



Rosália Severo de Medeiros

Licenciada em Medicina Veterinária
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Parâmetros de qualidade do Queijo de Coalho produzido na Paraíba: indicadores químicos e microbiológicos

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em
Qualidade Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves,
Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova
de Lisboa

Co-orientador: Professor Doutor Vicente Queiroga Neto, Professor Associado do
Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Luís Manuel Trabucho de Campos

Arguente(s): Prof. Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira
Prof. Doutor Nuno Bartolomeu Mendes Godinho Alvarenga

Vogais: Prof. Doutora Maria das Graças Xavier de Carvalho
Prof. Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando
Prof. Doutora Maria Margarida Boavida Pontes Gonçalves

 FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2016

Parâmetros de qualidade do Queijo de Coalho produzido na Paraíba: indicadores químicos e microbiológicos

Copyright, Rosália Severo de Medeiros, FCT/UNL e UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

O autor,
Rosália Severo de Medeiros

As coisas tangíveis
Tornam-se insensíveis
À palma da mão.

Mas as coisas findas
muito mais que lindas,
essas ficarão.

Carlos Drummond de Andrade

É o tempo da travessia:
E, se não ousamos fazê-la,
Teremos ficado, para sempre,
À margem de nós mesmos”

Fernando Pessoa

Aos meus pais Lauro Medeiros (*in memorian*) e Rosa Severo de Medeiros (*in memorian*),
que sempre nos ensinaram que a maior herança deixada para um filho é o estudo.

A vocês, com muito amor, Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de toda inspiração, amor, sabedoria, paciência e fé! Obrigada Senhor!
Obrigada Nossa Senhora!

Ao meu querido esposo, Ramonilson, que sempre esteve ao meu lado nessa jornada, incentivando e dividindo comigo todos os momentos, alegres e difíceis, durante esta caminhada. Obrigada pela compreensão, carinho, amor e amizade! Te amo meu querido!

Aos meus amados filhos, José Ramon e João Pedro, que com a pureza da criança souberam entender as ausências e os momentos difíceis! Obrigada pelo carinho incondicional! Amo vocês!

Aos meus irmãos Rivânio, Rivaldo e Rivanildo, com suas respectivas esposas, Rúbia, Suzana e Aparecida, que sempre me apoiaram na conquista deste projeto.

À minha querida irmã Maria Aparecida (Didida) que por inúmeras vezes, foi a “mãe” dos meus filhos na minha ausência! Seu amor e dedicação me proporcionaram tranquilidade para enfrentar os momentos mais difíceis nesta caminhada!

À minha sogra, Alaíde, pela dedicação e amor prestados aos meus filhos, especialmente na minha ausência.

Ao meu cunhado João Bandeira, pelo incentivo e carinho. As minhas cunhadas, Ramonildes, Ramaildes, Raildes e Adélia, pelo carinho e apoio emocional.

Aos meus sobrinhos, Aline, Rachel, Priscila, Jéssika, Yanael, Lauro Neto, Leonardo Igor, Ítalo, Paulo Henrique e João Lucas, pelo apoio e carinho! Este legado é para vocês: nunca devemos desistir dos nossos sonhos!

À minha incansável e dedicada orientadora, Professora Margarida, pela amizade, dedicação, paciência e apoio em todos os momentos deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Vicente Queiroga Neto, pelo incentivo e apoio na conquista deste sonho.

Aos professores do DCTB, Benilde, Ana Luísa e Paula e à funcionária D. Lurdes, pelo carinho e atenção.

Aos professores Marcia Melo e Paulo Paes, que abriram as portas do Laboratório de Biologia Molecular para realização da minha pesquisa. Muito obrigada pela paciência e pelos ensinamentos.

À professora Maria das Graças e sua funcionária Bete, pela ajuda na realização de algumas análises físico-químicas no Laboratório de Leite e Derivados da UFCG.

À técnica da UACB, Aline Farias, pela presteza, amizade, dedicação e companheirismo na execução deste trabalho.

Aos colegas de Portugal, Maria Bernardo, Joana, Tereza Cordeiro, Suzana, Sara e João Pelica que me proporcionaram momentos de aprendizagem e descontração.

À Catarina Nobre, pelo paciência e apoio na formatação do texto final da tese.

Aos colegas queridos do Brasil, Leonardo, Suely, Viviane e Geysiane pela ajuda e amizade, em diversos momentos.

Às minhas queridas “bacaninhas” Malba Gean, Julia Márcia, Roberta Micheline, Débora Malta, Deborah Medgraft, Raquel, Jaqueline, Dilma, Socorro, Verinha, Deise, Gió, Regina, Heloína e Leíssa, pela compreensão e os momentos de alegria!

À Heidi, funcionária do Laboratório de Genômica da UFPE, pelo apoio na realização do sequenciamento das bactérias.

À Elieidy por dividir comigo suas bactérias lácticas para serem utilizadas como controle positivo.

À Inês, professora do Curso de Engenharia de Alimentos da UFCG de Pombal, pela ajuda no planejamento da análise sensorial dos queijos.

A Universidade Federal de Campina Grande, pelo espaço físico e apoio financeiro.

E a todos, que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, Muito Obrigada!

RESUMO

O Queijo de Coalho artesanal é considerado um património da população nordestina, com grande importância no contexto social e econômico da região. O presente trabalho teve como objetivos caracterizar as propriedades físico-químicas e características sensoriais, identificar a microbiota láctica e definir os perfis de ácidos gordos e de aminoácidos livres de 28 queijos de Coalho produzidos nas sete microrregiões do Sertão da Paraíba. Pretendeu-se também avaliar a existência de correlações entre estas propriedades e avaliar a influência da microrregião de produção ou do tempo de maturação do queijo nas variáveis estudadas de forma a identificar os parâmetros determinantes para a padronização do Queijo de Coalho produzido no Sertão paraibano. Os resultados da caracterização físico-química e sensorial dos queijos de Coalho da Paraíba mostraram que as amostras analisadas corresponderam de uma forma geral aos padrões de qualidade definidos para o Queijo de Coalho, tendo sido registadas diferenças significativas entre as médias das variáveis de composição ou sensoriais dos queijos nas várias microrregiões da Paraíba. O perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos permitiu identificar 51 ácidos gordos presentes em todas as amostras, em concentrações variáveis. Os ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0) foram os predominantes, mas foram encontradas também concentrações significativas de ácidos polinsaturados, como o ácido linoleico conjugado (CLA), o ácido eicosapentaenóico (EPA) ou o ácido docosahexaenóico (DHA). No perfil de aminoácidos livres foram identificados 15 aminoácidos, dos quais se destacam glutamina, glicina, treonina, metionina, fenilalanina, cisteína e tirosina presentes na maioria das amostras analisadas. Quanto à caracterização da microbiota deste queijo, foram observadas diferenças na prevalência dos géneros entre as várias microrregiões: o género *Streptococcus* predominou na microrregião de Catolé do Rocha (R1), o género *Enterococcus* foi o mais abundante nas microrregiões de Cajazeiras (R2), Sousa (R3) e Patos (R4), enquanto o género *Lactococcus* predominou nas microrregiões de Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7), sendo também o género mais abundante em termos globais, correspondendo a 40,1% das colónias isoladas. O género *Enterococcus* apresentou também a maior diversidade, incluindo espécies como *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. italicus*. Neste trabalho foram isoladas e identificadas pela primeira vez em Queijo de Coalho as espécies *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Lactococcus garvieae* e *S. macedonicus*, sendo o *L. garvieae* uma espécie sem registo em queijos artesanais no Brasil. Observaram-se correlações fortes ou muito fortes, positivas e negativas, entre as diferentes variáveis estudadas, o que permitiu sugerir algumas interdependências e compreender melhor a sua relevância para as características globais do Queijo de Coalho.

Palavras-chave: Queijo de Coalho, microbiota, propriedades físico-químicas, características sensoriais, ácidos gordos, aminoácidos.

ABSTRACT

The handmade Coalho cheese is considered a heritage of the northeastern population of Brasil, with great importance in the social and economic context of the region. This study aimed to characterize the physicochemical properties and sensory characteristics, identify the lactic microbiota and define the profiles of fatty acids and free amino acids from 28 Coalho cheeses produced in the seven microregions of the Sertão da Paraíba. It was also intended to assess the existence of correlations between these properties, and to evaluate the influence of the region of production or the time of maturation in the variables studied, in order to identify the relevant parameters for the standardization of Coalho cheese produced in Sertão da Paraíba. The results of the physico-chemical and sensory characterization of Coalho cheeses of Paraíba showed that the samples corresponded in general the quality standards set for this type of cheese, and significant differences were recorded between the composition or sensory variables of the cheeses from different regions of Paraíba. The determination of the fatty acid methyl esters profile allowed the identification of 51 fatty acids present in all samples at varying concentrations. The oleic acid (C18: 1), palmitic (C16: 0), stearic (C18: 0) and myristic (C14: 0) were predominant, but were also found significant concentrations of polyunsaturated acids such as conjugated linoleic acid (CLA), eicosapentaenoic acid (EPA) or docosahexaenoic acid (DHA). In the free amino acid profile 15 amino acids have been identified, among which are glutamine, glycine, threonine, methionine, phenylalanine, tyrosine, and cysteine, present in most samples. As for the characterization of the microbiota of this cheese, differences were observed in the prevalence of gender among the various micro-regions: the *Streptococcus* genus predominated in the region of Catolé do Rocha (R1), the genus *Enterococcus* was the most abundant in the regions of Cajazeiras (R2), Sousa (R3) and Ducks (R4), while the *Lactococcus* genus predominated in the regions of Piancó (R5), Itaporanga (R6) and Serra do Teixeira (R7) and was the most abundant genus, globally, corresponding to 40.1% of isolated colonies. The genus *Enterococcus* also had the highest diversity, including species such as *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* and *E. italicus*. In this work were isolated and identified for the first time in Coalho cheese the species *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *garvieae* *Lactococcus* and *S. Macedonicus*, and *L. garvieae*, this last one, a species never found in artisan cheeses in Brazil. Strong or very strong, positive and negative correlations were observed between the different variables, which allowed to suggest some interdependencies and better understand their relevance to the overall characteristics of the Coalho cheese.

Keywords: Coalho Cheese, microbiota, physico-chemical properties, sensory characteristics, fatty acids, amino acids.

Índice de matérias

Copyright	iii
AGRADECIMENTOS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
Índice de figuras	xviii
Índice de tabelas	xxi
Lista de abreviaturas	xxv
Capítulo 1 - Introdução geral	1
1.1 Produção mundial e nacional de queijo	2
1.2 História da origem do Queijo de Coalho	5
1.3 Classificação e processamento do Queijo de Coalho.....	5
1.4 Caracterização química e nutricional dos queijos artesanais	8
1.5 Caracterização microbiológica de queijos artesanais	10
1.6 Caracterização sensorial de queijos artesanais.....	11
Referências	12
Capítulo 2 – Caracterização físico-química e avaliação sensorial do Queijo de Coalho.....	15
2.1 Introdução.....	15
2.1.1 Características físico-químicas do Queijo de Coalho	15
2.1.2 Características sensoriais do Queijo de Coalho	16
2.2 Materiais e métodos	18
2.2.1 Amostragem	18
2.2.2 Preparação das amostras	19
2.2.3 pH	19
2.2.4 Acidez.....	20
2.2.5 Humidade	20
2.2.6 Cinzas.....	20
2.2.7 Proteína bruta.....	20
2.2.8 Gordura.....	21
2.2.9 Cloretos por volumetria	21
2.2.10 Análise sensorial	21
2.2.11 Análise estatística.....	22
2.3 Resultados e discussão.....	23
2.4 Conclusões.....	48
Referências	49
Capítulo 3 – Determinação do perfil de ácidos gordos do Queijo de Coalho artesanal da Paraíba	52
3.1 Introdução.....	52
3.1.1 Características funcionais do queijo.....	52
3.1.2 Técnica analítica para determinação dos ácidos gordos	60
3.2 Materiais e métodos	62

3.2.1 Amostragem	62
3.2.2 Extrato bruto da gordura.....	62
3.2.3 Determinação do teor de gordura	62
3.2.4 Derivatização dos ácidos gordos totais.....	62
3.2.5 Análise estatística.....	63
3.3 Resultados e discussão.....	63
3.3.1 Correlações	100
3.4 Conclusões.....	103
Referências	105
Capítulo 4 –Caracterização química dos aminoácidos do Queijo de Coalho	109
4.1 Introdução.....	109
4.2 Materiais e métodos	116
4.2.1 Amostragem	116
4.2.2 Extração dos aminoácidos livres.....	116
4.2.3 Determinação de aminoácidos livres por cromatografia iônica.....	116
4.3 Resultados e discussão.....	117
4.4 Conclusões.....	123
Referências	124
Capítulo 5 - Caracterização microbiológica do Queijo de Coalho.....	127
5.1 Introdução.....	127
5.1.1 Microbiologia do queijo.....	127
5.1.2 Identificação molecular dos microrganismos	132
5.2. Materiais e métodos	137
5.2.1 Amostragem	137
5.2.2 Preparação das amostras e isolamento das bactérias ácido-lácticas (BAL)	137
5.2.3 Análise molecular	138
5.3. Resultados e discussão.....	139
5.3.1 População das bactérias ácido-lácticas	139
5.3.2 Identificação das espécies através de PCR-ribotipagem.....	141
5.4 Conclusões.....	155
Referências	156
Capítulo 6 – Correlações entre parâmetros avaliados nos queijos individuais.....	163
6.1 Correlações entre parâmetros de avaliação físico-química e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba.....	163
6.2 Correlações entre os parâmetros de avaliação sensorial e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba.....	164
6.3 Correlações entre parâmetros médios para os queijos da mesma região	166
6.3.1 Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação físico-química por região e as médias dos restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba, por microrregião de produção.....	167
6.3.2 Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação sensorial por região e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba.....	169

Referências	172
Capítulo 7 – Conclusões finais e trabalho futuro	173
ANEXOS.....	1766
Anexo 1 – Ficha de avaliação descritiva utilizada na avaliação das amostras de Queijo de Coalho	176
Anexo 2 - Resultado das bactérias lácticas e não lácticas isoladas nos diferentes queijos.....	177
2.1 - Região de Catolé do Rocha – R1	177
2.2 - Região de Sousa – R2	181
2.3 - Região de Sousa – R3	184
2.4 - Região de Patos – R4	186
2.5 - Região de Itaporanga – R5	190
2.6 - Região de Piancó – R6	193
2.7 - Região da Serra do Teixeira – R7.....	195

Índice de figuras

Capítulo 1

- Figura 1.1:** Zona de concentração de produção de Queijo de Coalho nos estados de Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, adaptado de Amarante (2015). (Fonte: Adaptado de Dia a dia na Educação.) 3
- Figura 1.2:** Mapa representativo das mesorregiões do Estado da Paraíba, Nordeste, Brasil. (Fonte: História da Paraíba, 2010)..... 4
- Figura 1.3:** Fluxograma de fabricação do Queijo de Coalho da Paraíba, adaptado de Aquino (1983) e Travassos (1996). (Fonte: Produzido pelo Autor, 2016) 7

Capítulo 2

- Figura 2.1:** Mesorregião do Sertão do Estado da Paraíba indicando os locais de recolha das amostras de Queijos de Coalho, no período de junho/2013 a outubro/2014. (Fonte: Dados do autor, 2015).. 233
- Figura 2.2:** Comparação das médias do atributo cor amarelada entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 37
- Figura 2.3:** Comparação das médias do atributo aparência molhada entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 37
- Figura 2.4:** Comparação das médias do atributo sabor salgado entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 39
- Figura 2.5:** Comparação das médias do atributo sabor ácido entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 39
- Figura 2.6:** Comparação das médias do atributo textura borrachosa entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 41
- Figura 2.7:** Comparação das médias do atributo textura seca entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 41
- Figura 2.8:** Comparação das médias das avaliações dos atributos quanto à cor amarelada e aparência molhada, entre as amostras de Queijo de Coalho das diferentes regiões da Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 44
- Figura 2.9:** Comparação das médias das avaliações dos atributos quanto ao sabor ácido, textura borrachosa, textura macia e textura seca, entre as amostras de Queijo de Coalho das diferentes regiões da Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 45
- Figura 2.10:** Médias dos atributos da análise sensorial com diferença significativa por região e dias de maturação A – Aparência molhada; B – Sabor ácido; C – Textura macia; D – Textura borrachosa; E – Textura seca; F – Sabor queijo fresco (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$). 46

Capítulo 3

Figura 3.1: Estrutura dos ácidos linoleico e alfa-linolénico. (Fonte: Martin et.al., 2006).	53
Figura 3.2: Componentes de um aparelho de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS). (Fonte: Best images of diagram of the GC MS, 2016).	61
Figura 3.3: Perfil cromatográfico do padrão de ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) utilizado na identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes nas amostras de Queijo de Coalho.	66
Figura 3.4: Perfil de ácidos gordos identificados em Queijo de Coalho da Paraíba (amostra R1A1, microrregião de Catolé do Rocha, São Bento).....	69
Figura 3.5:. Ácidos gordos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), di-insaturados (AGDI) e polinsaturados (AGPI) presentes nas amostras do Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.	76
Figura 3.6:. Ácidos gordos maioritários (C14:0a, C16:0a, C18:1a, C18:1b, C18:0 e C18:2b) do perfil de ácidos gordos do Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba. ...	97
Figura 3.7:. Ácidos gordos di-insaturados C18:2d, C18:2a, C18:2b, C18:2c, C21:2 e C23:2 identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.....	98
Figura 3.8: Ácidos gordos monoinsaturados com pequena concentração identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.	99
Figura 3.9: Ácidos gordos polinsaturados C19:6, C19:3, C20:5, C20:4, C20:3a, C20:3b, AGPI1, AGPI2, C22:6 e AGPI3 identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.	100
Figura 3.10: Coeficientes de correlação de Pearson para os pares de ácidos gordos cuja concentração relativa apresenta correlações fortes ou muito fortes	102

Capítulo 4

Figura 4.1: Proteólise e degradação dos aminoácidos decorrentes da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1-descarboxilação; 2-transaminações; 3-desaminações oxidativas; 4-degradações; 5-reduções; 6-oxidações.	111
Figura 4.2: Perfil de padrões cromatográficos utilizados na avaliação das concentrações de aminoácidos livres por HPLC com detecção eletroquímica.....	117
Figura 4.3: Perfil cromatográfico da amostra R2A1, no qual se identificam possíveis interferentes.	119
Figura 4 4: Concentrações dos aminoácidos lisina, glutamina, alanina, treonina, glicina, valina, isoleucina e leucina, nas amostras individuais dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Brasil.	120
Figura 4.5: Concentrações dos aminoácidos metionina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, tirosina e triptofano, nos queijos das diferentes microrregiões.....	122
Figura 4.6: Concentrações médias dos aminoácidos livres identificados nos Queijos de Coalho produzidos nas mesmas microrregiões.....	123

