, classificando o queijo Parmesão como de baixa umidade, semi-gordo e maturado, e permitindo para os queijos ralados desta classe umidade máxima de 20 g.100 g<sup>-1</sup>.

Trabalhos recentes indicam que esta desconformidade é bastante frequente em queijos Parmesão ralados no Brasil, onde valores ainda maiores de umidade foram encontrados por Barros et al. (2011), de 31,28 a 30,96g.100 g<sup>-1</sup>, com 100 % das amostras irregulares. No trabalho de Justus et al. (2011) 37,5 % das amostras analisadas estavam acima do permitido e em Pimentel et al. (2002) 33 % delas.

Os teores de proteínas, lipídios e cinzas nos queijos dependem da composição do leite utilizado em sua produção, por sua vez, esta composição é influenciada por diversos fatores que alteram a proporção destes constituintes, como a raça, estágio de lactação ou alimentação do animal ou estação do ano (CARROLL et al., 2006). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o teor de proteínas apresentou diferenças entre 22 % das marcas, porém o queijo com o valor mais baixo (9,62 ± 0,75 g.100 g<sup>-1</sup>) foi fraudado com material amiláceo, o que diminuiu a proporção de proteína no produto. Excetuando a amostra que apresentou reação positiva para amido, a variação

no percentual de proteínas foi de 30,79 a 36,06 g.100 g<sup>-1</sup> entre as marcas. Barros et al. (2011) encontraram valores de proteína próximos, de 28,78 a 30,68 g.100 g<sup>-1</sup>, enquanto no estudo de Justus et al. (2011) foi observada maior variação entre as sete marcas, de 34,54 a 53,71 g.100 g<sup>-1</sup>, para queijos Parmesão ralados comercializados na região Sul de Minas Gerais.

A quantidade de lipídios variou entre 4,75 e 50,00 g.100 g<sup>-1</sup>, porém, entre as amostras não adulteradas as diferenças foram maiores do que as encontradas para proteínas, sendo 62,5 % delas diferentes entre si. Segundo revisão de Schroeder et al. (2004), os lipídeos são os constituintes mais afetados pelos modificantes de composição do leite, principalmente pela alimentação das vacas, podendo oscilar três vezes mais que as variações nos teores de proteínas. Todavia, a Portaria N° 146, de 07 de março de 1996 (BRASIL, 1996), regulamenta que queijos semi-gordos, como é classificado o queijo Parmesão, devem apresentar teor de lipídios entre 25,0 a 44,9 % no extrato seco (GES) e, desta forma, 66,67 % das marcas analisadas estão acima do limite máximo, sendo classificados como "gordos".

No presente estudo foi observado alto teor de gordura nos queijos analisados, principalmente nos queijos com menor umidade, como o encontrado por Justus et al. (2011), onde 37,5 % dos queijos analisados foram considerados "gordos". Apenas as marcas "B" e "E", excetuando-se a amostra fraudada "J", apresentaram valores menores de lipídios totais que os valores médios relatados por Vale e Glória (1998) de 34,83 a 35,55 % para o queijo ralado e Parmesão ralado.

Na oxidação lipídica, os primeiros compostos originados pelo ataque dos radicais livres são os hidroperóxidos (KRISTENSEN; SKIBSTED, 1999), que quando quantificados servem como ferramenta para a investigação da

qualidade da gordura. Neste trabalho foram encontrados resultados de até 451,41 mEq de peróxidos.kg<sup>-1</sup> de queijo (marca "C").

Apesar de não haver padrões para queijos, a Resolução RDC n° 270, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA (2005), regulamenta que são considerados aceitáveis até 10 mEq de peróxido.kg<sup>-1</sup> de amostra para óleos e gorduras vegetais refinadas. Utilizando-se este padrão, 75 % das amostras analisadas estariam acima do permitido, indicando deterioração na gordura dos queijos. Os altos valores encontrados podem estar relacionados a diversos fatores como o processo drástico de ralagem do queijo, o qual proporciona intenso contato do produto com o oxigênio devido ao aumento da superfície, aliado a uma embalagem inadequada com trocas gasosas e exposição à luz resultando em maior oxidação lipídica (MORTENSEN et al., 2004). As amostras que apresentaram os maiores valores de índice de peróxido estavam em embalagens plásticas transparentes, o que aumenta a incidência de luz e de oxigênio, acelerando, dessa forma, as reações de oxidação. As embalagens metalizadas reduzem a incidência direta da luz e possuem menor permeabilidade ao oxigênio, retardando o processo oxidativo.

