

CRISTINA MOSCARDI DO CARMO

**OBTENÇÃO DO *SHELF LIFE* EM QUEIJO *MOZZARELLA*
BASEADO NA AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA
DOS GRUPOS COLIFORMES E ESTAFILOCOCOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração em Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Rossi Jr.

Co-orientador: Prof. Dr. José Francisco Ghignatti Warth.

CURITIBA
2006

Dedico

A minha família, amigos, alunos e colegas de trabalho,
pessoas que participaram deste mestrado ao meu lado

AGRADECIMENTOS

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

A

Deus sobre todas as coisas.

Eduardo Tetsuto Obara.

Davi e Gilda Thisen.

Minha Família, em especial **Mariza, Luiz e Lúcia Moscardi e Alfredo Bednarczuk**.

Prof. Dr^a. Wanda Moscalewski Abrahão do Laboratório Central do Estado – LACEN.

Mariela Moraes Martins - Médica Veterinária responsável pelo Setor de Microbiologia de Alimentos do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti.

Louise Cristine Cândido da Silva, Técnica do Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia da Universidade Federal do Paraná.

Fabiane Brasil de Mendonça do Laboratório de Microbiologia e Análises Microbiológicas de Alimentos e da Água - *Labor Food*.

Amigos queridos, em especial **Ivanor, Ivani e Nivaldo Suave, Cinthia Francis Ribeiro, Alexandre e Cláudio Zanicoski**.

Maria José Botelho Maeda e Natalia Vieira Borges, Secretárias do Departamento de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Paraná.

Membros do Setor de Ciências Agrárias, em especial aos professores **Dr. Paulo Rossi Jr e Dr. José Francisco Ghignatti Warth, Dr. José Luciano Andriguetto, Dra. Elizabeth Santin, Dr. Metry Bacila e Dra. Cristina Leise Bastos**.

*Ó Mestre
faça que eu procure
mais consolar que ser consolado,
compreender que ser compreendido,
amar que ser amado.*

*Pois é dando que se recebe,
perdoando que se é perdoado,
e é morrendo que se vive
para a vida eterna!*

São Francisco de Assis

Quando morremos, nada pode ser levado conosco, com a exceção das sementes lançadas por nosso trabalho e do nosso conhecimento.

Dalai Lama

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE QUADROS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xii
LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais.....	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Dados gerais.....	4
3.2 O leite de búfala e sua utilização na indústria.....	8
3.2.1 Características gerais.....	8
3.2.2 Valores médios para produção, gordura e proteína.....	10
3.2.2.1 Valores médios para produção do leite de bubalinos.....	10
3.2.2.2 Valores médios para gordura do leite de bubalinos.....	10
3.2.2.3 Valores médios para proteína do leite de bubalinos.....	11
3.2.3 Comparação do leite bubalino com o de outras espécies.....	11
3.2.4 Composição do leite bubalino.....	12
3.2.5 Características físicas do leite bubalino.....	13
3.3 Fabricação da <i>mozzarella</i>	14
3.3.1 A Tradicional <i>mozzarella</i> italiana.....	15
3.3.2 Composição do queijo <i>mozzarella</i>	16
3.4 Problemas e soluções que influenciam na comercialização.....	16
3.4.1 Padronização.....	16
3.4.2 Matéria-prima.....	17
3.4.3 Sazonalidade da matéria-prima.....	18
3.4.4 Selo de Pureza.....	19

3.4.5 Terminologia.....	21
3.4.6 Legislação.....	21
3.5 Microbiologia.....	23
3.5.1 Coliformes.....	24
3.5.2 Estafilococos.....	24
3.6 Qualidade do leite e seus derivados.....	26
3.6.1 Fatores microbiológicos que afetam a qualidade do leite.....	26
3.6.2 Vida ou tempo de prateleira (<i>Shelf life</i>).....	29
3.6.3 Cuidados para manter a qualidade do leite.....	31
3.6.4 Microrganismos que afetam a qualidade do leite.....	34
3.6.5 Efeitos dos microrganismos sobre a qualidade do leite.....	38
3.7 Padrões microbiológicos para o queijo <i>mozzarella</i>	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Base física laboratorial.....	41
4.2 Amostragem.....	41
4.3 Datas de análise.....	42
4.4 Preparo das amostras.....	44
4.4.1 Preparo das amostras de MECA.....	44
4.4.2 Preparo das amostras MESA.....	44
4.4.3 Pesagem.....	44
4.5 Diluições.....	45
4.6 Teste presuntivo para o grupo coliforme.....	46
4.7 Contagem de coliformes totais.....	47
4.8 Contagem de coliformes fecais.....	48
4.9 Contagem de estafilococos coagulase positiva (SC+) e negativa (SC -) por plaqueamento direto.....	49
4.9.1 Inoculação e incubação.....	49
4.9.2 Contagem de colônias presuntivas.....	49
4.9.3 Teste da coagulase.....	50
4.9.4 Cálculo dos resultados.....	51
4.10 Análise estatística.....	51
4.10.1 Análise não-paramétrica.....	51
4.10.2 Teste de Kolmogorov-Smirnov.....	52