Capítulo 5

Figura 5.1: População de cocos mesofílicos, cocos termofílicos e bastonetes isolados de Queijo de Coalho da Paraíba expresso em número de colónias por amostra (Fonte: Dados do autor, 2015). .	141
Figura 5.2: Produto da PCR em gel de agarose à 1,2% separado através de eletroforese (PM: peso molecular 500pb; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo; Amostras: 03 a 20). (Fonte: Dados do Autor, 2015).	142

Figura 5.3: Eletroferograma de uma das amostras sequenciadas, indicando o valor de Phred. (Fonte: Dados do Autor, 2015).	142
Figura 5.4: Distribuição por microrregião das BAL isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba.	148

Capítulo 6

Figura 6.1: Coeficientes de correlação de Pearson $\geq 0,6$ entre concentrações de ácidos gordos individuais e o número de colônias de microrganismos individuais ou agrupados por gênero.	166
Figura 6.2: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre parâmetros de avaliação sensorial e concentrações de ácidos gordos individuais, com nível de significância de 0,01 ou 0,05.	170
Figura 6.3: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre os parâmetros sabor a queijo fresco, sabor a manteiga, sabor salgado e sabor ácido e as concentrações de ácidos gordos individuais, com nível de significância de 0,01 ou 0,05.	1711

Índice de tabelas

Capítulo 2

Tabela 2.1: Referências sobre valores médios dos principais componentes da análise físico-química do Queijo de Coalho produzido nos estados do Nordeste.....	15
Tabela 2.2: Região, código, cidade de origem, local de aquisição e período de maturação do Queijo de Coalho produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.	18
Tabela 2.3: Descritores e padrões utilizados na análise quantitativa descritiva do Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil. (Fonte: Adaptado de Perez, 2005)	22
Tabela 2.4: Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos: pH, acidez, humidade, proteína, gordura, cinzas e cloretos dos Queijos de Coalho produzidos nas microrregiões do Sertão da Paraíba.	25
Tabela 2.5: Classificação das amostras de Queijo de Coalho artesanal produzidos no Sertão da Paraíba, de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (GES).	28
Tabela 2.6: Médias e desvios-padrão das propriedades físico-químicas dos Queijos de Coalho produzidos no Sertão da Paraíba por região de produção.	31
Tabela 2.7: Médias e desvio-padrão das propriedades físico-químicas por dias de maturação dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.....	33
Tabela 2.8: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.	35
Tabela 2.9: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho por regiões, produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil	43
Tabela 2.10: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho por dias de maturação, produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.	43
Tabela 2.11: Coeficientes de Correlação de Pearson entre variáveis da composição físico-química e atributos da análise sensorial do Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil, que apresentaram correlações fortemente positivas.....	47

Capítulo 3

Tabela 3.1: Referências, tipo de queijo, maturação e concentração dos ácidos gordos saturados isolados de vários tipos de queijos.....	57
Tabela 3.2: Referências, maturação e concentração dos ácidos gordos mono e polinsaturados isolados de vários tipos de queijos.	58
Tabela 3.3: Referência dos resultados de ácidos gordos agrupados por tamanho das cadeias e tipo de ligação isolados de queijos.....	59
Tabela 3.4: Identificação do tempo de retenção e concentração dos 37 ésteres metílicos do padrão (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) nas condições cromatográficas utilizadas.	67
Tabela 3.5: Identificação dos 57 ácidos gordos identificados nos Queijos de Coalho da Paraíba, do respectivo ião molecular e da respetiva janela de retenção.	70
Tabela 3.6: Concentrações relativas de ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.	73

Tabela 3.7: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados de Queijos de Coalho produzidos na mesma microrregião.....	75
Tabela 3.8: Médias e desvios padrão das concentrações de ácidos gordos saturados de C6:0 a C14:0a identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil. .	77
Tabela 3.9: Médias e desvios padrão das concentrações de ácidos gordos saturados de C15:0d a C17:0a identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.....	78
Tabela 3.10: Médias e desvios padrão de ácidos gordos saturados de C18:0 a C24:0 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.....	80
Tabela 3.11: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C6:0 a C14:0a identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.	83
Tabela 3.12: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C15:0d a C17:0a identificados no Queijo de Coalho produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.	83
Tabela 3.13: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C18:0 a C24:0a identificados no Queijo de Coalho produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.	84
Tabela 3.14: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos monoinsaturados de C9:1 a C17:1 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.	86
Tabela 3.15: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos monoinsaturados de C18:1a a C22:1 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.	87
Tabela 3.16: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos di-insaturados de C18:2d a C23:2 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.	90
Tabela 3.17: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos poliinsaturados de C19:6a a AGPI3 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.	943
Tabela 3.18: Coeficientes de Correlação de Pearson entre as concentrações médias dos ácidos gordos agrupados por grupo funcional, e avaliadas para os queijos de Coalho individuais ou para os grupos de queijos de cada microregião.....	101

Capítulo 4

Tabela 4.1: Referências e concentração dos aminoácidos livres isolados de queijos de vários países.	115
Tabela 4.2: Ordem de eluição dos aminoácidos estudados e retas de calibração utilizadas na determinação da sua concentração.	118

Capítulo 5

Tabela 5.1: Referências sobre as técnicas moleculares aplicadas na identificação de microrganismos em leite e seus derivados.....	134
Tabela 5.2: Média e desvio padrão de BAL (UFC/g) de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.....	140
Tabela 5.3: Espécies de BAL isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.....	144
Tabela 5.4: Espécies de bactérias não ácido-lácticas isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.....	152

Capítulo 6

Tabela 6.1: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação físico-química dos queijos individuais e os restantes parâmetros de avaliação considerando os ácidos gordos agrupados em grupos funcionais e os microrganismos em géneros.....	163
Tabela 6.2: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação físico-química e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e das colónias individuais.....	164
Tabela 6.3: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e do número de colónias de microrganismos individuais.....	165
Tabela 6.4: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre as médias dos parâmetros físico-químicos, as médias da avaliação sensorial e as médias das concentrações de ácidos gordos agrupados por grupo funcional e as médias do número de colónias agrupadas por género.....	167
Tabela 6.5: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre as médias dos parâmetros físico-químicos e as concentrações medias relativas dos ácidos gordos individuais e dos micro-organismos individuais.....	168
Tabela 6.6: Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação sensorial e o número de colónias de microrganismos individuais e agrupados por género.....	169

Anexo 2

Tabela A2.1.1: BAL e BNL para a região R1A1.....	177
Tabela A2.1.2: BAL e BNL para a região R1A2.....	178
Tabela A2.1.3: BAL e BNL para a região R1A3.....	179
Tabela A2.1.4: BAL e BNL para a região R1A4.....	180
Tabela A2.2.1: BAL e BNL para a região R2A1.....	181
Tabela A2.2.2: BAL e BNL para a região R2A2.....	182
Tabela A2.2.3: BAL e BNL para a região R2A3.....	183
Tabela A2.2.4: BAL e BNL para a região R2A4.....	184
Tabela A2.3.1: BAL e BNL para a região R3A1.....	184
Tabela A2.3.2: BAL e BNL para a região R3A2.....	185
Tabela A2.3.3: BAL e BNL para a região R3A3.....	185
Tabela A2.3.4: BAL e BNL para a região R3A4.....	186

Tabela A2.4 1: BAL e BNL para a região R4A1.	186
Tabela A2.4 2: BAL e BNL para a região R4A2.	187
Tabela A2.4.3: BAL e BNL para a região R4A3.	188
Tabela A2.4.4: BAL e BNL para a região R4A4.	189
Tabela A2.5.1: BAL e BNL para a região R5A1.	190
Tabela A2.5.2: BAL e BNL para a região R5A2.	191
Tabela A2.5 3: BAL e BNL para a região R5A3.	192
Tabela A2.5.4: BAL e BNL para a região R5A4.	192
Tabela A2.6.1: BAL e BNL para a região R6A1.	193
Tabela A2.6 2: BAL e BNL para a região R6A2.	194
Tabela A2.6.3: BAL e BNL para a região R6A3.	194
Tabela A2.6.4: BAL e BNL para a região R6A4.	195
Tabela A2.7 1: BAL e BNL para a região R7A1.	195
Tabela A2.7.2: BAL e BNL para a região R7A2.	196
Tabela A2.7.3: BAL e BNL para a região R7A3.	196
Tabela A2.7.4: BAL e BNL para a região R7A4.	197

Lista de abreviaturas

ADH – Ácido Docosahexanóico
ADN – Ácido Desoxirribonucleico
ADQ – Análise Descritiva Quantitativa
AEP – Ácido Eisosapentaenóico
AGDI – Ácidos Gordos Di-insaturados
AGI – Ácidos Gordos Insaturados
AGMI – Ácidos Gordos Monoinsaturados
AGPI - Ácidos Gordos Polinsaturados
AGPI1 – Ácido Gordo Polinsaturado 1
AGPI2 - Ácido Gordo Polinsaturado 2
AGPI3 - Ácido Gordo Polinsaturado 3
AGS – Ácidos Gordos Saturados
ANCOVA – Análise de Co-variância
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*
ARN – Ácido Ribonucleico
BAC – Bacilos ou Bastonetes
BAL – Bactérias Ácido Lácticas
BAL-Total – Bactérias Lácticas Totais
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BNL-Total – Bactérias Não Lácticas Totais
BOX-PCR – *Fingerprinting for PCR*
CE – Ceará
CLA – Ácido Linoleico Conjugado
CM – Cocos Mesófilos
CT – Cocos Termófilos
DCTB – Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa
DGGE – *Desaturin Gradient Gel Electrophoresis*
DHA – Ácido Docosahexaenóico
DP – Desvio Padrão
EcFm – *Enterococcus faecium*
EcGa – *Enterococcus gallinarum*
EcYt – *Enterococcus italicus*
EGB – Extrato Bruto de Gordura
EICE - *Escherichia coli* enteroinvasiva
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
EPEC – *Escherichia coli* enteropatogénica

ERIC-PCR – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigénica
FAAs – Aminoácidos Livres
FAME Mix – Mistura de Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
FCT – Faculdade de Ciências e Tecnologia
FFA – Ácidos Gordos Livres
GC-MS – Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa; *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*
GES – Gordura no Extrato Seco
H₂SO₄ – Ácido sulfúrico
HgO – Óxido de mercúrio
HPLC – Cromatografia Gasosa de Alta Eficiência; *High performance Liquid Chromatography*
IG – Indicação Geográfica
IN – Instrução Normativa
LbDI – *Lactobacillus delbrueki*
LbFe – *Lactobacillus fermentum*
LbPe – *Lactobacillus pentosus*
LbPI – *Lactobacillus plantarum*
LbPP – *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*
LbRh – *Lactobacillus rhamnosus*
LbSp – *Lactobacillus* spp.
LCFA – Ácidos Gordos de Cadeia Longa
LcL – *Lactococcus lactis*
LcLL – *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
LH-PCR- *Length Heterogeneity PCR*
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
MCFA – Ácidos Gordos de Cadeia Média
MRS – Man, Rogosa e Sharpe
MUFA – Ácidos Gordos Monoinsaturados
Na₂SO₄ - Sulfato de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
NaOH – Hidróxido de sódio
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase; *Polymerase Chain Reaction*
PE – Pernambuco
PFGE – *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*
pH – Potencial Hidrogeniónico
PT – Portugal
PTASN – Azoto Solúvel em Ácido Fosfotungsténico

PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados
qPCR – PCR em tempo real
R1 – Catolé do Rocha
R2 – Cajazeiras
R3 – Sousa
R4 – Patos
R5 – Piancó
R6 – Itaporanga
R7 – Serra do Teixeira
RAPD-PCR – *Random Amplification of Polymorphic DNA for PCR*
rARN – ARN ribossómico
REP-PCR – *Repetitive Element Polidromic for PCR*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
SCFA – Ácidos Gordos de Cadeia Curta
SDA – Secretaria da Defesa Agropecuária do Brasil
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
SETDE – Secretaria de Estado do Turismo e do Desenvolvimento Económico
SFA – Ácidos Gordos Saturados
SIF – Serviço de Inspeção Federal
SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*
StAg – *Streptococcus agalactiae*
StII – *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*
StTh – *Streptococcus thermophilus*
StUb – *Streptococcus uberis*
TAP-PCR – *Transcriptionally Active PCR*
TCA – Ácido Tricloroacético
TCASN – Azoto Solúvel em Ácido Tricloroacético
TEAC - Capacidade Antioxidante Total Equivalente ao Trolox
TN – Azoto Total
TTGE – *Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis*
UFC – Unidade Formadora de Colónia
UFCG – Universidade Federal de Campina Grande
UNL – Universidade Nova de Lisboa
UV-Vis – Detetor Ultravioleta/Vsível
WSN – Azoto Solúvel em Água
WSP – Extrato Proteico Solúvel em Água

CAPÍTULO 1

Introdução geral

“O queijo é o leite na idade adulta.” Esta frase de Richard Condon traduz a importância do leite na qualidade do queijo. O leite, que é a matéria-prima do queijo, consiste numa emulsão de finas partículas sólidas em água, na qual se encontram dissolvidos numerosos componentes orgânicos e inorgânicos. Os principais componentes do leite são proteínas (caseína, albumina e globulina), hidratos de carbono (lactose), sais minerais e vitaminas (Amarante, 2015).

O leite é considerado um alimento completo com elevado valor biológico na alimentação do homem. Para preservar as suas características físicas, químicas e nutricionais, o leite deve ser obtido em condições higiénicas adequadas e mantido sob refrigeração desde a ordenha até à sua pasteurização ou utilização (Freitas, 2011).

Os queijos de leite cru são fabricados artesanalmente de modo tradicional, a partir de leite não pasteurizado. Todos os queijos no mundo eram originalmente fabricados a partir de leite cru, ou seja, de forma artesanal, como os famosos queijos *camembert*, *brie*, *roquefort* e *mozzarella*. Atualmente, esses queijos são produzidos de forma industrial com leite pasteurizado (Podestà, 2015).

Os queijos industrializados são produzidos em grande escala, a partir da recolha de leite de vários produtores. Durante o seu processamento, o leite é pasteurizado, um processo que consiste em aquecer o leite a 62 °C durante cerca de 30 minutos. Este processo tem por objetivo eliminar bactérias indesejáveis, como as patogénicas, no entanto, provoca também a desnaturação proteica, alterando o sabor, e elimina bactérias lácticas benéficas, responsáveis pelas características especiais dos queijos tradicionais (Podestà, 2015).

No Brasil existem queijos artesanais feitos com leite cru, fabricados há dezenas ou centenas de anos em pequena escala, por pequenos produtores rurais, em diversas regiões. São exemplos desses queijos os queijos artesanais Canastra, Salitre, Araxá e Serro produzidos em Minas Gerais, os queijos Colonial e Serrano produzidos no Sul do Brasil, os Queijos de Coalho e de Manteiga (ou Requeijão) produzidos no Nordeste, e o queijo Marajó produzido no Pará (Podestà, 2015).

Em estudos realizados com queijos tradicionais, Montel *et al.* (2014) analisando os riscos e os benefícios associados com a microbiota diversificada que existe principalmente em queijos de leite cru, descrevem a associação da análise sensorial, higiene e os possíveis benefícios para a saúde. A diversidade microbiana e os benefícios do queijo de leite cru dependem da microbiota do leite e das práticas tradicionais de produção, incluindo as práticas de inoculação. Mais de 400 espécies de bactérias ácidas lácticas (BAL), *gram* positivas e *gram* negativas têm sido identificadas em leite cru e nos queijos produzidos a partir deste tipo de leite.

A produção de queijo artesanal é considerada como uma estratégia de propagação de atividades tradicionais, com repercussões sociais e económicas e que é assegurada essencialmente pelos

agricultores familiares. Por não cumprir a legislação vigente, elaborada em meados do século passado, o queijo artesanal é inserido no mercado informal. Neste sentido, tem-se discutido no Brasil, a necessidade da criação de normas direcionadas ao setor artesanal na produção de queijos, de forma a revalorizar a cultura queijeira, agregar valor à produção e oferecer alimentos seguros à população (Menezes, 2011).

O Queijo de Coalho é entendido como um alimento identitário, produzido e consumido no espaço geográfico nordestino e identificado pelos migrantes que consomem este produto como uma aproximação ao seu território. O Queijo de Coalho é assim considerado um património da população nordestina (Menezes, 2011). A origem do termo 'Queijo de Coalho' deve-se ao uso de coalho natural (não industrial) na sua produção, retirado do estomago de bezerros ou outros animais silvestres (Amarante, 2015).

Santos e colaboradores (2012) analisando o documentário "O mineiro e o queijo", na sua pesquisa com alimentos tradicionais produzidos artesanalmente no Brasil, evidenciaram que a produção tradicional envolve valores como identidade, cuidado com o produto e com o ambiente natural, o que não se observa na produção pelas grandes indústrias. Ainda de acordo com os mesmos autores, o Brasil aponta para a necessidade de implementar medidas de valorização dos seus produtos artesanais, segundo uma visão "mediterrânica", adotada principalmente por França, Itália, Espanha, Portugal e Grécia, e que considera a qualidade sob um prisma mais amplo e a relaciona com aspetos sensoriais, éticos, sociais e ambientais.

1.1 Produção mundial e nacional de queijo

De acordo com dados de 2012, o *ranking* dos países produtores de queijo é liderado pelos Estados Unidos com quase cinco milhões de toneladas/ano, seguido pela Alemanha, França e Itália. O Brasil ocupa o segundo lugar do continente americano com 700 mil toneladas/ano. Apesar desta posição de destaque, o Brasil ocupa a última posição quanto ao consumo *per capita*, com 3,6 kg/hab (dados de 2012), enquanto a França ocupa o primeiro lugar com 26,2 kg/hab (Amarante, 2015).

Na Europa, a Alemanha foi o país que mais produziu queijo em 2010 (2 milhões de toneladas), seguida pela França e pela Itália, com cerca de 2 milhões e 1 milhão de toneladas de queijo, respetivamente (FAO, 2012).

De acordo com Amarante (2015), o rebanho de vacas leiteiras das Américas ocupa o terceiro lugar mundial, com 51.079 mil cabeças, sendo ultrapassado pela Ásia com 106.413 mil cabeças e pela África com 64.833 mil cabeças. No Brasil o rebanho é formado por 23.730 mil cabeças, sendo considerado o maior rebanho das Américas.

O leite não é apenas comercializado na forma líquida, podendo ser convertido em diversos produtos derivados como o leite em pó, o iogurte e os queijos (Viana, 2009).