Na Tabela 2 pode ser observado o resultado das análises microbiológicas sendo que o resultado expressa a média de cinco amostras analisadas em cada lote. A presença de *Staphylococcus* (coagulase negativa) entre os 10 lotes analisados variou de 4,1 a 6,0 x 10<sup>3</sup> UFC/g. O lote da marca D apresentou a menor contagem e a marca B, a maior contagem. Não foram detectados *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva). A contagem de coliformes termotolerantes (45 °C) foi < 3 NMP/g em todos os 10 lotes. O resultado da análise de *Salmonella* sp foi negativo em todas as 50 amostras analisadas. Em três lotes foi detecta-

**Tabela 1** – Resultados das análises físico-químicas de amostras comerciais de queijo ralado, coletadas no período de março a junho de 2010 na cidade Ponta Grossa PR.

Amostras /marcas	Proteína g.100 g <sup>-1</sup>	Lipídios g.100 g <sup>-1</sup>	GES g.100 g <sup>-1</sup>	Umidade g.100 g <sup>-1</sup>	Cinzasg. g.100 g <sup>-1</sup>	Ác. Láctico g.100 g <sup>-1</sup>	IP g.kg <sup>-1</sup>
A	30,79 ± 0,32 <sup>ab</sup>	37,50 ± 0,71 <sup>c</sup>	47,32 ± 0,89 <sup>b</sup>	20,75 ± 0,38 <sup>c</sup>	7,62 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>ab</sup>	33,70 ± 3,99 <sup>b</sup>
B	32,42 ± 1,16 <sup>ab</sup>	29,00 ± 2,83 <sup>d</sup>	40,29 ± 3,93 <sup>bc</sup>	28,02 ± 0,21 <sup>b</sup>	5,74 ± 0,13 <sup>c</sup>	0,27 ± 0,01 <sup>a</sup>	12,46 ± 2,57 <sup>c</sup>
C	32,48 ± 0,02 <sup>a</sup>	50,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	59,38 ± 0,00 <sup>a</sup>	15,80 ± 0,03 <sup>c</sup>	6,39 ± 0,00 <sup>cd</sup>	0,21 ± 0,01 <sup>c</sup>	451,41 ± 5,77 <sup>a</sup>
D	35,69 ± 2,68 <sup>a</sup>	36,00 ± 1,41 <sup>c</sup>	45,84 ± 1,80 <sup>b</sup>	21,47 ± 0,04 <sup>c</sup>	6,50 ± 0,09 <sup>c</sup>	0,24 ± 0,01 <sup>ab</sup>	3,09 ± 0,05 <sup>cd</sup>
E	34,58 ± 0,79 <sup>a</sup>	33,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>	42,21 ± 0,00 <sup>bc</sup>	21,81 ± 0,76 <sup>c</sup>	7,76 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,00 <sup>d</sup>	15,60 ± 1,70 <sup>c</sup>
F	36,06 ± 0,88 <sup>a</sup>	37,75 ± 0,35 <sup>c</sup>	46,67 ± 0,44 <sup>c</sup>	19,10 ± 0,27 <sup>d</sup>	8,64 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	9,73 ± 0,72 <sup>c</sup>
G*	-	-	-	-	-	-	-
H	35,44 ± 0,52 <sup>a</sup>	36,75 ± 0,35 <sup>c</sup>	45,50 ± 0,44 <sup>d</sup>	19,24 ± 0,18 <sup>d</sup>	6,77 ± 0,01 <sup>c</sup>	0,16 ± 0,00 <sup>d</sup>	14,32 ± 0,04 <sup>c</sup>
I	33,69 ± 1,52 <sup>a</sup>	44,50 ± 0,71 <sup>b</sup>	55,21 ± 0,88 <sup>a</sup>	19,40 ± 0,03 <sup>d</sup>	6,33 ± 0,05 <sup>cd</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>a</sup>	17,40 ± 0,39 <sup>c</sup>
J	9,62 ± 0,75 <sup>c</sup>	4,75 ± 0,35 <sup>e</sup>	7,00 ± 0,52 <sup>bc</sup>	32,17 ± 0,03 <sup>a</sup>	6,25 ± 0,08 <sup>cd</sup>	0,10 ± 0,00 <sup>e</sup>	-

Nota: (\*) não analisado; IP: índice de peróxidos; médias com letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (p>0,05) pelo teste Tukey.

da a presença de *Enterococcus* e os testes bioquímicos para identificação indicaram a presença de *Enterococcus faecium* e o antibiograma mostrou que eram sensíveis à vancomicina.