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1 Resultados.....	53
5.2 Discussão.....	63
6 CONCLUSÕES	72
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	73
8 REFÊRENCIAS	75
ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	SELO ITALIANO DO SISTEMA DE TUTEIA DENOMINAZIONE DI ORIGINE PROTETTA (D.O.P.).....	20
FIGURA 2.	SELO DO CONSORCIO DE TUTEIA DA MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA	20
FIGURA 3.	SELO DE PUREZA DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE BÚFALO (ABCB).....	20
FIGURA 4.	DOIS FORMATOS (MECA E MESA) DO QUEIJO MOZZARELLA DESEMBALADOS 24 HORAS APÓS O INÍCIO DAS ANÁLISES	42
FIGURA 5.	PROCEDIMENTO PARA ILUIÇÃO ATÉ 10^{-3}	46
FIGURA 6.	EXEMPLO DE PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM DE COLIFORMES TOTAIS EM QUEIJO MOZZARELLA EMBALADO COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	47
FIGURA 7.	EXEMPLO DE PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM DE COLIFORMES FECAIS EM QUEIJO MOZZARELLA EMBALADO COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	48
FIGURA 8.	EXEMPLO DE PROCEDIMENTO PARA CONTAGEM ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA E NEGATIVA POR PLAQUEAMENTO DIRETO EM QUEIJO MOZZARELLA EMBALADO COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA)	49
FIGURA 9.	COLÔNIAS DE ESTAFILOCOCCOS COAGULASE NEGATIVA EM 2 FORMATOS (MECA E MESA) DE QUEIJO MOZZARELLA	67
FIGURA 10.	FLUXOGRAMA DA CONFECÇÃO DE DOIS FORMATOS DO QUEIJO MOZZARELLA DE UM LATICÍNIO SUJEITO A FISCALIZAÇÃO DO S.I.P./P.O.A NO ESTADO DO PARANÁ ...	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1.	PADRÕES MICROBIOLÓGICOS PARA QUEIJO <i>MOZZARELLA</i>	40
QUADRO 2.	NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) E INTERVALO DE CONFIANÇA A NÍVEL DE 95% DE PROBABILIDADE PARA DIVERSAS COMBINAÇÕES DE TUBOS POSITIVOS EM SÉRIES DE TRÊS E CINCO TUBOS. QUANTIDADE INOCULADA DA AMOSTRA: 0,1; 0,01 E 0,001g OU ml (<i>BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL</i> , 6. ed. Estados Unidos: <i>Food and Drug Administration</i> , 1984)	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	RESULTADOS DAS ANÁLISES QUÍMICAS DO LEITE DE BÚFALA E DE OUTRAS ESPÉCIES ANIMAIS, SEGUNDO VÁRIOS AUTORES.....	12
TABELA 2	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS QUEIJOS ELABORADOS PELOS MÉTODOS TRADICIONAL E DA ACIDIFICAÇÃO DIRETA*	16
TABELA 3	DATAS DAS ANÁLISES PARA COLIFORMES TOTAIS E FECAIS NOS QUEIJOS <i>MOZZARELLA</i> EMBALADOS COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	43
TABELA 4	DATAS DAS ANÁLISES PARA ESTAFILOCOCOS NOS QUEIJOS <i>MOZZARELLA</i> EMBALADOS COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	43
TABELA 5	NÚMERO DE DILUIÇÕES (EM H ₂ O _p) POR DATA, PARA REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DOS GRUPOS COLIFORMES E ESTAFILOCOCOS EM QUEIJOS <i>MOZZARELLA</i> EMBALADOS COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	45
TABELA 6	PROCESSO DE DILUIÇÃO PARA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DOS GRUPOS COLIFORMES E ESTAFILOCOCOS EM QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADOS COM E SEM ÁGUA (MECA E MESA).....	46
TABELA 7	RESULTADOS EM NMP/g DE COLIFORMES TOTAIS (CT) E FECAIS (CF) PARA 2 FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i>	53
TABELA 8	MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS (NMP/g) DE COLIFORMES TOTAIS PARA 2 FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i>	54
TABELA 9	ANÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DO NMP/g DE COLIFORMES TOTAIS NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL QUEIJO, NO PERÍODO DE 70 DIAS (P < 0,05).....	56