De acordo com Perry (2004), no Nordeste do Brasil, a maior parte da produção de Queijo de Coalho é realizada em pequenas e médias queijarias, as quais movimentam, mensalmente, algo em torno de 10 milhões de reais, o que sinaliza esta atividade como importante no contexto social e económico da região.

O Queijo de Coalho é considerado um produto tipicamente nordestino, produzido em quase todos os estados, mas principalmente em Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte e Pernambuco (Aquino, 1983; Amarante, 2015) (Figura 1.1). Este último estado é responsável por cerca de 40% do mercado nacional.



Figura 1.1: Zona de concentração de produção de Queijo de Coalho nos estados de Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, adaptado de Amarante (2015). (Fonte: Adaptado de *Dia a dia na Educação*.)

No Nordeste, a produção de Queijo de Coalho artesanal representa uma atividade econômica importante na cultura e na renda familiar (Menezes, 2011). Originalmente produzido nos estados do Nordeste do Brasil a partir de leite cru, o Queijo de Coalho tem vindo a conquistar espaço e interesse nas outras regiões do Brasil.

Apesar da sua difusão regional e importância na economia local, não há estatísticas oficiais da produção do Queijo de Coalho artesanal no estado de Paraíba. Os dados oficiais apresentados sobre a produção do Queijo de Coalho faz referência aos estabelecimentos registrados com Serviço de Inspeção Federal-SIF ou Serviço de Inspeção Estadual-SIE (Viana, 2009; EMBRAPA, 2008).

A Figura 1.2 apresenta a divisão de Paraíba em mesorregiões, de acordo com a classificação estabelecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no que diz respeito aos aspetos económicos, sociais e políticos, compreendendo a Zona da Mata Paraibana, Agreste Paraibano, Borborema e Sertão (História da Paraíba, 2010).

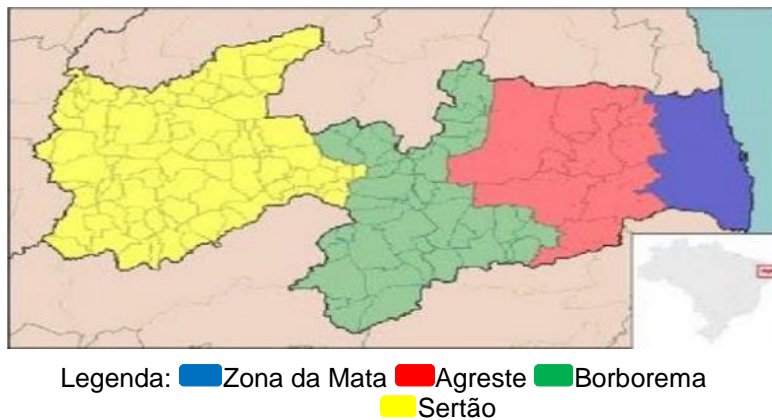


Figura 1.2: Mapa representativo das mesorregiões do Estado da Paraíba, Nordeste, Brasil. (Fonte: *História da Paraíba, 2010*).

Na mesorregião do Sertão Paraíbano a produção de leite bovino abrange cerca de 80 municípios. Com uma produção diária de 100 mil litros de leite, o Sertão produz cerca de 45% de todo o leite do estado.

A Secretaria de Estado do Turismo e do Desenvolvimento Económico (SETDE), através do Ministério do Desenvolvimento da Indústria e Comércio Exterior registra a existência 842 queijeiras no Sertão da Paraíba (SETDE, 2008). A cidade de Sousa é responsável por mais da metade do leite produzido no Sertão da Paraíba, com cerca de 60 mil litros de leite por dia (Amarante, 2015).

Bouma e co-autores (2014), estudaram os custos operativos iniciais de empresas de queijos artesanais e verificaram que a falta de dados económicos válidos no mercado de queijos artesanais é um impedimento sério para o desenvolvimento de um plano de negócio realístico e para a obtenção de financiamento. Com base em entrevistas de fornecedores de queijos artesanais foi proposto um modelo económico para prever a base de custos da instalação de uma produção de Queijo de Coalho tendo em consideração variáveis como, processo de produção, volume e frequência de produção, tipo de queijo, tipo de leite e custos, despesas de trabalho e financiamento. É provável que os elevados custos iniciais e os custos operacionais permaneçam como barreira de entrada para empresários de queijos artesanais.

Apesar da sua importância económica e grande popularidade, a fabricação de Queijo de Coalho não apresenta um processo tecnológico otimizado, apropriado para a melhoria de sua qualidade. É necessário que o processo tradicional, geralmente artesanal e a partir de leite cru, acompanhe a evolução das técnicas nas queijarias mediante modificações já utilizadas na tecnologia de outros queijos nacionais e internacionais.

1.2 História da origem do Queijo de Coalho

O Queijo de Coalho é de origem tipicamente brasileira, especificamente do sertão do Nordeste. O início da produção deste queijo remonta à chegada do rebanho bovino trazido pelos portugueses. Segundo relatos tradicionais os vaqueiros ao percorrerem longas distâncias carregando leite em mochilas (matulão) fabricadas com o estômago de animais jovens, observaram que o leite coagulava e a massa resultante era saborosa, dando origem ao Queijo de Coalho (Amarante, 2015).

O queijo é um produto elaborado a partir da coalhada de leite de animais, ou seja, um concentrado proteico-gorduroso, através da coagulação da caseína por ação de enzimas (Amarante, 2015).

A economia paraibana tem como base, de modo geral, os setores de serviços, agricultura, indústria, principalmente a alimentícia, têxtil e a pecuária, onde se destaca a criação de bovinos nas microrregiões de Sousa e Borborema (Luíz, 2014).

A produção animal paraibana teve início no Litoral, mas foi no Sertão que mais se expandiu com a criação do sistema extensivo. A criação de bovinos é a mais representativa correspondendo a aproximadamente 90% do total da produção de animais de grande porte. A maior concentração de unidades de produção ocorre na microrregião de Sousa e a menor nas microrregiões do Seridó e Litoral Sul. A criação de bovinos do Estado destina-se à produção de carne e leite, sendo esta destinada a atender os laticínios e, principalmente, as queijarias para produção do Queijo de Coalho e de manteiga que estão espalhadas por todo o estado.

1.3 Classificação e processamento do Queijo de Coalho

Entende-se por Queijo de Coalho aquele que se obtém por coagulação do leite por meio do coalho ou por outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. É um queijo de média a alta humidade, de massa semi-cozida ou cozida que apresenta um teor de gordura variável nos sólidos totais entre 35% e 60% (SDA, 2001).

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, os queijos podem ser classificados de acordo com o grau de humidade em queijos frescos com massa mole (> 55%) e massa macia (46-54,9%), massa semidura (36-45,9%) e massa dura (<36%).

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho (MAPA, 1996), o Queijo de Coalho sendo considerado um queijo fresco, é consumido com até 10 (dez) dias de fabricação e classificado como queijo de massa prensada, semi-dura, não cozida ou semi-cozida, e com casca natural. A prensagem é feita em panos cuja textura fica visivelmente impressa na massa do queijo. A coloração dos queijos de massa não cozida é mais esbranquiçada diferindo dos de massa semi-cozida que têm uma cor amarelada (Amarante, 2015)

De acordo com a Portaria 73 de 01 de fevereiro de 1990, do Ministério do Planeamento e Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo de Portugal, queijo é definido como um produto alimentar fresco ou curado, de consistência variável

(dependendo do processo e condições de produção, origem do leite, ingredientes utilizados, entre outros fatores), obtido por coagulação e dessoramento do leite (leite total ou parcialmente desnatado) e da nata, do leite bem como da mistura de alguns ou de todos estes produtos, incluindo o lactossoro, sem ou com adição de outros géneros alimentícios (Portaria 73/90, 1990). Este produto pode ser classificado quanto à cura, à composição, à consistência e quanto à matéria gorda.

Quanto à cura, o queijo pode ser classificado segundo a Portaria 73/90 de 1 de fevereiro como:

a) Queijo curado – que é aquele que só se encontra apto para consumo depois de mantido durante um certo tempo em condições determinadas de temperatura, humidade e ventilação, as quais permitam as modificações químicas e físicas características;

b) Queijo curado por ação de bolores – que são os queijos cujas características são devidas à proliferação de bolores específicos no interior e/ou superfície do queijo;

c) Queijo fresco – que é o queijo obtido por coagulação e dessoramento do leite por fermentação láctica, com ou sem adição de coalho e não submetido a um processo de cura. Este tipo de queijo deve ser fabricado obrigatoriamente com leite pasteurizado.

Segundo a legislação portuguesa o queijo é classificado em função da sua percentagem de humidade, podendo ser de pasta mole, semi-mole, de pasta semidura, de pasta dura e extra-dura (Portaria 73/90, 1990).

Quanto à matéria gorda, o queijo é classificado em função da sua percentagem no extrato seco, dividindo-se em cinco categorias: Muito gordo ou extra gordo, com uma percentagem de matéria gorda superior a 60%; Gordo (45-60%); Meio gordo (25 a 45%); pouco gordo (10 a 25% de matéria gorda); magro, com um valor máximo de 10% (Portaria 73/90, 1990).

Segundo a Portaria nº 146/96 do MAPA, o Queijo de Coalho deve ser elaborado com leite integral ou padronizado a 3% de matéria gorda, submetido à pasteurização ou tratamento equivalente (MAPA, 1996). A maior parte da produção nos estados do Nordeste ainda é tradicional e artesanal, utilizando leite de vaca cru, coalho natural e sal, sem adição de fermentos (Amarante, 2015).

Segundo a Secretaria da Defesa Agropecuária do Brasil (SDA), o processo de fabricação do Queijo de Coalho na Paraíba apresenta pequenas diferenças entre produtores ou queijeiras, tratadas como “segredos bem guardados”, que buscam dar uma especificidade ao produto. Cerca de 67% do processo produtivo é artesanal e 31% é semi-artesanal. Quanto ao leite, mais de 76% das queijeiras não pasteurizam o leite para fabricarem o queijo (SDA, 2001).

O fluxograma de fabricação do Queijo de Coalho na Paraíba apresentado na Figura 1.3 foi adaptado de Aquino (1983) e Travassos (1996). As etapas do processo de fabricação são receção, filtragem e pesagem do leite integral cru; adição de coalho comercial; repouso por 40 minutos; corte da coalhada; repouso; aquecimento da coalhada (realizada por alguns produtores); dessoragem; enformagem e prensagem; salga (podendo ser realizada na massa da coalhada ou na superfície do queijo); embalagem e armazenamento (temperatura ambiente ou refrigeração).

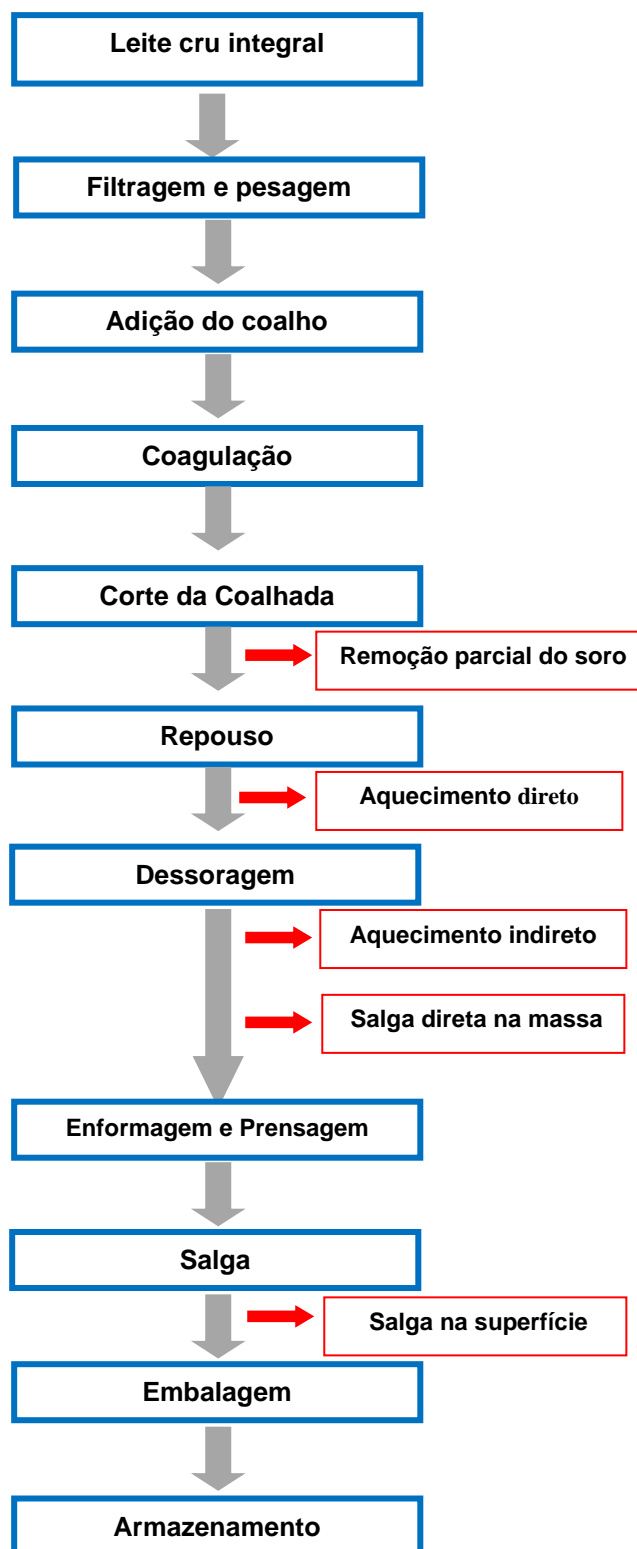


Figura 1.3: Fluxograma de fabricação do Queijo de Coalho da Paraíba, adaptado de Aquino (1983) e Travassos (1996). (Fonte: Produzido pelo Autor, 2016)

O processo de elaboração do Queijo de Coalho apresenta características distintas que podem ocorrer na coagulação, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa (cozida ou semi-cozida) ou não (massa crua), salga, prensagem, embalagem ou armazenamento. No entanto, a principal característica almejada na sua fabricação é impedir que ele derreta quando for cozido, frito ou assado (Amarante, 2015).

Para produzir um quilo de Queijo de Coalho são usados em média dez litros de leite (SDA, 2001).

As características principais que definem este queijo são as seguintes: crosta fina, sem trinca, geralmente sem formação de casca definida, cor branco-amarelada uniforme, com ou sem algumas olhaduras pequenas, odor levemente ácido (semelhante a massa coagulada), sabor brando, ligeiramente ácido, sabor salgado leve ou acentuado, range nos dentes quando mastigado e aspeto tostado da superfície quando assado ou frito. Comercialmente é encontrado no formato cilíndrico, retangular ou na forma de espetos (Amarante, 2015).

Segundo Nassu *et al.* (2003), a falta de critérios de qualidade da matéria-prima e das técnicas de processamento conduz a que este queijo se classifique no mercado como um produto de baixa qualidade, tanto a nível higiénico e sanitário como pela falta de padronização do produto, e isto deve-se ao processo de fabricação que é relativamente simples.

A Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996, determina que todo o queijo deva ser processado com leite pasteurizado, eliminando desta forma um perigo potencial para a saúde do consumidor (MAPA, 1996). Recentemente, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011 que normaliza a produção de queijo a partir de leite cru, com período de maturação inferior a 60 dias, mas, para tanto, define regras muito claras e exigentes a serem cumpridas, com o objetivo de garantir a qualidade do produto e atender aos aspetos de higiene e proteção a saúde do consumidor (MAPA, 2011).

O MAPA nos últimos anos tem vindo a estimular o registo de produtos e serviços agropecuários através da Indicação Geográfica (IG). A IG visa promover a agregação de valor, a preservação das tradições e a valorização da cultura protegendo a origem, local ou regional, dos produtos típicos. Para solicitar a IG, são exigidos alguns requisitos como, conhecer as características do produto quanto ao processo de produção, características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais, bem como, a qualidade do produto, compreendendo, portanto, a necessidade de pesquisas para a caracterização do produto e uma legislação estadual que regule o produto quanto às matérias-primas e seu processamento.

Dos principais estados do Nordeste produtores de Queijo de Coalho, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Norte conseguiram a IG para este produto. Até ao momento, a Paraíba possui a IG para a cachaça, coco, abacaxi, arroz vermelho e *citrus* mas, não apresentou uma proposta de regulamentação para o Queijo de Coalho.

1.4 Caracterização química e nutricional dos queijos artesanais

O estudo da composição dos queijos visa identificar e quantificar os seus principais componentes químicos e relacioná-los com as propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais destes produtos.

De entre os vários nutrientes que os compõem, os queijos constituem uma importante fonte de ácido linoleico, ácido linoleico conjugado (CLA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (Wijendram e Hayes, 2004).

O ácido linoleico (C18:2) é um ácido gordo essencial para humanos, especialmente no crescimento, desempenhando um papel benéfico para a saúde geral do homem (Choque *et al.*, 2014). O ácido araquidónico é um dos seus metabolitos, que é um precursor de prostaglandinas e outros compostos fisiologicamente importantes (Shimizu *et al.*, 2014). No entanto, este ácido pode reduzir a conversão do ácido α -linolénico em ácidos gordos polinsaturados, como por exemplo, EPA e DHA, tornando-se prejudicial para saúde, por estar associado à promoção de estados inflamatórios (Choque *et al.*, 2014).

O ácido eicosapentaenóico, EPA, é um dos principais componentes das membranas neuronais e desempenha várias funções, como a modulação da plasticidade e química sináptica assim como a modulação e proteção neurológica (Wu e He, 2014). Este composto também contribui para a redução do colesterol e na prevenção e tratamento de aterosclerose (Ma *et al.*, 2014).

O ácido docosahexaenóico, DHA, presente nas membranas das células do sistema nervoso central, atua como neuroprotetor, além da modulação da plasticidade e química sináptica (Wu e He, 2014).

Além destes ácidos gordos, o ácido linoleico conjugado (CLA), pode ser encontrado em queijo (Parodi, 2003). Segundo Draper *et al.* (2014) o CLA na forma *cis*-9, *trans*-11 é a que ocorre naturalmente em produtos alimentares, podendo ser encontrada na fração lipídica de carnes, leite e produtos lácteos.

As características sensoriais do Queijo de Coalho têm vindo a ser pesquisadas com o intuito de identificar diferenças sensoriais entre os Queijos de Coalho produzidos a partir de leite cru e pasteurizado. Alguns estudos demonstraram a existência de uma potencial relação entre a presença de determinados microrganismos e a produção de determinados compostos, como ácidos orgânicos e ácidos gordos, em particular o CLA.