A legislação brasileira estabelece um máximo de  $10^3$  UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva para o queijo ralado (ANVISA, 2001). Nas amostras avaliadas neste estudo, mesmo alguns lotes apresentando contagens acima de  $10^3$  UFC/g de *Staphylococcus* spp (coagulase negativa) não foram detectados *Staphylococcus* coagulase positiva. Os resultados foram concordes com os obtidos por Pimentel et al. (2002) e Maldonado et al. (2006) que também não detectaram esse microrganismo. O envolvimento dessa bactéria na epidemiologia das doenças veiculadas por alimentos decorre de sua alta prevalência e do risco de produção de enterotoxinas termotáveis responsáveis pela intoxicação alimentar. *S. aureus* também produz outras toxinas de interesse humano como a toxina-1 responsável pela síndrome do choque tóxico em humanos e as toxinas esfoliativas, causadoras da síndrome da pele escaldada (LUZ, 2008).

Segundo Freitas et al. (2009), no Brasil não existe legislação com determinação de limites para *Staphylococcus* coagulase negativa em alimentos. Todavia, um estudo conduzido por esses pesquisadores mostrou a presença de genes toxigênicos em cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de amostras de queijos de coalho. A ocorrência de vários genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa foi considerada preocupante para a saúde do consumidor pela possibilidade de produzirem toxinas responsáveis por intoxicações alimentares. A

quantidade elevada de *Staphylococcus aureus* no queijo pode indicar falta de cuidados higiênicos por parte dos produtores de queijos, a sanitização inadequada e a manipulação excessiva em condições higiênico-sanitárias deficientes por parte dos manipuladores (DALLA SANTA et al., 2010). Dessa forma o referido trabalho é útil para reforçar aos produtores a necessidade de melhorar as condições de processamento do queijo ralado.

A presença de coliformes termotolerantes (45 °C) é considerada como indicação de exposição à condição higiênica inadequada podendo favorecer a contaminação do alimento por bactérias patogênicas. A contagem dessas bactérias tem como finalidade revelar práticas higiênicas inadequadas e avaliar os procedimentos de manipulação e condições de tratamento dos alimentos, que possam representar um perigo em potencial (SALVADOR et al., 2001). Dessa forma, a legislação vigente estabelece para esse grupo de microrganismos o limite de  $10^3$  por grama ( $10^3$  UFC/g). Em nosso estudo não foi detectada a presença de coliformes termotolerantes, esses resultados foram concordes com os resultados relatados por Pimentel et al. (2002) e Maldonado et al. (2006) e não concordes com os obtidos por Salvador et al. (2001) que relataram contaminação em quatro amostras de queijo parmesão, um dos principais queijos comercializados como ralado.

Nos resultados obtidos neste estudo não foi detectada contaminação por *Salmonella* spp, sendo semelhantes aos relatados por Pimentel et al. (2002) e Maldonado et al. (2006). Todavia, essa bactéria foi identificada em amostras de queijo prato fatiado (SALVADOR et al., 2001). A *Salmonella* spp é uma bactéria que pode atingir o homem e os

**Tabela 2** – Resultado das análises microbiológicas de amostras comerciais de queijos ralados no período de março a junho de 2012 na cidade de Ponta Grossa PR.