TABELA 10.	ANÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DO NMP/g DE COLIFORMES TOTAIS NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL TEMPO, NO PERÍODO DE 70 DIAS (P < 0,05).....	56
TABELA 11.	MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS (NMP/g) DE COLIFORMES FECALIS (COLIFORMES A 45oC) PARA 2 FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i>	57
TABELA 12.	ANÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DO NMP/g DE COLIFORMES FECALIS (COLIFORMES A 45OC) NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL QUEIJO, NO PERÍODO DE 70 DIAS (P < 0,05)	58
TABELA 13.	ANÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DO NMP/g DE COLIFORMES FECALIS (COLIFORMES A 45OC) NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL TEMPO, NO PERÍODO DE 70 DIAS (P < 0,05).....	59
TABELA 14.	MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS (UFC/g) DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA PARA DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i>	59
TABELA 15.	NÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DA UFC/g DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL QUEIJO, NO PERÍODO DE 54 DIAS (P < 0,05)	61
TABELA 16.	ANÁLISE NÃO-PARAMÉTRICA DA UFC/g DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE NEGATIVA NOS DOIS FORMATOS (MECA E MESA)* DO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> PARA A VARIÁVEL TEMPO, NO PERÍODO DE 54 DIAS (P < 0,05).....	61
TABELA 17.	CEPAS PADRÃO PARA OS CALDO LACTOSADO VERDE BRILHANTE BILE 2%, CALDO E. COLI E ÁGAR BAIRD PARKER.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1.	ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO DE BÚFALOS NO MUNDO (1961 A 2005), DE ACORDO COM DADOS DA FAO...(2005)	5
GRÁFICO 2.	ESTIMATIVA DA POPULAÇÃO DE BÚFALOS NO BRASIL (1961 A 2005), DE ACORDO COM DADOS DA FAO... (2005)	5
GRÁFICO 3.	COLIFORMES TOTAIS (NMP/g) EM QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO COM ÁGUA (MECA) NUM PERÍODO DE 70 DIAS.....	55
GRÁFICO 4.	COLIFORMES TOTAIS (NMP/g) EM QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO SEM ÁGUA (MESA) NUM PERÍODO DE 70 DIAS.....	55
GRÁFICO 5.	COLIFORMES FECAIS (COLIFORMES A 45°C) EM NMP/g NO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO COM ÁGUA (MECA) NUM PERÍODO DE 70 DIAS.....	57
GRÁFICO 6.	COLIFORMES FECAIS (COLIFORMES A 45°C) EM NMP/g NO QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO SEM ÁGUA (MESA) NUM PERÍODO DE 70 DIAS.....	58
GRÁFICO 7.	ESTAFILOCOCCOS COAGULASE NEGATIVA (UFC/g) EM QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO COM ÁGUA (MECA) NUM PERÍODO DE 54 DIAS.....	60
GRÁFICO 8.	ESTAFILOCOCCOS COAGULASE NEGATIVA (UFC/g) EM QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> EMBALADO SEM ÁGUA (MESA) NUM PERÍODO DE 54 DIAS.....	60
GRÁFICO 9.	RESULTADO DO ÍNDICE DE SATISFAÇÃO PARA CONSUMO DE 48 AMOSTRAS ANALISADAS INDIVIDUALMENTE, PARA O QUEIJO <i>MOZZARELLA</i> FABRICADO SOB 2 FORMATOS (MECA E MESA)*, DE ACORDO COM ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS NUM PERÍODO DE 54 DIAS PARA ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA E 70 DIAS PARA COLIFORMES A 45°C.....	62

GRÁFICO 10. RESULTADO MÉDIO DO ÍNDICE DE SATISFAÇÃO PARA CONSUMO DE 48 AMOSTRAS ANALISADAS EM TRIPLICATA, PARA O QUEIJO *MOZZARELLA* FABRICADO SOB 2 FORMATOS (MECA E MESA)*, DE ACORDO COM ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS REALIZADAS NUM PERÍODO DE 54 DIAS PARA ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA E 70 DIAS PARA COLIFORMES A 45°C.....

62

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ABCB	Associação Brasileira dos Criadores de Búfalo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A.O.A.C	Association of Official Analytical Chemists
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ASL	<i>Azienda Sanitaria Locale</i>
BHI	Ágar (Caldo) Infusão Cérebro-Coração
BP	Ágar Baird Parker
°C	graus Célsius
CBT	Contagem Bacteriana Total
CCS	Contagem de Células Somáticas
CF	Coliformes Fecais
CMI	Carga Microbiana Inicial
CMT	<i>California Mastitis Test</i>
CT	Coliformes Totais
D.O.P	<i>Denominazione di Origine Protetta</i>
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FAO	<i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>
g	grama
H ₂ O _p	Água peptonada a 0,1%
INMETRO	Inst. Nac. de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
Kg	Quilograma
l	litro
LABMOR	Laboratório de Microbiologia e Ornitopatologia
log	logarítmo
LST	Lauril Sulfato Triptose
MECA	Queijo <i>mozzarella</i> embalado com água
MESA	Queijo <i>mozzarella</i> embalado sem água (drenado)
MS	Ministério da saúde