Assim como os ácidos gordos e os ácidos orgânicos, os aminoácidos estão envolvidos no desenvolvimento do sabor e aroma dos queijos. Reações enzimáticas, promovidas ou não por bactérias lácticas, envolvendo compostos desde proteínas até aminoácidos livres estão associados com a produção de componentes responsáveis pelo aroma e sabor dos queijos.

Estudos realizados por Silva *et al.* (2012) mostraram que Queijos de Coalho artesanais brasileiros de seis cidades do Nordeste foram investigados como alimentos funcionais com base nos seus perfis peptídicos e antioxidantes profiláticos, teores de zinco e atividades antimicrobianas. Os peptídeos do Queijo de Coalho apresentaram elevada atividade antioxidante, e o melhor valor de TEAC sendo $2223 \pm 10.10 \mu\text{M}$, que significa $91.1 \pm 0.4\%$ de inibição oxidativa. O extrato proteico solúvel em água (WSP) apresentou atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Todos os resultados obtidos sugeriram que o Queijo de Coalho tem potencial como um alimento funcional.

Alguns alimentos contêm substâncias que para além de uma função nutricional definida, de natureza estrutural ou energética, apresentam também um significativo efeito positivo no equilíbrio metabólico do organismo e na saúde em geral. Entre estas substâncias encontram-se os aminoácidos livres (FAAS), os ácidos gordos polinsaturados e diversos outros componentes dos queijos (Diana, 2014).

Mangia (2008), por exemplo, relatou a influência das BAL selecionadas sobre as características microbiológicas e físico-químicas durante o período de maturação do queijo Fiore Sardo, em particular a evolução de aminoácidos livres, ácidos gordos livres (FFAs) e da microflora do queijo. Helinck (2004) pesquisando sobre BAL termofílicas e compostos aromáticos relatou associação *in vitro* de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* na produção de compostos que contribuem com o aroma a partir de três aminoácidos, leucina, fenilalanina e metionina.

1.5 Caracterização microbiológica de queijos artesanais

O processo de pasteurização do leite é fundamental para garantir a sua segurança alimentar, mas elimina também a microbiota nativa do leite, obrigando à utilização de fermentos industriais. Esta alteração tem consequências nas propriedades organolépticas do queijo, pois mudanças na flora microbiana resultam na formação de diferentes metabolitos nomeadamente ácidos gordos, aminoácidos, ácidos orgânicos, compostos voláteis e não voláteis e outros.

Riquelme *et al.* (2015) realizaram o primeiro estudo nas comunidades bacterianas em queijo do Pico, um queijo tradicional de Portugal, feito de leite de vaca cru, para elucidar possíveis diferenças entre marcas de queijo e tempo de maturação. Revelou-se uma alta diversidade bacteriana no queijo do Pico (*Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes*). O género predominante foi *Lactococcus* e o *Staphylococcus* representou uma sequência mínima. Observaram-se diferenças significativas em composições de comunidades bacterianas entre marcas do queijo. Entretanto análises da unidade taxonómica com base operacional (OTU –based) identificaram um conjunto de taxa (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Rothia*, *Pantoea*) e géneros não classificados pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, que representaria os componentes testemunha da microbiota do queijo do Pico artesanal. Uma comunidade bacteriana diversa estava presente na maturação precoce, verificando-se um aumento no número de filotipos durante cerca de 2 semanas seguindo-se uma diminuição na fase final do amadurecimento.

Estudos realizados por Guillén e colaboradores (2014), em Mérida, Venezuela, com produtos lácteos artesanais determinaram os grupos filogenéticos e as diversidades clonais das estirpes de *Escherichia coli* isoladas desses produtos. Estes autores observaram que a caracterização molecular destas estirpes não está relacionada clonalmente, e na sua maioria as estirpes distribuem-se entre os filogrupos correspondentes a estirpes comensais de baixa patogenicidade. A deteção de *E. coli* em alimentos lácteos indica uma contaminação de origem fecal, que eventualmente poderia estar associada com a presença de outros agentes enteropatogénicos.

A diversidade entre os queijos é atribuída a particularidades da variação na dinâmica das populações presentes nesses diferentes queijos. O sabor é mais intenso e rico em queijos de leite cru do que de leite processado, principalmente devido à abundante microbiota nativa em queijo de leite cru, que não ocorre no caso de leite pasteurizado ou micro-filtrado. A capacidade dos queijos tradicionais no combate aos patogénicos é associado à presença de componentes químicos que são inibidores microbianos naturais, mas também à presença de estirpes anti-patogénicas ou consórcios

microbianos que impedem a proliferação dos microrganismos patogênicos por mecanismos que poderão ser de competição, mas que não estão completamente elucidados (Montel *et al.*, 2014).

No trabalho realizado em Ontário, Canadá por Le *et al.* (2014) foi avaliada a consciência e percepção da segurança alimentar do queijo artesanal e os autores concluíram que a espécie *Listeria monocytogenes* foi identificada como a mais relacionada com perigo biológico, devido ao impacto potencial na saúde humana e nos negócios. No geral, o impacto na segurança alimentar da composição química e dos perigos físicos foram percebidos como limitados. Assim, são sustentadas as produções seguras do queijo de leite cru, embora reconhecidos os riscos inerentes à presença de determinadas bactérias.

1.6 Caracterização sensorial de queijos artesanais

As características sensoriais do Queijo de Coalho têm sido investigadas visando identificar diferenças sensoriais entre os Queijos de Coalho produzidos a partir de leite cru ou de leite pasteurizado. Alguns estudos demonstram a existência de uma potencial relação entre microrganismos e a produção de determinados compostos, como ácidos orgânicos e ácidos gordos como o CLA (Bezerra, 2015; Santos *et al.*, 2012).

Segundo Waldman e Kerr (2015), nos Estados Unidos a política governamental proíbe a venda de queijo feito de leite não pasteurizado e com períodos de maturação inferiores a 60 dias, apesar de não estar cientificamente demonstrado que queijos com menor tempo de maturação ou produzidos com leite não pasteurizado constituam sempre um perigo para a saúde do consumidor. Em pesquisa conduzida com participantes de mercados de agricultores, na qual se colocaram questões relacionadas com a avaliação sensorial de queijo pasteurizado e não pasteurizado e com a percepção da sua segurança alimentar, observou-se que não há evidência de uma preferência do queijo pasteurizado e não há uma associação entre o queijo não pasteurizado e uma menor segurança e qualidade. Em média a decisão de compra dos consumidores do queijo artesanal é baseada no sabor e não na segurança alimentar ou no processo de produção.

A associação da microbiota de bactérias do ácido láctico e a produção de compostos responsáveis pelo sabor e aroma ou carácter funcional do queijo Coalho produzido na mesorregião do Sertão Paraíbano, e a utilização destes aspetos como possíveis indicadores para padronização deste queijo, surgiu como proposta do presente trabalho, que visa, dar um contributo para a preservação das características sensoriais de um produto artesanal, e desta forma, promover um modelo de identidade e caracterização deste produto regional.

O Queijo de Coalho do Nordeste Brasileiro é um produto regional com relevância socioeconómica para esta região e como já foi referido, as suas características nutricionais e organolépticas dependem fortemente da composição do leite utilizado na sua produção.

A partir da caracterização da microbiota láctica isolada do Queijo de Coalho produzido na mesorregião do Sertão Paraíbano espera-se identificar as bactérias do ácido láctico prevalentes e responsáveis pelas características organolépticas deste queijo, bem como alguns dos compostos

orgânicos presentes, e as suas características sensoriais de forma a permitir a escolha de parâmetros como sugestão para padronização do produto.

A técnica de Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa, GC-MS, foi utilizada para caracterizar o perfil de ácidos gordos dos diferentes queijos integrados neste trabalho e a Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detecção eletroquímica foi utilizada para determinar os aminoácidos livres.

A caracterização físico-química das amostras e a avaliação de parâmetros sensoriais foi também efetuada com o objetivo de relacionar características microbiológicas e químicas com as propriedades organolépticas destes queijos.

A partir desta informação será possível identificar e selecionar microrganismos autóctones e sugerir a elaboração de um fermento com bactérias lácticas específicas a fim de serem usadas no processamento do Queijo de Coalho produzido com leite pasteurizado na Paraíba, e assim oferecer um produto de qualidade preservando suas propriedades sensoriais e garantindo segurança alimentar para a população consumidora.

Referências

Amarante, J.O. 2015. *Queijos do Brasil e do Mundo: para iniciantes e apreciadores*, São Paulo, Mescla.

Aquino, F.T.M. 1983. Produção de Queijo de Coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Bezerra, T. K. A. 2015. Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em Queijo de Coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Bouma, A., Durham, C.A. e Meunier-Goddick, L. 2014. Start-up and operating costs for artisan cheese companies. *Journal Dairy Science*, 97, 3964–3972.

Choque, B., Catheline, D., Rioux, V. e Legrand, P. 2014. Linoleic acid: Between doubts and certainties. *Biochimie*, 96, 14-21.

Dia a Dia na Educação: Secretaria do Governo do Paraná. Clima e Vegetação do Nordeste. Disponível em <http://www.geografia.seed.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=150>. Consultado em 02 de março de 2016.

Diana, M., Rafecas, M., Arco, C. e Quílez, J. 2014. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 94–100.

Draper, E., Decourcey, J., Higgins, S.C., Canavan, M., Mcevoy, F., Lynch, M., Keogh, B., Reynolds, C., Roche, H.M., Mills, K.H.G. e Loscher, C.E. 2014. Conjugated linoleic acid suppresses dendritic cell activation and subsequent Th17 responses. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 741-749.

FAO. 2013. FAO Statistical Yearbook 2012. Disponível em <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e00.htm>. Consultado a 17 de janeiro de 2016.

Freitas, W.C. 2011. Aspectos higiênico-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica de leite cru, Queijo de Coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba. Tese (Doutoramento), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

- Guillén, L.; Millán, B. e Araque, M. 2014. Caracterización molecular de estirpes de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 18, 100-108.
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. e Yvon, M. 2004. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 3855–3861.
- História da Paraíba. 2010. Disponível em <http://www.historiadaParaiba.blogspot.com/.../regionalizacao-da-Paraiba-meso-e.html>. Consultado a 26 de maio de 2011.
- Le, S., Bazger, W., Hill, A.R., Wilcock, A. 2014. Awareness and perceptions of food safety of artisan cheese makers in Southwestern Ontario: A qualitative study. *Food Control*, 41, 158 -167.
- Luíz, Y. 2014. *Geografia nos caminhos da Paraíba*, João Pessoa, Vento Nordeste.
- Ma, N., Hong, S.I., Zhao, T.T., No, D.S., Kim, C.T., Kim, Y e Kim, I.H. 2014. Enrichment of docosahexaenoic acid from tuna oil via lipase-mediated esterification under pressurized carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 87, 28-33.
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Sanna, M.G. e Deiana, P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25, 366–377.
- MAPA. 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 de março de 1996, p. 3977-3978.
- MAPA. 2011. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº57 de 15 de dezembro de 2011. Estabelecimento de critérios adicionais para elaboração de queijos artesanais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2011, p.23.
- Menezes, S.S.M. 2011. Queijo de Coalho: Tradução cultural e estratégia de reprodução social na região nordeste. *Revista de Geografia (UFPE)*, 28, 40-56.
- Montel, M.C., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N., Berthier, F. 2014. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136 –154.
- Nassu, R.T., Araujo, R.S., Guedes, C.G.M., Rocha, R.G.A. 2003. *Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-químicas de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte*, Fortaleza, Embrapa Agroindústria Tropical.
- Parodi, P.W. 2003. Anti-cancer agents in milk fat. *Australian Journal of Dairy Technology*, 58, 114–118.
- Perry, K.S.P. 2004. Queijos: aspetos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, 27, 293-300.
- Podestà, M. 2015. O que são queijos artesanais de leite cru? Disponível em: <http://www.slowfoodbrasil.com/queijos-artesanais>. Consultado a 14 de junho de 2016.
- Portaria 73/90. 1990. Ministério do Planejamento e Administração do Território, da Agricultura, Pescas e Alimentação e do Comércio e Turismo. Portaria Nº 73 de 01 de fevereiro de 1990. Disponível em: <http://www.dre.pt/pdf1s%5C1990%5C02%5C02700%5C04360438.pdf>. Consultado a 17 de janeiro de 2016.
- Riquelme, C., Câmara, S., Dapkevicius, M.L.N.E., Vinuesa, P., Silva, C.C.G., Malcata, F.X., Rego, O.A. 2015. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*, 192, 86–94.

Santos, J.S., Cruz, F.T., Menasche, R. 2012. O mineiro, o queijo e os conflitos (nada poéticos) em torno dos alimentos tradicionais produzidos artesanalmente no Brasil. *5º Encontro de Redes de Estudos Rurais-desenvolvimento, ruralidades e ambientalização: paradigmas e atores em conflitos*. Universidade Federal do Pará, Belém, de 3 a 6 de junho de 2012.

Santos, K.M.O., Bomfim, M.A.D., Vieira, A.D.S., Benevides, S.D., Saad, S.M.I., Buriti, F.C.A., Egito, A.S. 2012. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *International Dairy Journal*, 24, 107-112.

SDA. 2001. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, Queijo de Coalho e queijo Manteiga. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de julho de 2001, p.13.

SETDE. 2008. Governo do Estado da Paraíba. Secretaria de Estado do Turismo e do Desenvolvimento Económico. Perfil Tecnológico das Queijeiras do Sertão da Paraíba, p.59.

Shimizu, N., Naito, M., Mori, N. e Kuwahara, Y. 2014. *De novo* biosynthesis of linoleic acid and its conversion to the hydrocarbon (Z,Z)-6,9-heptadecadiene in the astigmatid mite, *Carpoglypus lactis*: Incorporation experiments with ¹³C-labeled glucose. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 51-57.

Silva, R.A., Bismara, P.A., Moura, R.B., Lima filho, J.L., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H. 2012. Avaliação da microbiota bacteriana do Queijo de Coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 1732-1738.

Travassos, A. E. R. 1996. Queijo de Coalho: atividade enzimática e qualidade do produto. Tese (Doutoramento). Universidade de São Paulo, São Paulo.

Viana, A.C. 2009. Avaliação de Queijo de Coalho produzido com bactérias lácticas endógenas. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

Waldman, K.B., Kerr, J.M. 2015. Is Food and Drug Administration policy governing artisan cheese consistent with consumers' preferences? *Food Policy*, 55, 71-80.

Wijendran, V. e Hayes, K.C. 2004. Dietary n₆ and n₃ fatty acid balance and cardiovascular health. *Annual Review of Nutrition*, 24, 597-615.

Wu, D. e He, Y. 2014. Potential of spectroscopic techniques and chemometric analysis for rapid measurement of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in algal oil. *Food Chemistry*, 158, 93-100.

CAPÍTULO 2

Caracterização físico-química e avaliação sensorial do Queijo de Coalho

2.1 Introdução

2.1.1 Características físico-químicas do Queijo de Coalho

Apesar do Queijo de Coalho ser produzido há mais de um século, ainda se observa ausência de padronização nas técnicas de elaboração do mesmo, o que acarreta diferenças nas características físico-químicas e sensoriais do produto final. Segundo a Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho 2001 (SDA, 2001), o Queijo de Coalho é classificado como um queijo de média a alta humidade, de massa semi-cozida ou cozida que apresenta um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0% e 60,0%. Nos vários estados do Nordeste pode ser observada grande variação nos teores de humidade, proteína e gordura desse queijo, indicando a referida falta de padronização do processo de produção (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Referências sobre valores médios dos principais componentes da análise físico-química do Queijo de Coalho produzido nos estados do Nordeste.

Referências	Estado	Humidade (%)	Gordura (%)	Proteína (%)
Silva <i>et al.</i> (2010)	Alagoas	47,60	-	28,65
Andrade (2006)	Ceará	44,52	26,88	20,70
Freitas (2011)	Paraíba	59,31	19,04	17,17
Silva (2012)	Pernambuco	55,09	24,98	18,56
Nassu <i>et al.</i> (2003)	Rio Grande do Norte	43,77	25,61	24,87

A variabilidade na composição geral do Queijo de Coalho reflete a ausência de padronização das suas condições de produção entre os estados produtores e entre regiões dentro do mesmo estado, mas também pode resultar da utilização de diferentes processos de produção como por exemplo efetuar ou não o cozimento da massa e efetuar uma prensagem curta ou longa (Freitas, 2011).

No estado do Ceará, o Queijo de Coalho foi classificado como extra gordo ou duplo creme, de humidade média, com teor médio de proteína em 25,02%, acidez 0,26% e pH 5,2 (Feitosa, 1984; Perez, 2005). Na região do Recife, este queijo foi classificado em semi-gordo e de alta humidade (Sena *et al.*, 2000). Em Sergipe, como de alta humidade a muita alta humidade, com índice de acidez a variar entre 0,3% a 1,71% (Sena *et al.*, 2000).

No estado da Paraíba, o Queijo de Coalho foi classificado como gordo, de média humidade a alta humidade e com teor de proteína variável de 21,8% a 23,5% (Aquino, 1983). Também foram encontrados teores de cloretos (1,91%), de acidez (0,4%), de proteína (24,3%), de cinzas (4,4%) e de pH (entre 4,9 a 6,4) para as diversas regiões do Ceará (Perez, 2005).

2.1.2 Características sensoriais do Queijo de Coalho

Definida como uma área multidisciplinar, a análise sensorial é uma técnica utilizada para medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos ou materiais e a forma como essas características são percebidas pelos órgãos dos sentidos, visão, audição, olfato, tato e paladar (Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1993).

Os métodos sensoriais podem ser divididos em discriminativos, descritivos e afetivos. Os métodos discriminativos avaliam diferenças entre duas ou mais amostras, os métodos descritivos descrevem e quantificam diferenças sensoriais, enquanto os métodos afetivos avaliam a aceitação e preferência dos consumidores (Stone e Sidel, 1993). A análise descritiva é considerada o método mais sofisticado quando comparado com os métodos discriminativos e afetivos. Os resultados obtidos através deste teste permitem descrever uma completa descrição sensorial de um produto, proporcionando a base para mapear as similaridades e diferenças entre amostras (Stone e Sidel, 1993).

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) é considerada um método descritivo porque consegue descrever as percepções associadas aos produtos avaliados e é também considerada um método quantitativo, porque consegue quantificar a intensidade de cada atributo avaliado, numa escala definida especificamente para cada produto. A ADQ representa uma maneira de validar os termos da análise descritiva, através do recurso a análises estatísticas, da determinação dos descritores apropriados e da avaliação dos provadores que participarão na avaliação de um determinado produto (Stone e Sidel, 1993).