Amostras /marcas	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	<i>Staphylococcus aureus</i> <sup>1</sup>	Coliformes 45 °C <sup>2</sup>	<i>Salmonella</i> <sup>3</sup>	<i>Enterococcus</i> <sup>3</sup>
A	$3,1 \times 10^3$	0	< 3	0/5	5/5
B	$4,1 \times 10^3$	0	< 3	0/5	5/5
C	$6,4 \times 10^1$	0	< 3	0/5	0/5
D	6,0	0	< 3	0/5	0/5
E	$6,0 \times 10^1$	0	< 3	0/5	0/5
F	$8,4 \times 10^1$	0	< 3	0/5	0/5
G	$4,4 \times 10^1$	0	< 3	0/5	0/5
H	$3,0 \times 10^2$	0	< 3	0/5	0/5
I	$2,0 \times 10^2$	0	< 3	0/5	0/5
J	$1,2 \times 10^3$	0	< 3	0/5	2/5
Máximo permitido legislação	–	$1,0 \times 10^3$ (UFC/g)	$5,0 \times 10^2$ (NMP/g)	Ausência 25g	–

Nota: <sup>(1)</sup>Contagem em placas – UFC/g; <sup>(2)</sup>Número mais provável (NMP); <sup>(3)</sup>Número amostras positivas/número amostras pesquisadas.

animais. Os alimentos são os principais veículos de transmissão, principalmente os de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos (SILVA et al., 2007).

A pesquisa de *Enterococcus* não está estabelecida pela legislação vigente. Em nosso estudo, a presença de *Enterococcus* foi detectada. A identificação da espécie mostrou ser *Enterococcus faecium* e o antibiograma mostrou ser sensível frente à vancomicina. Segundo Oliveira et al. (2002), algumas bactérias são permitidas para o emprego em alimentos e entre elas estão as probióticas. Entre as principais cepas de bactérias probióticas empregadas destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e em menor escala, as bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus*. No Brasil pesquisas com *Enterococcus faecium* utilizado como prebiótico tem sido realizadas, como um estudo sobre a influência do consumo de iogurte de soja fermentado com *Enterococcus faecium* na microbiota intestinal de animais e humanos, feito por Bedani (2008). Por outro lado a ocorrência de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina já foi relatada.

A legislação brasileira permite que queijos com mais de sessenta dias de maturação, como é o caso do queijo Parmesão, sejam produzidos com leite não-pasteurizado (BRASIL, 1996), o que pode proporcionar a presença de *Enterococcus* no produto por este ser um microrganismo que faz parte da microbiota natural do leite. Por outro lado, a inoculação da cepa comercial pode acarretar interessantes benefícios sensoriais ao queijo. Sarantinopoulos et al. (2002) estudaram o efeito do *Enterococcus faecium* em queijo tipo Feta e concluíram que ele beneficiou o sabor, aroma e estrutura do queijo, além de deter o crescimento de coliformes, micrococcos e bactérias lácticas não *starters*.

Segundo Perry (2004) a presença de *Enterococcus* como parte da microbiota natural de alguns queijos artesanais é discutida, uma vez que existem evidências de que *Enterococcus* estejam associados à infecções desenvolvidas em pessoas com comprometimento do sistema imunológico. Outro fato preocupante é que já foram relatadas cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina.

Segundo Dalla Santa et al. (2010) a quantidade de água nos alimentos é um dos parâmetros mais relevantes que interferem em sua estabilidade e na multiplicação microbiana, uma vez que as reações bioquímicas das células são dependentes da água livre presente nos alimentos. Em relação aos queijos o limite da população de alguns grupos de microrganismos leva em consideração o teor de umidade e são classificados em quatro grupos: baixa umidade;

média umidade; alta umidade e muita alta umidade (ANVISA, 2001).

No presente estudo não foram detectadas bactérias potencialmente patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e coliformes termotolerantes. Semelhante ao que foi relatado em outros estudos, tal fato pode ser explicado, em parte, pela maior quantidade de NaCl e a menor atividade de água presente no queijo ralado, fatores considerados inibitórios para a proliferação de microrganismos.

#### 4 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, os queijos analisados apresentaram diferenças significativas nos diversos elementos de composição, no estado de conservação da gordura e houve constatação de fraude com amido em uma das amostras. E, apesar das contagens microbianas terem sido inferiores àquelas estabelecidas na legislação brasileira atualmente em vigor, grande parte do queijo ralado comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná, apesar do registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), não atende aos parâmetros físico-químicos legais. Destaca-se que a legislação brasileira a respeito de queijos ralados apresenta apenas dois parâmetros para controle de qualidade (umidade e matéria gorda) e essa falta de requisitos técnicos dificulta ações de fiscalização e controle por parte dos órgãos competentes.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Secretaria Estadual de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior do Paraná/Unidade Gestora do Fundo Paraná, à Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e ao Ministério de Ciência e Tecnologia/Financiadora de Estudos e Projetos (MCT/FINEP) pelo apoio financeiro.