ml	mililitro
mL	mililitros
mm	milímetro
NMP	Número Mais Provável
UFC	Unidade formadora de colônia
UFPR	Universidade Federal do Paraná
pH	Potencial hidrogeniônico
PNQL	Programa Nacional de Qualidade do Leite
P.O.A.	Produtos de Origem Animal
PR	Paraná
VB	Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante 2%
SC	Santa Catarina
SC+	Estafilococos coagulase positiva
SC –	Estafilococos coagulase negativa
SEP	<i>Servizio di Epidemiologia e Prevenzione</i>
S.I.P.	Serviço de Inspeção do Paraná
SVS	Secretaria de Vigilância Sanitária
TMB	Taxa de Multiplicação bacteriana
>	Maior
<	Menor
%	porcentagem

RESUMO

A *mozzarella* é um queijo fabricado com leite de búfala, originário da Itália, do século XVI. A sua fabricação de acordo com a tradição italiana envolve uma técnica artesanal, revelando um queijo de massa fresca e delicada e sabor inigualável. Problemas relacionados a reprodução dos búfalos, distribuição da matéria-prima (leite) ao longo do ano e as adulterações provenientes de adições do leite bovino ao bubalino, interferem e prejudicam a comercialização deste produto. Pesquisas têm sido desenvolvidas nesta área com o intuito de favorecer o desenvolvimento geral da bubalinocultura em todo o país. Desenvolveu este estudo com a finalidade de verificar alguns microrganismos indicadores de contaminação e deterioradores em *mozzarella* de búfala. Foi utilizado um lote de 48 amostras de 2 tipos diferentes de *mozzarella*: *mozzarella* embalada com água (MECA) e *mozzarella* embalada sem água (MESA), que foram armazenadas em refrigerador com temperatura entre 1 e 3°C. Foram realizadas 8 análises para coliformes totais (CT) e fecais (CF) num período de 70 dias e 7 análises para estafilococos coagulase positiva (SC+) e negativa (SC-) em um período de 54 dias. Três unidades amostrais foram retiradas para cada data de análise para MECA e MESA. Todo o lote com 48 amostras, nas análises realizadas, estava em conformidade com os padrões vigentes pela legislação. Não foram encontradas nas análises estafilococos coagulase positiva (SC+). Para CT não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para as variáveis queijo e tempo de armazenamento. Para CF (NMP/g) e SC- (UFC/g) houve diferença significativa ($P < 0,05$) para a variável queijo e não houve diferença significativa ($P > 0,05$) para a variável tempo de armazenamento. Considerou-se que 100% das amostras estavam satisfatórias para consumo dentro do prazo de validade do fabricante (30 dias).

Palavras-chave: mozzarella; vida de prateleira, coliformes, estafilococos.

ABSTRACT

The *Mozzarella* is a cheese made from buffalo milk, originary from Italy, in the 16th century. Its manufacturing according to Italian tradition involves a handmade technique, disclosing to a cheese of cool and delicate and incomparable taste. Problems related to reproduction of the buffalos, distribution of raw material (milk) throughout the year and the adulterations of bovine milk addition to the buffalo milk, interfere and decrease the commercialization of the product. Many researches have been developed in this area with the intention to assist all the general development of the bubalinoculture all over the country. This study has been developed with the purpose to verify some microorganisms in buffalo mozzarella. A bundle of 48 samples of 2 different types of mozzarella was used: mozzarella packed with water (MPW1) and mozzarella packed without water (MPW2) which were stored in a refrigerator at a temperature between 1° and 3°C. Eight total coliforms (TC) and fecal coliforms (FC) analyses were performed, in a 70 days period and seven for for positive coagulase *Staphylococcus* (SC+) and negative (ST-) in a 54 days period. Three samples were utilized for each analysis date for MPW1 and MPW2. The whole bundle of 48 samples was in compliance with the effective standards for the legislation. Positive coagulase *Staphylococcus* (SC+) were not spotted in the analyses. As for TC, it did not have significant difference ($P > 0,05$) for the variable Cheese and time of storage. For FC (MPN/g) and SC - (CFU/g) it had significant difference ($P < 0,05$) for the variable cheese and it did not have significant difference ($P > 0,05$) for the variable time of storage. It was considered that 100% the samples were adequate for consumption inside of the stated period of validity of the manufacturer (30 days).

Key-words: *mozzarella*; shelf life, coliforms, *Staphylococcus*