Esta avaliação é baseada na seleção e treinamento de provadores com capacidade para discriminar diferenças em propriedades sensoriais através de amostras de diferentes tipos de produtos específicos. O desenvolvimento da ADQ consiste nas seguintes etapas, propostas por Stone e Sidel (1993):

Primeira etapa - Pré-seleção dos provadores: também chamada de recrutamento, onde os futuros provadores em potencial serão contactados a fim de obter informações sobre eles, e fornecer informações sobre o teste e o produto;

Segunda etapa – Seleção dos provadores: os candidatos serão selecionados através de três etapas básicas de avaliação que incluem o uso e familiaridade com o produto, habilidade em discriminar amostras diferentes e compreensão do método;

Terceira etapa – Desenvolvimento da Terminologia Descritiva: os pré-candidatos avaliam amostras diferentes e verbalizam atributos para as sensações percebidas;

Quarta etapa – Treinamento dos Candidatos: é realizado com os produtos a serem analisados e com matérias de referências, matérias-primas ou ingredientes individuais. Nesta etapa deve ser explicado o significado de cada atributo e o uso da escala selecionada para expressar a intensidade de cada atributo percebida no produto em análise;

Quinta etapa – Avaliação do desempenho: os provadores serão selecionados a partir da avaliação individual de no mínimo três amostras com no mínimo três repetições. Os provadores que conseguirem discriminar as amostras, apresentarem boa reprodutibilidade e resultados consensuais serão selecionados;

Sexta etapa – Teste sensorial: é recomendável a condução das avaliações com réplicas, com delineamento de blocos completos balanceados e com apresentação das amostras de forma monádica.

Concluídas as etapas da ADQ os dados devem ser tratados para determinação de médias e desvios padrão dos conjuntos de respostas obtidas para cada amostra e atributo. A determinação de diferenças significativas entre amostras pode ser efetuada recorrendo à Análise de Variância e ao Teste de Tukey.

Sabor, aroma e textura são os aspetos importantes para qualificar e identificar os queijos. Estes fatores resultam de transformações enzimáticas, microbianas e químicas, e portanto, é importante combinar análises físico-químicas, químicas e microbiológicas dos queijos para entender melhor as suas propriedades sensoriais.

Segundo Andrade (2006) as características sensoriais do Queijo de Coalho variam de acordo com o local em que ele é produzido e que o mesmo Queijo de Coalho produzido numa mesma região apresenta variações entre as características sensoriais percebidas pelos consumidores. A identificação de características sensoriais tem como finalidade formular um modelo de identidade e caracterização deste produto regional.

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Queijo de Coalho deve apresentar consistência dura ou elástica, textura compacta e macia, com casca branca amarelada uniforme, sabor brando, ligeiramente ácido podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido lembrando massa coagulada, crosta fina e sem trincas, com a presença de algumas olhaduras pequenas ou mesmo sem olhaduras (SDA, 2001).

Queiroga *et al.* (2013) avaliou e comparou as características sensoriais de Queijo de Coalho de leite de cabra, Queijo de Coalho de leite de vaca e Queijo de Coalho misto (leite de cabra e vaca), através de ADQ. O Queijo de Coalho de leite de cabra adicionado de leite de vaca melhorou a aceitabilidade do produto, reduzindo o odor e o *flavour* do Queijo de Coalho de leite de cabra.

Perez (2005) avaliou o perfil sensorial, físico-químico e funcional do Queijo de Coalho industrial comercializado em Campinas-SP, proveniente de todas as regiões do Brasil. A análise sensorial foi realizada através da ADQ e teste de aceitação. A ADQ mostrou que as marcas analisadas apresentaram perfis distintos com características marcantes e bem definidas. Os provadores elegeram o Queijo de Coalho da marca C como o preferido por causa do sabor e aroma de manteiga, característica muito apreciada pelos consumidores do produto.

As características sensoriais do Queijo de Coalho têm vindo a ser pesquisadas com o intuito de identificar diferenças sensoriais entre os queijos que são produzidos com leite cru e pasteurizado.

Nassu e colaboradores (2004) verificaram a diversidade sensorial entre 20 amostras distintas de Queijo de Coalho consumido em Fortaleza-CE. Cavalcante e colaboradores (2007) elaboraram Queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado, inoculado com um conjunto de estirpes de BAL isoladas a partir de leite cru (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*) e como resultado o produto apresentou boa aceitação pelos consumidores quando avaliado sensorialmente, o que demonstrou ser possível melhorar a qualidade microbiológica do queijo e preservar as suas características organolépticas. Benevides *et al.* (2000) compararam sensorialmente o Queijo de Coalho produzido a partir de leite cru (LC) com o produzido a partir de leite pasteurizado (LP), adicionado de um fermento comercial, após 4, 30 e 60 dias de maturação. De forma geral o Queijo de Coalho LC foi preferido. Quanto ao tempo de

maturação observou-se preferência pelo QLC-TR (Queijo de Coalho de leite cru, refrigerado) com quatro dias de maturação, provavelmente devido ao hábito de consumir queijo recém-produzido. Sant'Ana *et al.* (2013) avaliou as características nutricionais e sensoriais do queijo Minas frescal feito de leite de cabra, de vaca ou misto. A ADQ foi utilizada para avaliar o perfil sensorial com um painel de 10 provadores treinados. Apesar de apresentarem atributos semelhantes, as amostras diferiram em *flavour*, aroma e cor. O Queijo de Coalho de leite de cabra apresentou uma cor branca mais intensa e um *flavour* e aroma típicos deste leite.

Segundo Andrade (2006) as características sensoriais do Queijo de Coalho variam de acordo com o local onde ele é produzido e com aspetos particulares do processo de produção uma vez que Queijos de Coalho produzidos numa mesma região apresentaram variações das suas características sensoriais suficientemente grandes para serem percebidas pelos consumidores. Caridi *et al.* (2003) e Durlu-Ozkaya *et al.* (2001) nas suas pesquisas procuraram informações sobre a microbiota natural de queijos artesanais a fim de contribuir para a definição de um fermento láctico que auxilie na padronização de um produto de qualidade e seguro, sem promover mudanças fundamentais nas características do mesmo.

Alguns estudos demonstram a existência de uma potencial relação entre microrganismos e a produção de compostos, como ácidos orgânicos e ácidos gordos que interferem nas características sensoriais dos queijos, especialmente sabor e aroma, aumentando a aceitabilidade deste produto (Queiroga, 2013; Alves, 2009; Viana, 2009; Perez, 2005).

O trabalho descrito neste capítulo teve como objetivo avaliar os componentes físico-químicos e o perfil sensorial do Queijo de Coalho produzido na mesorregião da Paraíba, Nordeste do Brasil.

2.2 Materiais e métodos

2.2.1 Amostragem

As amostras de Queijo de Coalho utilizadas neste trabalho encontram-se identificadas na Tabela 2.2. As amostras foram recolhidas no período de junho/2013 a outubro/2014, no período da manhã, em queijeiras ou em locais que comercializam alimentos, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para o Laboratório de Análises de Matérias Primas Agropecuárias, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, Paraíba, Brasil.

Tabela 2.2: Região, código, cidade de origem, local de aquisição e período de maturação do Queijo de Coalho produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.

Região	Código	Cidade de Recolha	Local de aquisição	Maturação (dias)
	R1A1	São Bento	Queijeira	03

Catolé do Rocha	R1A2	St. Curralinho-S. Bento	Mercado	03
	R1A3	St. Olho d'Água - Ct. Do Rocha	Panificadora	06
	R1A4	Jericó	Queijeira	03
Cajazeiras	R2A1	Santa Helena	Queijeira	02
	R2A2	São José de Piranhas	Queijeira	02
	R2A3	St. Bartolomeu	Mercado	05
	R2A4	St. Vaca morta	Mercado	03
Sousa	R3A1	Paulista	Mercado	02
	R3A2	St. Angico – São Bentinho	Queijeira	03
	R3A3	St. Borges	Queijeira	02
	R3A4	St Redenção-Sousa	Comércio	03
Patos	R4A1	São José de Espinharas	Mercado	05
	R4A2	St. Capoeira-Santa Terezinha	Queijeira	02
	R4A3	Cacimba de Areia	Queijeira	05
	R4A4	St. Cachoeira -S. J. de Espinharas	Mercado	02
Piancó	R5A1	St das Águas – Coremas	Frigorífico	05
	R5A2	Olho D'água	Queijeira	01
	R5A3	St. Riacho do Boi - Emas	Frigorífico	03
	R5A4	St. Riacho dos carneiros – Piancó	Frigorífico	05
Itaporanga	R6A1	Itaporanga	Mercado	01
	R6A2	Pedra Branca	Mercado	02
	R6A3	St. Do Açude-Itaporanga	Frigorífico	05
	R6A4	Serra Branca	Mercado	03
Teixeira	R7A1	Desterro de Teixeira	Mercado	03
	R7A2	Mãe D'água	Mercado	03
	R7A3	Teixeira	Supermercado	03
	R7A4	St. Olho D'água	Mercado	01

2.2.2 Preparação das amostras

As amostras de Queijo de Coalho foram preparadas seguindo as orientações da Ref. 955.30 do AOAC (1990). As amostras foram fatiadas e raladas num ralador de aço inoxidável, armazenadas em embalagens plásticas individuais, embaladas em papel alumínio e acondicionadas em refrigeração (para análise imediata) ou congeladas a -20°C (para análise posterior).

2.2.3 pH

A determinação de pH foi realizada de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985) através da medição eletrométrica da atividade iônica do hidrogénio (H⁺) em meio aquoso. Este método foi realizado com um potenciômetro + elétrico de pH da marca Hanna.

2.2.4 Acidez

A acidez dos queijos foi realizada através do método de titulação de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985). A extração dos ácidos solúveis das amostras de Queijo de Coalho foi realizada com água destilada aquecida (40 °C) e neutralizada até o ponto de equivalência com solução alcalina, utilizando o indicador de cor fenolftaleína. O resultado da acidez foi expresso % (m/m) de equivalentes de ácido láctico.

2.2.5 Humidade

A humidade das amostras foi determinada pelo método gravimétrico de acordo com a AOAC (1990), Ref. 948.12. Pesaram-se 2 a 3 g da amostra num recipiente com tampa, que foi posteriormente colocado num forno de circulação forçada a 130 °C +/- 1 °C por aproximadamente 2h, com a tampa aberta. Após esse período, removeu-se do forno, deixou-se arrefecer em exsiccador e pesou-se com a tampa fechada, até peso constante. Os resultados estão expressos em % (m/m) da amostra em base húmida.

2.2.6 Cinzas

A determinação de cinzas nas amostras de Queijo de Coalho foi realizada através do método gravimétrico de acordo com a Ref. 935.42 da AOAC (1990). Pesaram-se 3 a 5 g da amostra num recipiente, que foi aquecido em placa até calcinar a amostra; esta calcinação foi efetuada progressivamente a temperatura moderada para evitar salpicos de gordura durante esse processo. Quando se concluiu a calcinação, os recipientes foram colocados em mufla a 550 °C por um período de 4 horas para completar o processo de oxidação da matéria orgânica. Em seguida os recipientes foram retirados da mufla, arrefecidos em exsiccador e pesados. Os resultados foram expressos em % (m/m), numa base húmida.

2.2.7 Proteína bruta

A determinação de proteína bruta foi efetuada por quantificação do azoto total nas amostras através do método de Kjeldahl. A cerca de 2 g de amostra foram adicionados 0,7 g HgO ou 0,65 g de Hg metálico, 15 g de K₂SO₄ em pó ou Na₂SO₄ anidro e 25 mL de H₂SO₄ concentrado. Com o tubo de vidro inclinado aqueceu-se lentamente até cessar a formação de espumas, levou-se a mistura à ebulição até apresentar um aspeto claro e transparente sem sólidos em suspensão. Depois de arrefecer adicionaram-se 200 mL de água, e quando a temperatura da solução atingiu valores inferiores a 25 °C

adicionaram-se 25 mL de sulfureto ou tiosulfureto e homogeneizou-se; adicionou-se ainda um pouco de zinco para evitar aquecimento excessivo durante a neutralização, e de seguida adicionou-se NaOH sem agitação (15 g de NaOH sólido por cada 10 mL de H₂SO₄). O tubo contendo a mistura é colocado no digestor sob condensação. Com a ponta do condensador imerso no ácido e 5-7 gotas do indicador no recetor, girou-se o tubo contendo a mistura, aquecendo todo o NH₃ até ficar digerido (origiando mais de 150 mL de destilado). Posteriormente, removeu-se o recetor, lavando a ponta do condensador e retirando o excesso de ácido no destilado com NaOH padrão. O teor de proteína bruta foi calculado a partir do teor de N total aplicando o fator de correção 6,38, conforme o IDF 25:2008, considerando que a totalidade do azoto está na forma proteica. Os resultados foram expressos em % (m/m), em base húmida.

2.2.8 Gordura

A determinação do teor de gordura foi realizada através do método do Butirómetro de Gerber para queijo de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985). A determinação baseia-se na separação e quantificação da gordura do queijo, por meio do tratamento da amostra com ácido sulfúrico e álcool isoamílico utilizando o butirómetro de Van Gulik para queijo e a centrífuga de Gerber. Os resultados estão expressos em % (m/m), em base húmida.

2.2.9 Cloretos por volumetria

A determinação do teor de cloretos (NaCl) nas amostras de queijo foi realizado através da titulação potenciométrica dos iões cloreto a partir do resíduo mineral fixo (cinzas), de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados foram expressos em cloretos, cloreto de sódio, % (m/m), em base húmida.

2.2.10 Análise sensorial

Para efetuar a análise sensorial do Queijo de Coalho artesanal foi aplicado o método de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ).

A seleção de candidatos para integrar o painel de provadores, começou pelo preenchimento de um questionário (em anexo) que ajudou a selecionar os possíveis provadores. Em seguida, esses candidatos foram treinados utilizando uma escala linear não estruturada de valores e avaliação repetida de padrões estabelecidos para as referências que definem as classificações de fraco e forte para cada descritor, conforme o descrito na Tabela 2.3.

A análise sensorial foi realizada em dois turnos, de manhã e de tarde, em horários pré-estabelecidos, e cada provador avaliou quatro amostras por turno. Para cada amostra cada provador preencheu um questionário no qual atribuiu a cada descritor um valor discreto numa escala linear à qual correspondem classificações que variaram de fraco a forte (em anexo).

2.2.12 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises físico-químicas e sensoriais foram submetidos a uma análise descritiva para avaliação de médias e desvios-padrão e à análise de variância (ANOVA) para verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre médias. Para efetuar comparações múltiplas entre médias foi utilizado o Teste de Tukey com nível de significância de 5% (Leach, 1978). Foi ainda efetuada a análise do Coeficiente de Pearson entre as diferentes variáveis avaliadas, considerando todas as combinações possíveis de duas variáveis independentes. Todos os cálculos relativos à análise estatística foram efetuados com recurso ao programa SPSS, versão 23 (IBM Analytics).

Tabela 2.3: Descritores e padrões utilizados na análise quantitativa descritiva do Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil. (Fonte: Adaptado de Perez, 2005)

	Descritores	Definição	Referências
APARÊNCIA	Cor amarelada	Descreve a cor branco-amarelada, característica do Queijo de Coalho, similar à cor da gordura do leite	Fraco: ricota da marca Isis; Forte: queijo Minas Padrão
	Molhada	Descreve o aspeto de uma superfície húmida, com presença de líquido sob o queijo.	Fraco: Ricota da marca Isis; Forte: queijo Minas Frescal
AROMA	Queijo fresco	Descreve aroma característico da massa do queijo recém-coagulada	Fraco: nenhuma; Forte: queijo Minas Frescal
	Ácido	Descreve aroma característico da presença de ácido láctico no queijo como resultado da fermentação da lactose	Fraco: nenhuma; Forte: iogurte natural desnatado marca Cariri
	Manteiga	Descreve aroma característico da presença de manteiga no produto	Fraco: nenhuma; Forte: Manteiga extra marca Itacolomy
SABOR	Queijo Fresco	Descreve sabor característico dos queijos recém-fabricados, sem maturação	Fraco: nenhuma; Forte: queijo Minas Frescal
	Manteiga	Descreve sabor característico de manteiga no queijo	Fraco: nenhuma; Forte: Manteiga extra marca Itacolomy
SABOR	Salgado	Descreve o gosto característico produzido pela presença de substância salgada como cloreto de sódio	Fraco: nenhuma; Forte: imersão do Queijo de Coalho da marca Isis em salmoura a 20% por 2:30h
	Ácido	Descreve o gosto primário produzido pela presença de substâncias ácidas como o ácido cítrico	Fraco: nenhuma; Forte: queijo tipo Cottage

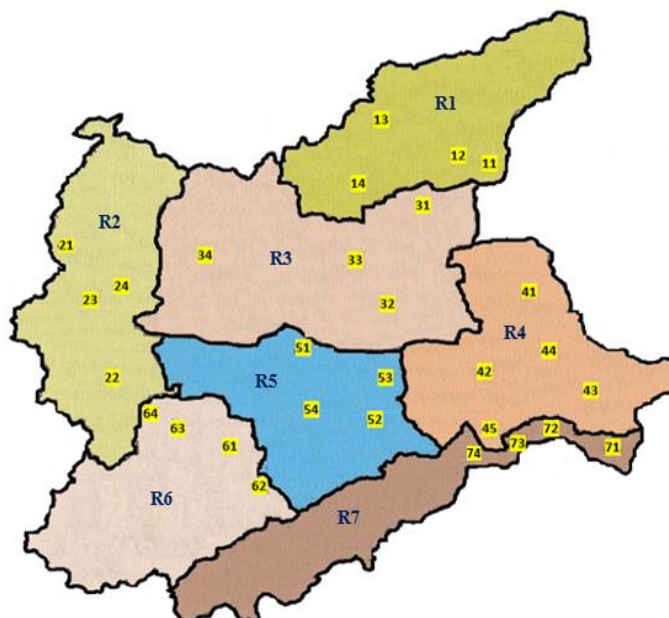
(Tabela 2.3 continuação)

TEXTURA	Maciez	Descreve a propriedade da textura relacionada a uma baixa resistência ao mastigar	Fraco: queijo Parmesão faixa azul; Forte: queijo Minas padrão
---------	---------------	---	--

Borrachoso	Descreve a propriedade da textura que se parece com borracha, elástico, podendo emitir sons (“cantar”) ao mastigar e precisa de muitas mordidas para ficar pronto para engolir.	Fraco: queijo Minas padrão; Forte: balas de gelatina.
Seco	Descreve a propriedade da textura em relação à percepção da quantidade de líquido absorvido ou liberada do produto	Fraco: queijo Minas frescal; Forte: queijo Parmesão faixa azul.

2.3 Resultados e discussão

A determinação dos locais de recolha das amostras encontra-se distribuído no mapa da mesorregião Sertão do Estado da Paraíba, Figura 2.1. Os municípios onde foram realizadas as recolhas das amostras de Queijo de Coalho, agrupados nas diferentes microrregiões a que pertencem, estão marcados com dois números que indicam a microrregião (o primeiro número) e a cidade (o segundo número).