#### 5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, R. M. V. et al. Effect of light and packages on stability of spreadable processed cheese. **International Dairy Journal**, London, v.17, n.4, p.365-373, 2007.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos de alimentos, em anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 janeiro de 2001.

\_\_\_\_\_. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro

de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, de 23 de setembro de 2005.

BARROS, J. J. C. et al. Queijo Parmesão: caracterização físico-química, microbiológica e microestrutura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 285-294, 2011.

BEDANI, R. **Influência do consumo de “Iogurte” de soja fermentado com *Enterococcus faecium* CRL 183 na microbiota intestinal de animais e humanos**. 2008. 122p. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 11 de março de 1996.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 353, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico Para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Parmesão, Parmesano, Sbrinz, Reggiano e Reggianito. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, de 08 de setembro de 1997a.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 357, de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Ralado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, de 08 de setembro de 1997b.

CARROLL, S.M. et al. Milk composition of Holstein, Jersey, and Brown Swiss cows in response to increasing levels of dietary fat. **Animal Feed Science and Technology**, London, v. 131, n.3, p.451-473, 2006.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**: Wayne, 2010. 153 p (M100-S20 Twentieth Informational Supplement).

COSTA, L. M. D. et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v.2, n.3, p.160-163, 1998.

DALLA SANTA, O.R. et al. Qualidade microbiológica de queijos colonial elaborados em pequenas propriedades rurais de Guarapuava, PR. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v.5, n.1, p.39-44, 2010.

FREITAS, M.F.L. et al. Detecção de genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp isoladas de queijos de coalho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.2, p.375-379, 2009.

HOFFMANN, R. Elasticidades – renda das despesas de consumo de alimentos no Brasil em 2002-2003. In: INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Gasto e consumo das famílias brasileiras contemporâneas**. v. 2. Brasília: IPEA, 2007, p.463-483

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 4 ed., 1 ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

JUSTUS, A. et al. Caracterização física e química de queijos parmesão ralado comercializados na região Sul de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.66, n.379, p.16-24, 2011.

KRISTENSEN, D., SKIBSTED, L. H. Comparison of three methods based on electron spin resonance spectrometry for evaluation of oxidative stability of processed cheese. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.47, n.8, p.3099-3104, 1999.

LIMA FILHO, R. R.; POMBO, G. Aumenta o consumo de queijo no Brasil. **Carta Leite**. Scot Consultoria, Bebedouro, SP. Ano 6 - Edição 105, setembro de 2010.

LUZ, I.S. **Caracterização das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região agreste de Pernambuco**. 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz. Recife: I. S. Luz, 2008.

MALDONADO, A.G. et al. Avaliação higiênico-sanitária de amostras de queijo parmesão ralado do município de São Paulo, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.141, p.103-105, 2006.

MESQUITA, A.J. et al. Estudo quali-quantitativo da microbiota anaeróbia em amostras de queijo



- provolone, parmesão e prato. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.2, n.1, p.27-34, 2001.
- MORTENSEN, G. et al. Light-induced changes in packaged cheeses – a review. **International Dairy Journal**, London, v.14, n.2, p.85-102, 2004.
- NEWPROV. **Manual de identificação de enterobactérias**. Curitiba, 2006.
- OLIVEIRA, M.N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-22, 2002.
- PERRY, K.S.P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n.2, p.293-300, 2004.
- PIMENTEL, E. F. et al. Avaliação da rotulagem e da qualidade físico-química e microbiológica de queijo ralado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.22, n.3, p. 289-294, 2002.
- SALVADOR, M. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v.19, n.1, p.65-74, 2001.
- SARANTINOPOULOS, P. et al. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.76, n.1/2, p. 93-105, 2002.
- SCHÄR, W., BOSSET, J. O. Chemical and physicochemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v.35, n.1, p.15-20, 2002.
- SCHROEDER, G.F. et al. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. **Livestock Production Science**, London, v.86, p.1-18, 2004.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.
- VALE, S.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. **Food Chemistry**, London, v.63, n.3, p.343-348, 2008.