Legenda:

R1: Catolé do Rocha	11 -São Bento; 12 -St. Curralinho; 13 -St. Olho d'Água; 14 -Jericó
R2: Cajazeiras	21 -Santa Helena; 22 -S.J. de Piranhas; 23 -St. Bartolomeu; 24 -St. Vaca Morta
R3: Sousa	31 -Paulista; 32 -St. Angicos; 33 -St. Borges; 34 -St. Redenção
R4: Patos	41 -S. J. Espinharas; 42 -St. Capoeira; 43 -Cacimba de Areia; 44 -St. Cachoeira
R5: Piancó	51 -St. Das águas; 52 -Olho d'Água; 53 -St. Riacho do Boi; 54 -St. Riacho dos Carneiros
R6: Itaporanga	61 -Itaporanga; 62 -Pedra Branca; 63 -St. Açude; 64 -Serra Branca
R7: Serra do Teixeira	71 -Desterro de Teixeira; 72 -Mãe d'Água; 73 -Teixeira; 74 -St. Olho d'Água-Teixeira

Figura 2.1: Mesorregião do Sertão do Estado da Paraíba indicando os locais de recolha das amostras de Queijos de Coalho, no período de junho/2013 a outubro/2014. (Fonte: Dados do autor, 2015.)

Os queijos incluídos neste estudo foram, numa primeira fase, caracterizados quanto às suas propriedades físico-químicas (acidez, pH, humidade, proteína bruta, gordura bruta, teor de cinza e teor

de cloretos) e quanto a parâmetros sensoriais (aparência, aroma, sabor, textura) de forma a determinar as propriedades organoléticas e características gerais dos queijos selecionados e avaliar a existência de correlações entre estas propriedades e a microrregião e região de produção ou o tempo de maturação do queijo.

As características físico-químicas (acidez, pH, umidade, proteína bruta, gordura bruta, teor de cinza e teor de cloretos) dos queijos amostrados são apresentadas na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Média e desvio-padrão dos parâmetros físico-químicos: pH, acidez, humidade, proteína, gordura, cinzas e cloretos dos Queijos de Coalho produzidos nas microrregiões do Sertão da Paraíba.

REGIÕES	AMOSTRAS	pH	ACIDEZ* (%)	HUMIDADE (%)	PROTEÍNA (%)	GORDURA (%)	CINZAS (%)	CLORETOS (%)
Catolé do Rocha (R1)	São Bento (R1A1)	5,6±0,04 ^d	0,1±0,00 ^{ghij}	42,8±0,12 ^{defghi}	23,5±0,23 ^{kl}	33,0±0,0 ^c	4,3±0,03 ^{fghi}	1,6±0,23 ^{bcdefg}
	Sítio Curralinho (R1A2)	6,1±0,02 ^{fg}	0,1±0,00 ^{ab}	36,4±0,36 ^{abc}	26,4±0,32 ^p	32,3±0,57 ^{bc}	4,4±0,03 ^{ghij}	1,4±0,03 ^{abcde}
	Sítio Olho d'Água (R1A3)	5,6±0,03 ^{fg}	0,2±0,00 ^m	34,4±1,02 ^a	24,4±0,20 ⁿ	34,8±0,28 ^d	4,6±0,04 ^{hijk}	1,6±0,03 ^{bcdef}
	Jericó (R1A4)	5,9±0,01 ^e	0,1±0,01 ^{efgh}	36,2±0,59 ^{abc}	25,6±0,21 ^o	36,0±0,0 ^e	4,8±0,15 ^{klm}	2,0±0,04 ^{fghij}
Cajazeiras (R2)	Santa Helena (R2A1)	6,5±0,06 ^k	0,1±0,02 ^{cdef}	35,4±1,12 ^{ab}	26,2±0,14 ^p	32,0±0,0 ^b	4,9±0,02 ^{klm}	2,1±0,06 ^{fghij}
	São José de Piranhas (R2A2)	6,1±0,01 ^{fgh}	0,2±0,00 ^{kl}	38,9±0,66 ^{abcdef}	25,5±0,37 ^o	35,0±0,0 ^d	4,9±0,08 ^{klm}	2,2±0,09 ^{hijk}
	Sítio Bartolomeu (R2A3)	6,1±0,01 ^{gh}	0,1±0,01 ^{fghi}	48,8±0,12 ^{ij}	22,0±0,02 ^{fg}	35,0±0,0 ^d	4,4±0,04 ^{ghij}	2,3±0,01 ^{hijk}
	Sítio Vaca Morta (R2A4)	6,2±0,02 ^{hi}	0,1±0,01 ^{ab}	46,3±0,09 ^{ghi}	23,4±0,16 ^{kl}	30,0±0,0 ^a	4,5±0,01 ^{ghij}	2,1±0,01 ^{fghij}
Sousa (R3)	Paulista (R3A1)	6,0±0,05 ^f	0,1±0,01 ^{bcd}	45,5±1,14 ^{ghi}	22,8±0,14 ^{ij}	37,0±0,0 ^f	5,2±0,15 ^{lm}	2,8±0,04 ^{kl}
	Sítio Angico (R3A2)	5,3±0,03 ^{bc}	0,3±0,01 ⁿ	40,8±0,30 ^{bcdefg}	24,0±0,08 ^{mn}	32,6±0,57 ^{bc}	4,6±0,07 ^{hijk}	2,4±0,04 ^{ijk}
	Sítio Borges (R3A3)	6,3±0,08 ^{ij}	0,1±0,01 ^{abcd}	49,1±0,11 ^{ij}	22,8±0,10 ^{ij}	35,0±0,0 ^d	4,5±0,13 ^{ghijk}	2,0±0,04 ^{fghij}
	Sítio Redenção (R3A4)	6,2±0,03 ^{hi}	0,1±0,00 ^{abc}	38,1±0,07 ^{abcde}	23,2±0,17 ^{kl}	34,3±0,57 ^d	4,1±0,06 ^{efgh}	1,2±0,0 ^{abc}
Patos (R4)	São José de Espinharas (R4A1)	6,2±0,01 ^{gh}	0,1±0,01 ^{abcd}	44,9±0,29 ^{fghi}	22,4±0,04 ^{ghi}	35,0±0,0 ^d	5,6±0,19 ^{mn}	3,1±0,08 ^l
	Sítio Capoeira (R4A2)	6,4±0,14 ^{jk}	0,1±0,00 ^{abc}	41,5±0,64 ^{bcdefgh}	22,8±0,14 ^{ij}	30,0±0,0 ^a	3,4±0,03 ^{abc}	1,0±0,04 ^a
	Cacimba de Areia (R4A3)	5,7±0,02 ^e	0,2±0,01 ^{lm}	47,1±0,44 ^{hij}	21,6±0,11 ^{ef}	35,0±0,0 ^d	3,5±0,14 ^{abcd}	1,9±0,03 ^{defghij}
	Sítio Cachoeira (R4A4)	5,7±0,04 ^e	0,2±0,00 ⁿ	53,2±0,21 ^j	22,2±0,06 ^{gh}	37,0±0,57 ^f	3,0±0,05 ^a	0,9±0,01 ^a
Piancó (R5)	Sítio das Águas (R5A1)	6,0±0,04 ^f	0,1±0,00 ^{ab}	45,3±0,50 ^{ghi}	23,1±0,06 ^{jk}	36,0±0,0 ^e	5,4±0,19 ^{lmn}	1,9±0,01 ^{efghij}
	Olho d'Água (R5A2)	6,1±0,04 ^{fg}	0,1±0,00 ^a	47,4±0,58 ^{hij}	20,4±0,23 ^b	35,0±0,0 ^d	4,6±0,01 ^{hijk}	1,8±0,02 ^{cdefghi}
	Sítio Riacho do Boi (R5A3)	5,6±0,05 ^d	0,1±0,02 ^{defg}	42,4±0,17 ^{cdefgh}	21,2±0,10 ^{de}	35,0±0,0 ^d	5,0±0,15 ^{kl}	2,1±0,03 ^{fghij}

(Tabela 2.4 continuação)

Piancó (R5)	Sítio Riacho dos Carneiros (R5A4)	5,8±0,02 ^e	0,1±0,02 ^{hijk}	43,9±0,26 ^{efghi}	23,4±0,05 ^{kl}	34,3±0,57 ^d	5,8±0,64 ⁿ	1,7±0,02 ^{cdefgh}
Itaporanga (R6)	Itaporanga (R6A1)	4,7±0,01 ^a	0,5±0,02 ^o	43,8±0,34 ^{efghi}	24,7±0,07 ^{lm}	36,0±0,0 ^e	3,0±0,07 ^{ab}	0,9±0,02 ^{defghij}
	Pedra Branca (R6A2)	5,5±0,02 ^d	0,1±0,01 ^{hij}	41,1±0,18 ^{bcdefgh}	19,0±0,22 ^a	35,0±0,0 ^d	4,3±0,17 ^{ghij}	1,3±0,02 ^l
	Sítio Açude (R6A3)	5,4±0,06 ^{cd}	0,1±0,01 ^{hij}	43,5±0,33 ^{defghi}	23,4±0,23 ^{kl}	33,0±0,0 ^c	4,7±0,28 ^{ijk}	1,9±0,02 ^{efghij}
	Serra Branca (R6A4)	5,5±0,01 ^d	0,2±0,01 ^{jkl}	37,4±0,10 ^{abcd}	22,1±0,02 ^{gh}	37,0±0,0 ^f	3,8±0,09 ^{bcdef}	1,1±0,04 ^{ab}
Serra do Teixeira (R7)	Desterro de Teixeira (R7A1)	5,4±0,03 ^c	0,1±0,00 ^{hij}	45,6±0,22 ^{ghi}	20,5±0,03 ^{bc}	36,0±0,0 ^e	4,0±0,15 ^{defg}	2,4±0,03 ^{jk}
	Mãe d'Água (R7A2)	5,2±0,01 ^b	0,2±0,01 ^{ijkl}	47,3±0,46 ^{hij}	22,5±0,06 ^{hi}	36,0±0,0 ^e	3,8±0,09 ^{cdef}	2,0±0,02 ^{fghij}
	Teixeira (R7A3)	6,0±0,04 ^{fg}	0,1±0,00 ^{abcd}	47,2±0,16 ^{hij}	25,4±0,08 ^o	36,0±0,0 ^e	3,6±0,03 ^{bcde}	1,8±0,95 ^{abcd}
	Sítio Olho d'Água-Teixeira (R7A4)	6,1±0,02 ^d	0,1±0,00 ^{abcd}	44,1±0,59 ^{efghi}	21,0±0,04 ^{cd}	32,3±0,57 ^{bc}	4,1±0,08 ^{efgh}	2,4±0,08 ^{jk}

* % de ácido láctico

As médias classificadas com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Os valores médios encontrados para a acidez titulável, expressa em% (m/m) de equivalentes de ácido láctico, variaram de 0,1% (microrregião de Piancó) a 0,5% (microrregião de Itaporanga) mas foram geralmente baixos, o que é expectável dado que são queijos artesanais que não sofreram adição de fermento láctico e com um baixo tempo de maturação (Perez, 2005). Só duas amostras apresentaram valores superiores a 0,2% e apenas uma amostra apresentou acidez superior a 0,4%. O valor mínimo foi muito abaixo comparativamente aos relatados na literatura e a acidez encontrada para a maior parte das amostras situa-se na gama baixa dos valores obtidos por outros autores para este tipo de queijos. Perez (2005), relativamente a amostras de Queijo de Coalho industrializado, obteve valores de acidez na gama de 0,2% a 0,5%, enquanto Silva *et al.* (2010) obteve valores de acidez de 0,3 a 0,4%, para Queijo de Coalho de Alagoas. No entanto, Freitas (2011), ao estudar o Queijo de Coalho da Paraíba, encontrou valores de acidez que variaram entre 0,2 e 0,8%, atingindo, portanto, um valor máximo superior aos anteriormente citados. A ocorrência de níveis elevados de acidez pode estar associada a tempos de maturação longos ou a uma má qualidade do leite utilizado, quer por refrigeração inadequada, quer como consequência de doença das vacas produtoras, como é o caso da mastite.

O pH é considerado importante na caracterização de queijos, devido à sua influência na textura, atividade microbiana e no processo de maturação, já que as reações químicas e a atividade da microbiota dependem do pH. Os valores de pH encontrados nas amostras pesquisadas variaram entre 4,7 (microrregião de Itaporanga) e 6,5 (microrregião de Cajazeiras). Para além da amostra R6A1 que apresentou o valor médio de 4,7, todas as restantes amostras, incluindo as da microrregião de Itaporanga apresentaram valores médios de pH superiores a 5,0, ou seja, tal como já verificado com o parâmetro acidez, os queijos analisados apresentam concentrações relativamente baixas de ácidos orgânicos livres, o que é típico de tempos de maturação baixos, mas constitui também um parâmetro indicativo da boa qualidade do leite utilizado no processo produtivo (Perez, 2005). Segundo Freitas (2011), os valores de pH das amostras de Queijo de Coalho da Paraíba variaram de 4,8 a 5,6. Andrade (2006), na sua pesquisa com Queijo de Coalho artesanal e industrializado do Ceará encontrou valores de pH para Queijo de Coalho artesanal que variaram de 5,2 a 6,3.

A variação nos valores de acidez e pH entre queijos pode também ocorrer devido a diferenças na composição da matéria-prima e do processo de fabricação dos mesmos, entre regiões, estados e no mesmo estado e entre microrregiões diferentes, interferindo desta forma nas características finais destes queijos (Andrade, 2006).

De acordo com a Instrução Normativa (IN) Nº 30, Anexo II, que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho (SDA, 2001), este queijo deve ser de média a alta humidade, apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variando de 35,0 a 60,0%. No entanto, este regulamento não estabelece padrões para os demais parâmetros físico-químicos devido a ausência de uma padronização no processo de produção deste queijo (Freitas, 2011).

O teor de humidade das amostras analisadas nesta pesquisa variou entre 34,4% (microrregião de Catolé do Rocha) a 53,2% (microrregião de Patos). O valor mínimo encontrado nesta pesquisa ficou abaixo do que determina a Portaria Nº 146/1996 do MAPA, que estabelece como queijo de média a alta humidade valores entre 36,0 a 54,9%, no entanto a maior parte das amostras situaram-se nesta gama. Como a maior parte das amostras incluídas neste estudo tinham tempos de maturação inferiores

a 5 dias, seria de esperar que os teores de humidade fossem relativamente elevados. Por outro lado, um valor elevado de humidade reflete também as características específicas do processo de produção nomeadamente o tempo de prensagem e a pressão aplicada durante esta etapa.

Os valores de gordura encontrados na análise das amostras desta pesquisa variaram de 30,0% (microrregiões de Patos e Cajazeiras) a 37,0% (microrregiões de Sousa e Itaporanga). Esta gama de valores é ligeiramente superior à encontrada por outros autores em Queijo de Coalho da Paraíba que variaram de 19,04 a 25,38% (Freitas, 2011). Silva (2012), avaliando Queijos de Coalho produzidos na região Agreste de Pernambuco encontrou resultados um pouco mais elevados que variaram de 21,25 a 29,9%.

A legislação vigente no Brasil que estabelece os padrões para classificação dos produtos de origem animal é a Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996, do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal do MAPA, que estabelece como base o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (GES) (MAPA, 1996). No entanto, a maioria das pesquisas realizadas apresentam os resultados de teor de gordura em matéria húmida. A Tabela 2.5 apresenta o resumo das amostras de Queijos de Coalho artesanais produzidos no Sertão da Paraíba e sua classificação.

Tabela 2.5: Classificação das amostras de Queijo de Coalho artesanal produzidos no Sertão da Paraíba, de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco (GES).

Classificação de acordo com o teor de gordura no extrato seco (%)*	Queijo de Coalho	
	Nº de amostra	(%)
Extra Gordo (mínimo de 60%)	14	50,0
Gordo (entre 45,0 e 59,9%)	14	50,0

*Gordura no extrato seco (GES) calculado pelo quociente do teor de gordura em matéria húmida pelo Extrato Seco Total (EST) multiplicado por 100.

De acordo com os resultados do GES, o Queijo de Coalho artesanal pode ser classificado em extra gordo a gordo, apresentando-se em desacordo com a IN nº 30/2001 (SDA, 2001) que classifica o Queijo de Coalho como de “gordo” a “semi-gordo”, com o teor de gordura no extrato seco entre 35 a 60%. Assim, dezoito das amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba e analisadas neste trabalho podem ser classificadas como queijos “semi-gordos”, mas 11 amostras apresentam um teor de gordura inferior ao valor mínimo de 35% pelo que não podem ser classificadas dessa forma. Esta variação no teor de gordura foi relatada noutros trabalhos, como Nassu e colaboradores (2003,) caracterizando queijos regionais e de manteiga produzido no Rio Grande do Norte constataram que cerca de 36% das amostras de Queijo de Coalho eram classificados como gordo e cerca de 63% como “semi-gordo”.

Diferenças na composição da matéria-prima utilizada e variações no processo de fabricação do Queijo de Coalho podem justificar estas oscilações. Segundo Nassu e colaboradores (2006), a formação e a manipulação da coalhada durante o processamento e o tempo de prensagem afetam a retenção da gordura e humidade, que diferem muito entre produtores. Por outro lado, o teor de gordura de um queijo depende fundamentalmente do teor de gordura do leite utilizado na sua produção, que por sua vez depende fortemente do estado fisiológico da vaca e da sua alimentação. Os valores relativamente baixos de gordura encontrados neste trabalho, bem como na literatura, para Queijos de

Coalho e outros queijos artesanais podem refletir uma tendência para uma diminuição no teor de gordura do leite produzido nessas regiões.

Os valores médios de proteína das amostras de Queijo de Coalho pesquisadas variaram de 19,0% (microrregião de Itaporanga) a 26,4% (microrregião de Catolé do Rocha). Resultados semelhantes foram encontrados no Queijo de Coalho do Rio Grande do Norte (Nassu *et al.*, 2003) e da Paraíba (Freitas, 2011). Silva (2012), encontrou resultados inferiores, com média de 18,6% para proteína. No entanto, Silva *et al.* (2010) pesquisando a influência da fabricação nas características físico-químicas do Queijo de Coalho do Sertão de Alagoas, encontrou resultados superiores aos desta pesquisa, com média de 28,65%. Tal como o teor de gordura, o teor de proteína do leite é fortemente influenciado pelas características genéticas e fisiológicas da vaca, mas também por fatores ambientais como alimentação, temperatura ambiente, etc. (Peres, 2001; Noro *et al.* 2006; Geissler e Powers, 2010). Assim, observa-se uma gama de variação deste parâmetro tanto neste trabalho como nos resultados encontrados na literatura, o que reflete esta multiplicidade de fatores que afetam a produção deste componente nutricional do leite e que se refletem posteriormente na composição dos queijos dele derivados.

Os teores médios de cinzas e cloretos variaram de 3,0% (microrregiões de Patos e Itaporanga) a 5,8% (microrregião de Piancó) e de 0,9% (microrregiões de Itaporanga e Patos) a 3,1% (microrregião de Patos), respectivamente. O teor de cinzas é naturalmente muito afetado pelo teor de cloretos e este último depende principalmente do processo de produção, uma vez que se trata de um elemento adicionado durante a fabricação do queijo e em quantidades geralmente superiores à totalidade dos restantes componentes minerais do queijo. Este carácter processual do teor de cloretos está evidenciado no facto de dois queijos da mesma região (Patos) apresentarem os valores máximo e mínimo deste parâmetro, independentemente das possíveis semelhanças na matéria-prima utilizada. Andrade (2006) e Nassu *et al.* (2003) encontraram resultados similares no Queijo de Coalho produzido no Ceará e no Rio Grande do Norte. No entanto, Silva *et al.* (2010) encontrou resultados superiores no Queijo de Coalho produzido em Alagoas, para ambas as variáveis, que oscilaram entre 3,4 % e 3,7 para cinzas e 3,3 % a 5,5% para cloretos. A ausência de legislação que estabeleça limites para os parâmetros físico-químico analisados nesta pesquisa, atesta a falta de padronização no processo de produção de queijos artesanais no Brasil. Os sais são fundamentais no processamento do queijo, determinando a qualidade do corpo e sua firmeza e influenciando também o rendimento do processo (Freitas, 2011). O cloreto de sódio adicionado ao queijo também exerce uma função de segurança, combatendo o crescimento da população microbiana. No entanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) orienta uma redução no consumo de sal, para atingir uma meta de 5 g de sódio por dia. No Brasil, o Ministério da Saúde determinou a redução do teor de sal em alguns produtos, inclusivamente nos produtos lácteos. O Informe Técnico Nº 50/2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) identificou variações elevadas do teor de sal em alguns tipos de queijos, sugerindo com isso a possibilidade da redução na quantidade de sódio sem interferir no sabor desses produtos (ANVISA, 2012). No entanto, a ausência de registo e controlo na produção dos Queijos de Coalhos nos vários estados surge como uma limitação na regulamentação deste produto, que é bastante apreciado e difundido em todas as regiões do país (Felício *et al.*, 2013).

Efetuuou-se também o cálculo das médias e desvios padrão dos parâmetros físico-químicos dos Queijos de Coalho produzidos no Sertão da Paraíba, agrupados por região, de forma a avaliar semelhanças e diferenças entre regiões e avaliar a existência de alguma homogeneidade de propriedades físico-químicas entre os queijos produzidos mesma região (Tabela 2.6).

Ao calcular valores médios dos parâmetros em estudo para diferentes queijos da mesma microrregião diluem-se algumas das suas diferenças individuais, mas podem detetar-se algumas tendências regionais. Apesar de o número de amostras por microrregião ser reduzido, a comparação de médias tendo em consideração o respetivo desvio-padrão, permitiu identificar algumas diferenças significativas, como por exemplo, a microrregião de Itaporanga cujos queijos apresentam o menor valor médio de pH e maior valor médio de acidez com diferenças significativas para a microrregião de Cajazeiras que apresenta o maior valor médio de pH e o menor valor médio de acidez.

Os queijos da região de Patos apresentaram o maior valor médio do teor de humidade (46,7%) significativamente superior ao teor de humidade dos queijos da região de Catolé do Rocha (37,5%).

Os queijos das regiões R1, R2 e R3 apresentaram os teores médios mais elevados de proteína sendo no caso da região R1 (Catolé do Rocha) significativamente superior aos teores médios de proteína dos queijos das regiões R4 a R7. Sabendo-se que o teor de proteína do leite é bastante influenciado por circunstâncias genéticas e fisiológicas dos animais produtores bem como pelas condições ambientais, esta observação pode traduzir uma tendência dos rebanhos de vacas das microrregiões mais a norte, ou ser o reflexo de condições climáticas distintas.

Para alguns parâmetros avaliados (gordura e cloretos) não se encontraram diferenças significativas entre as médias das várias microrregiões o que indica que as diferenças entre estas médias são da mesma ordem de grandeza que o respetivo desvio-padrão

Tabela 2.6: Médias e desvios-padrão das propriedades físico-químicas dos Queijos de Coalho produzidos no Sertão da Paraíba por região de produção.

REGIÕES	pH	ACIDEZ (% de ac. láctico)	HUMIDADE (% m/m)	PROTEÍNA (% m/m)	GORDURA (% m/m)	CINZAS (% m/m)	CLORETOS (% m/m)
Catolé do Rocha (R1)	5,8±0,22 ^b	0,1±0,05 ^{ab}	37,5±3,38 ^a	25,0±1,18 ^c	34,0±1,54 ^a	4,5±0,23 ^{abc}	1,6±0,27 ^a
Cajazeiras (R2)	6,3±0,15 ^c	0,1±0,04 ^a	42,3±5,67 ^{abc}	24,2±1,75 ^{bc}	33,0±2,22 ^a	4,7±0,24 ^{bc}	2,2±0,08 ^a
Sousa (R3)	6,0±0,42 ^{bc}	0,1±0,08 ^{ab}	43,4±6,19 ^{bc}	23,2±0,53 ^{abc}	34,8±1,66 ^a	4,6±0,44 ^{bc}	2,1±0,62 ^a
Patos (R4)	6,0±0,31 ^{bc}	0,2±0,07 ^{ab}	46,7±4,49 ^c	22,3±0,48 ^{ab}	34,3±2,81 ^a	3,9±1,08 ^a	1,7±0,94 ^a
Piancó (R5)	5,9±0,21 ^{bc}	0,1±0,03 ^a	44,7±1,93 ^{bc}	22,0±1,33 ^a	35,1±0,67 ^a	5,2±0,55 ^c	1,9±0,17 ^a
Itaporanga (R6)	5,3±0,37 ^a	0,2±0,14 ^b	41,4±2,67 ^{ab}	21,6±2,73 ^a	35,3±1,54 ^a	4,0±0,61 ^{ab}	2,0±0,77 ^a
Serra do Teixeira (R7)	5,7±0,41 ^{ab}	0,1±0,03 ^a	46,1±1,42 ^{bc}	22,4±1,97 ^{ab}	35,1±1,68 ^a	3,9±0,22 ^a	2,0±0,63 ^a

As médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2.6, é possível fazer uma caracterização das amostras por microrregião, encontrando algumas tendências distintas. A microrregião de Catolé do Rocha apresentou os menores valores médios de humidade e cloretos, com 37,5% e 1,6%, respetivamente, sugerindo que estes queijos são menos salgados quando comparados com as demais regiões. Por outro lado, o seu teor de proteína foi o mais alto, com um valor médio de 25,0% e desvio-padrão de 1,18, o que é um indicador positivo de valor nutricional.

O valor médio do teor de gordura dos Queijos de Coalho produzidos em Cajazeiras é mais baixo (33,0%), que os valores registados para as restantes regiões, apesar de não serem significativamente inferiores. Esta região produz também alguns dos queijos com teor de sal mais elevado, o que contribui para o valor médio relativamente elevado deste parâmetro (2,2%).

A microrregião de Patos apresenta valor médio elevado de humidade 46,7% e o menor valor de cinzas com 3,9%.

As amostras de Queijo de Coalho analisadas da microrregião de Itaporanga apresentaram menor pH e maior acidez, 5,29 e 0,22 % de ácido láctico, sugestivo de queijos frescos, mas também o menor teor de proteína (21,6 %).

Estas variações são reflexo da interferência de inúmeros fatores divididos da seguinte forma:

- 1- Animal e manejo: raça, alimentação e composição da matéria-prima;
- 2- Processamento: modo de fabricação, espécies de cultura láctica, tempo de maturação e armazenamento.

A variação na composição dos Queijos de Coalho também foi verificada noutros Estados do Nordeste e de todo o Brasil (Perez, 2005; Carvalho, 2007; Nassu *et al.*, 2006).

A Tabela 2.7 apresenta as médias e desvios-padrão dos resultados físico-químicos por dias de maturação dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Brasil.

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho (MAPA, 1996), o Queijo de Coalho normalmente é consumido com até 10 (dez) dias de fabricação, sendo considerado um queijo fresco. Apesar do reduzido número de dias, observou-se que ocorreram diferenças significativas, com um nível de 5%, entre médias de pH, acidez, humidade e cinzas. Os valores de pH variaram entre 5,4 a 6,1 o que atesta que são queijos frescos. Analisando as diferenças quanto ao número de dias, os queijos com 1 dia de fabricação apresentaram uma média do pH significativamente mais elevada que os demais dias. Resultados semelhantes foram obtidos por Carvalho (2007) e Sena *et al.* (2000), com Queijo de Coalho do Ceará e Recife, respetivamente.

Tabela 2.7: Médias e desvio-padrão das propriedades físico-químicas por dias de maturação dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.

MATURAÇÃO	Ph	ACIDEZ (% de ac. lático)	HUMIDADE (% m/m)	PROTEÍNA (% m/m)	GORDURA (% m/m)	CINZAS (% m/m)	CLORETOS (% m/m)
1 DIA	5,4±0,61 ^a	0,2±0,17 ^b	42,8±4,38 ^b	22,0±1,44 ^a	36,0±0,87 ^a	3,9±0,58 ^a	1,6±0,37 ^a
2 DIAS	61±0,35 ^b	0,1±0,06 ^{ab}	43,5±6,66 ^b	22,8±2,75 ^a	34,5±2,50 ^a	4,3±0,80 ^{ab}	2,0±0,82 ^a
3 DIAS	5,8±0,35 ^{ab}	0,1±0,03 ^a	42,2±4,22 ^b	23,3±2,08 ^a	34,6±1,58 ^a	4,3±0,44 ^{ab}	1,8±0,54 ^a
5 DIAS	5,9±0,33 ^{ab}	0,1±0,06 ^{ab}	45,1±2,35 ^b	22,9±0,81 ^a	33,9±1,85 ^a	4,8±0,75 ^b	2,2±0,41 ^a
> 5 DIAS	5,6±0,03 ^a	0,2±0,00 ^{ab}	34,4±1,02 ^a	24,4±0,20 ^a	34,8±0,29 ^a	4,6±0,05 ^{ab}	1,6±0,04 ^a

As médias classificadas com letras diferentes na mesma coluna, apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

A acidez titulável variou entre 0,1 a 0,2 %, expressa em %(m/m) de equivalentes de ácido láctico. Carvalho (2007) encontrou resultados semelhantes, detetando uma acidez média de 0,24%. Entretanto, Andrade (2006) encontrou acidez média de 0,42 % em amostras de Queijo de Coalho produzido no Ceará. Neste trabalho, não se observou uma relação entre os dias de maturação e a acidez, decorrendo as diferenças observadas das características individuais dos queijos. Estas variações no teor de acidez podem, como já foi referido, resultar de características distintas do leite utilizado na fabricação do queijo, mas também da ação enzimática das bactérias lácticas, naturalmente presentes em queijos fabricados com leite cru (Beresford *et al.*, 2001).

A humidade das amostras de Queijo de Coalho em função do número de dias de fabricação variou de 45,0 % a 34,9 %, sendo este último valor observado nas amostras com mais de cinco dias de fabricação e significativamente inferior às restantes médias. Silva *et al.* (2010) encontraram valores médios maiores para humidade nas amostras de Queijo de Coalho de Alagoas.

Os valores médios para cinzas variaram de 3,9 %, nos queijos com um dia de maturação, a 4,8 %, nos queijos com mais de cinco dias de maturação. Neste parâmetro, a média aumentou em função do número de dias de fabricação. Pesquisando sobre queijos regionais no Rio Grande do Norte, Nassu *et al.* (2006) encontraram valores médios semelhantes, enquanto Silva *et al.* (2010) encontraram valores médios abaixo em Queijo de Coalho do Sertão de Alagoas.

De forma a completar o processo de caracterização dos queijos incluídos neste estudo procurou-se avaliar as suas características organolépticas e demonstrar que se integram nos padrões reconhecidos para o Queijo de Coalho (SDA, 2001). Os atributos como cor, aparência, aroma, sabor e textura dos Queijos de Coalho produzidos no Sertão da Paraíba foram avaliados através da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) por um painel formado por quinze (15) provadores treinados, composto por funcionários públicos e alunos da UFCG, com idade entre 20 a 55 anos, incluindo seis homens e nove mulheres, com nível de escolaridade desde o ensino secundário ao ensino superior. A Tabela 2.8 apresenta os resultados da análise sensorial desses queijos.

Tabela 2.8: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.

Região	Código da Amostra	Cor amarelada	Aparência Molhada	Aroma Queijo Fresco	Aroma Ácido	Aroma Manteiga	Sabor Queijo Fresco	Sabor Manteiga	Sabor Salgado	Sabor Ácido	Textura Macia	Textura Borrachosa	Textura Seca
R1	R1A1	3,2±1,4 ^{ab}	6,9±1,6 ^a	5,1±2,8 ^a	4,7±2,8 ^a	2,7±1,9 ^a	5,0±2,5 ^a	2,6±1,9 ^a	4,0±1,6 ^{abcd}	3,9±2,6 ^{abc}	6,1±2,5 ^a	4,2±2,7 ^{ab}	2,2±1,6 ^a
	R1A2	5,9±2,0 ^{bc}	5,2±2,2 ^{bcde}	6,0±2,4 ^a	4,3±3,0 ^a	4,3±3,4 ^a	4,4±2,4 ^a	3,2±2,5 ^a	3,2±1,7 ^{abc}	3,1±2,2 ^a	4,1±2,0 ^a	6,3±2,4 ^b	4,2±2,3 ^{abcd}
	R1A3	4,7±2,6 ^{abc}	5,1±2,6 ^{abcde}	4,7±2,8 ^a	5,3±2,8 ^a	3,3±2,2 ^a	4,7±2,2 ^a	3,2±2,4 ^a	3,9±1,8 ^{abcd}	4,4±2,7 ^{abc}	4,6±2,4 ^a	4,8±3,0 ^{ab}	4,0±2,2 ^{abcd}
	R1A4	5,7±2,2 ^{bc}	4,4±2,4 ^{abcde}	4,7±2,4 ^a	4,6±2,2 ^a	3,3±1,9 ^a	3,7±2,0 ^a	3,6±2,6 ^a	4,9±2,0 ^{bcdef}	3,8±2,2 ^{abc}	4,3±2,5 ^a	5,3±2,3 ^{ab}	4,7±1,9 ^{abcd}
R2	R2A1	5,5±2,7 ^{bc}	2,1±1,2 ^a	4,7±2,3 ^a	4,7±2,6 ^a	4,6±2,9 ^a	5,1±1,8 ^a	4,7±2,7 ^a	4,6±2,4 ^{bcdef}	3,9±2,5 ^{abc}	3,9±2,3 ^a	5,5±2,6 ^{ab}	5,8±2,3 ^d
	R2A2	5,2±2,8 ^{bc}	2,7±1,6 ^{ab}	4,3±2,3 ^a	4,8±2,0 ^a	4,5±3,0 ^a	4,8±1,7 ^a	4,8±1,7 ^a	5,5±1,8 ^{cdef}	5,2±1,9 ^{abc}	4,1±2,3 ^a	4,9±2,3 ^{ab}	5,3±2,5 ^{cd}
	R2A3	4,2±2,4 ^{abc}	6,3±2,3 ^{de}	6,6±1,6 ^a	5,0±2,3 ^a	3,4±2,1 ^a	5,8±2,4 ^a	3,3±2,6 ^a	5,5±2,1 ^{cdef}	4,9±2,3 ^{abc}	5,7±2,3 ^a	4,2±2,5 ^{ab}	3,2±2,2 ^{abcd}
	R2A4	4,9±2,0 ^{bc}	5,5±2,1 ^{bcde}	4,5±2,7 ^a	4,9±2,5 ^a	3,1±2,2 ^a	4,5±2,3 ^a	3,5±2,4 ^a	4,3±1,9 ^{abcde}	3,3±1,7 ^{ab}	4,5±2,7 ^a	4,3±2,5 ^{ab}	3,9±2,0 ^{abcd}
R3	R3A1	4,1±2,5 ^{abc}	5,9±2,3 ^{cde}	5,2±2,3 ^a	4,6±2,5 ^a	3,5±2,8 ^a	4,9±2,5 ^a	4,1±2,8 ^a	5,8±2,0 ^{cdef}	3,4±2,0 ^{ab}	6,3±2,2 ^a	3,3±1,9 ^{ab}	3,4±1,6 ^{abcd}
	R3A2	4,1±2,3 ^{abc}	3,3±2,1 ^{abc}	4,5±2,6 ^a	5,9±2,3 ^a	4,1±2,8 ^a	4,0±2,3 ^a	3,5±2,0 ^a	4,3±2,4 ^{bcde}	6,4±2,4 ^{bc}	4,5±1,8 ^a	4,3±1,8 ^{ab}	5,0±2,4 ^{bcd}
	R3A3	3,1±2,1 ^{ab}	5,5±2,6 ^{bcde}	5,5±2,5 ^a	4,3±2,3 ^a	3,3±2,3 ^a	5,7±2,8 ^a	3,1±2,1 ^a	3,8±1,8 ^{abcd}	3,5±2,0 ^{ab}	5,8±2,6 ^a	3,0±1,9 ^a	2,9±1,6 ^{abc}
	R3A4	4,8±2,1 ^{bc}	4,5±2,1 ^{abcde}	4,2±2,5 ^a	3,4±2,4 ^a	4,5±2,4 ^a	4,7±2,6 ^a	4,7±2,6 ^a	2,0±1,0 ^a	3,0±2,0 ^a	4,9±2,3 ^a	4,5±2,4 ^{ab}	3,8±2,2 ^{abcd}
R4	R4A1	6,2±2,2 ^c	5,1±1,9 ^{abcde}	5,1±2,9 ^a	5,4±2,5 ^a	4,9±2,5 ^a	4,0±2,4 ^a	4,5±2,6 ^a	7,1±2,3 ^f	4,9±2,6 ^{abc}	5,1±2,3 ^a	5,0±2,6 ^{ab}	4,3±2,4 ^{abcd}
	R4A2	3,4±1,7 ^{abc}	6,1±2,5 ^{cde}	6,2±2,5 ^a	4,1±2,6 ^a	3,5±2,6 ^a	6,1±2,8 ^a	3,7±2,6 ^a	3,3±2,3 ^{abc}	2,9±2,1 ^a	6,3±2,7 ^a	3,4±2,4 ^{ab}	2,4±1,2 ^{ab}
	R4A3	3,6±2,3 ^{abc}	5,9±2,2 ^{cde}	6,1±2,4 ^a	4,8±2,8 ^a	3,5±2,5 ^a	5,8±2,7 ^a	4,0±2,4 ^a	6,7±2,6 ^{ef}	5,1±2,5 ^{abc}	5,0±2,5 ^a	4,7±2,5 ^{ab}	4,3±2,3 ^{abcd}
	R4A4	3,6±1,7 ^{abc}	6,3±1,9 ^{cde}	5,5±2,9 ^a	4,1±2,6 ^a	3,7±2,3 ^a	5,5±2,7 ^a	3,2±2,4 ^a	2,1±1,5 ^a	2,8±1,9 ^a	4,3±2,1 ^a	4,9±2,1 ^{ab}	3,5±2,1 ^{abcd}
R5	R5A1	5,4±2,0 ^{bc}	5,7±2,6 ^{bcde}	4,5±2,7 ^a	4,5±1,8 ^a	4,1±2,9 ^a	4,9±2,8 ^a	3,7±2,6 ^a	5,5±2,1 ^{cdef}	4,4±2,5 ^{abc}	3,6±2,1 ^a	4,1±2,1 ^{ab}	4,2±2,0 ^{abcd}
	R5A2	3,7±2,1 ^{abc}	6,9±1,8 ^e	5,6±2,7 ^a	4,5±2,3 ^a	2,9±2,3 ^a	5,3±3,3 ^a	2,9±2,3 ^a	4,3±2,2 ^{abcde}	4,0±2,7 ^{abc}	6,0±2,1 ^a	4,2±2,3 ^{ab}	2,4±1,2 ^{ab}
	R5A3	5,1±2,3 ^{bc}	4,9±2,5 ^{abcde}	5,4±2,3 ^a	5,3±2,4 ^a	3,5±1,8 ^a	5,2±3,0 ^a	3,9±2,0 ^a	4,0±2,0 ^{abcd}	4,9±2,6 ^{abc}	6,2±2,3 ^a	3,5±2,4 ^{ab}	3,1±2,1 ^{abcd}
	R5A4	4,8±2,8 ^{bc}	3,7±2,3 ^{abcd}	6,3±2,3 ^a	5,4±2,9 ^a	3,6±2,7 ^a	4,9±2,6 ^a	3,1±2,1 ^a	5,3±1,7 ^{bcdef}	4,6±2,6 ^{abc}	5,3±2,2 ^a	5,1±2,5 ^{ab}	4,3±2,4 ^{abcd}
R6	R6A1	1,8±1,2 ^a	3,5±2,3 ^{abcd}	5,1±2,6 ^a	5,4±2,5 ^a	3,0±2,2 ^a	4,3±2,9 ^a	2,7±1,9 ^a	4,3±2,5 ^{abcde}	6,8±2,6 ^c	5,5±1,8 ^a	3,9±2,0 ^{ab}	5,1±2,5 ^{bcd}
	R6A2	3,3±2,0 ^{abc}	4,8±2,6 ^{abcde}	5,5±2,4 ^a	5,0±2,6 ^a	3,2±2,5 ^a	6,0±2,4 ^a	3,1±2,4 ^a	5,6±2,1 ^{cdef}	5,3±2,6 ^{abc}	6,7±2,6 ^a	2,7±1,6 ^a	3,3±2,3 ^{abcd}
	R6A3	4,3±2,1 ^{abc}	5,5±2,4 ^{bcde}	5,7±2,6 ^a	4,8±2,7 ^a	3,4±2,3 ^a	6,0±2,1 ^a	3,6±2,2 ^a	5,7±1,8 ^{cdef}	4,4±1,9 ^{abc}	5,4±2,0 ^a	4,1±2,3 ^{ab}	2,7±1,3 ^{abc}
	R6A4	5,3±2,3 ^{bc}	4,5±2,4 ^{abcde}	5,4±2,3 ^a	4,6±2,4 ^a	2,7±1,8 ^a	5,1±2,0 ^a	3,4±2,3 ^a	5,1±2,3 ^{bcdef}	5,5±2,4 ^{abc}	5,3±1,8 ^a	4,8±2,2 ^{ab}	3,5±1,7 ^{abcd}
R7	R7A1	4,1±2,3 ^{abc}	4,7±2,4 ^{abcde}	5,5±2,1 ^a	4,9±2,6 ^a	3,5±2,7 ^a	5,1±2,8 ^a	3,7±2,5 ^a	6,4±1,8 ^{def}	5,5±2,4 ^{abc}	5,4±2,2 ^a	3,3±2,0 ^{ab}	2,7±1,3 ^{abc}
	R7A2	5,7±1,8 ^{bc}	3,6±1,8 ^{abcd}	5,0±2,2 ^a	5,1±2,3 ^a	4,3±2,4 ^a	5,0±2,1 ^a	4,8±2,0 ^a	3,4±1,8 ^{abc}	5,5±2,1 ^{bc}	6,1±2,9 ^a	3,2±2,2 ^{ab}	3,5±2,1 ^{abcd}
	R7A3	3,1±1,8 ^{ab}	6,3±2,2 ^{de}	5,3±2,5 ^a	3,3±2,1 ^a	2,3±1,7 ^a	5,9±2,3 ^a	2,9±1,9 ^a	2,6±1,2 ^{ab}	2,7±1,8 ^{ab}	6,0±1,9 ^a	5,7±2,3 ^{ab}	3,7±2,3 ^{abcd}
	R7A4	3,3±1,7 ^{ab}	6,0±2,0 ^{cde}	5,6±2,4 ^a	3,9±2,1 ^a	2,8±1,9 ^a	5,3±2,5 ^a	3,1±2,4 ^a	5,5±1,3 ^{cdef}	3,8±2,0 ^{abc}	6,3±1,9 ^a	2,7±1,5 ^a	2,9±1,6 ^{abc}

Médias e desvios padrão da avaliação de 15 provadores; médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias das avaliações dos atributos aroma de queijo fresco, aroma ácido e aroma de manteiga ($p < 0,05$). Este resultado indica que estes atributos não diferem significativamente entre as amostras consideradas, o que é certamente uma consequência de os queijos analisados apresentarem tempos de maturação curtos, pelo que o seu aroma é ainda dominado pelas características que mais se relacionam com a matéria-prima, e menos com aquelas que decorrem dos metabolitos formados durante a maturação como consequência da atividade microbiana.

Comparando as médias das avaliações dos atributos relacionados com o sabor e textura através de uma análise de variância (ANOVA, SPSS) verificou-se que só se observaram diferenças significativas entre amostras para os atributos sabor salgado, sabor ácido, textura borrachosa e textura seca. Para os restantes atributos (sabor a queijo fresco, sabor a manteiga e textura macia) as diferenças entre médias foram da mesma ordem que o desvio-padrão de cada avaliação, pelo que não se consideram significativas. Os atributos sabor a queijo fresco, sabor a manteiga e textura macia correspondem às características mais gerais deste produto, pelo que é de esperar que só queijos cujo processo de produção se afastasse muito dos procedimentos típicos, ou utilizasse matérias-primas muito alteradas deveriam apresentar diferenças significativas destes atributos, o que efetivamente não ocorreu.

Os atributos que apresentaram diferenças significativas entre queijos individuais (sabor salgado, sabor ácido, textura borrachosa e textura seca) são também aqueles que são mais suscetíveis de serem influenciados quer pela composição do leite, quer pelas características do processo de produção. De acordo com o Regulamento Técnico para Queijo de Coalho (SDA, 2001), no processo de fabricação deste queijo, algumas etapas apresentam características distintas como, coagulação em torno de 40 minutos, corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor ou massa crua, adição de sal à massa, além de prensagem.

As médias da avaliação da cor amarelada e aparência molhada entre os queijos individuais, para os quais se observaram diferenças significativas, estão apresentadas nas Figuras 2.2 e 2.3, respetivamente.

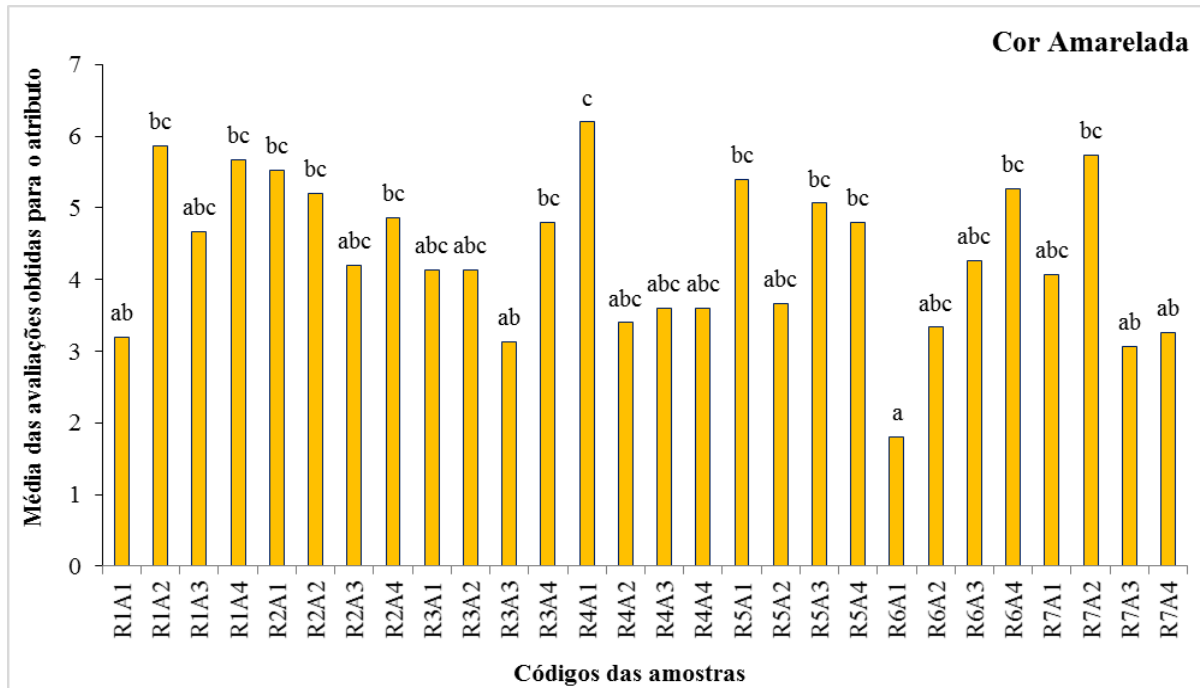


Figura 2.2: Comparação das médias do atributo cor amarelada entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

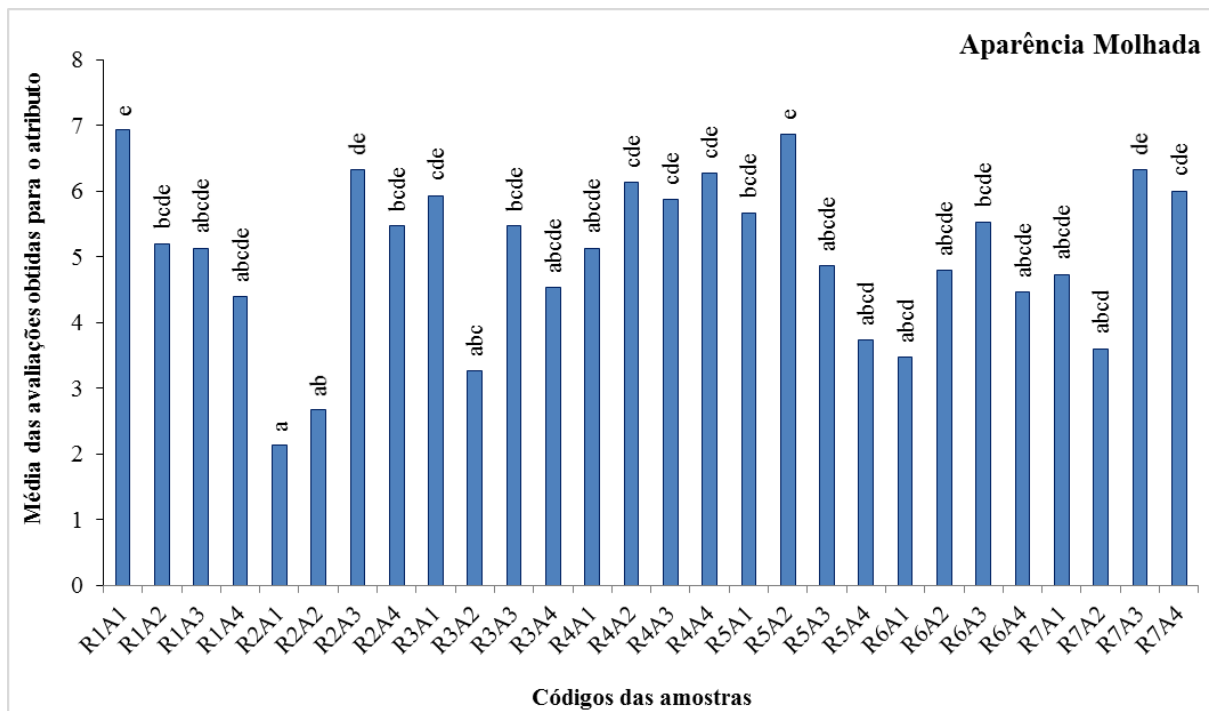


Figura 2.3: Comparação das médias do atributo aparência molhada entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

A intensidade de cor amarelada apresentou alguma variabilidade entre queijos individuais com diferenças significativas registradas entre diversas amostras ($p < 0,05$). A cor amarelada do queijo R4A1 foi significativamente superior à dos queijos R6A1, R1A1, R3A3, R7A3 e R7A4, enquanto a cor

amarelada do queijo R6A1 foi significativamente inferior à dos queijos R1A2, R1A4, R2A1, R2A2, R2A4, R3A4, R4A1, R5A1, R5A3, R5A4, R6A4 e R7A2 (Figura 2.3).

Silva *et al.* (2012), analisando características sensoriais do Queijo de Coalho artesanal no Sertão alagoano, encontrou diferenças quanto à intensidade da cor. Os queijos que não apresentavam aquecimento da massa apresentavam uma cor creme claro, enquanto os queijos que apresentavam aquecimento da massa apresentavam uma coloração creme-amarelada.

Estas diferenças parecem decorrer de fatores relacionados com o processo de produção que sendo artesanal pode apresentar maior variabilidade do que os processos industrializados, o que se pode traduzir numa maior separação entre soro e matéria coalhada, com implicações no aspeto final do queijo. Especificamente no caso da cor amarelada, diferenças no teor de gordura e teor de carotenoides do leite utilizado na produção do queijo podem afetar este atributo do queijo. Os resultados obtidos parecem indicar uma variabilidade destes fatores entre locais de produção, sem que se observe uma tendência regional.

A Figura 2.3 apresenta a comparação das médias da aparência molhada, outro atributo que apresentou diferenças significativas entre amostras individuais. Características particulares na preparação de cada queijo são menos controladas e reguladas em processos artesanais do que em produção industrializada e nomeadamente a pressão mecânica exercida e o tempo de prensagem podem afetar a separação entre o soro e a matéria coagulada influenciando a aparência final do queijo.

Semelhante ao atributo cor amarelada não se observou uma distribuição regional deste atributo, mas sim alguma variabilidade entre amostras individuais, que apresentaram algumas diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Em particular, as amostras R1A1 e R5A2 apresentaram uma média da avaliação do parâmetro aparência molhada significativamente superior ($p < 0,05$) às médias das amostras R2A1, R2A2, R3A2, R5A4, R6A1 e R7A2, enquanto as amostras R2A1 e R2A2 apresentaram médias das avaliações da aparência molhada significativamente inferiores ($p < 0,05$) às das amostras R1A1, R2A3, R3A1, R4A2, R4A3, R4A4, R5A2, R7A3, R7A4.

Diferenças significativas entre amostras individuais dos queijos de Coalho foram observadas também nos atributos quanto ao sabor salgado e ácido, conforme as Figuras 2.4 e 2.5.

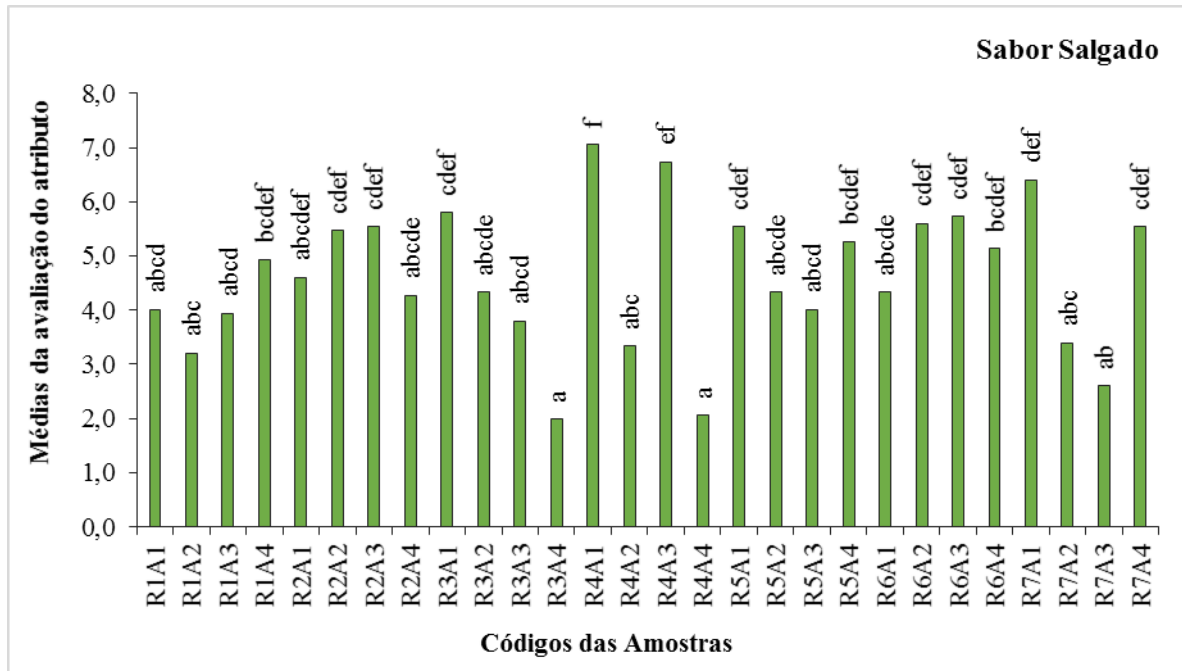


Figura 2.4: Comparação das médias do atributo sabor salgado entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

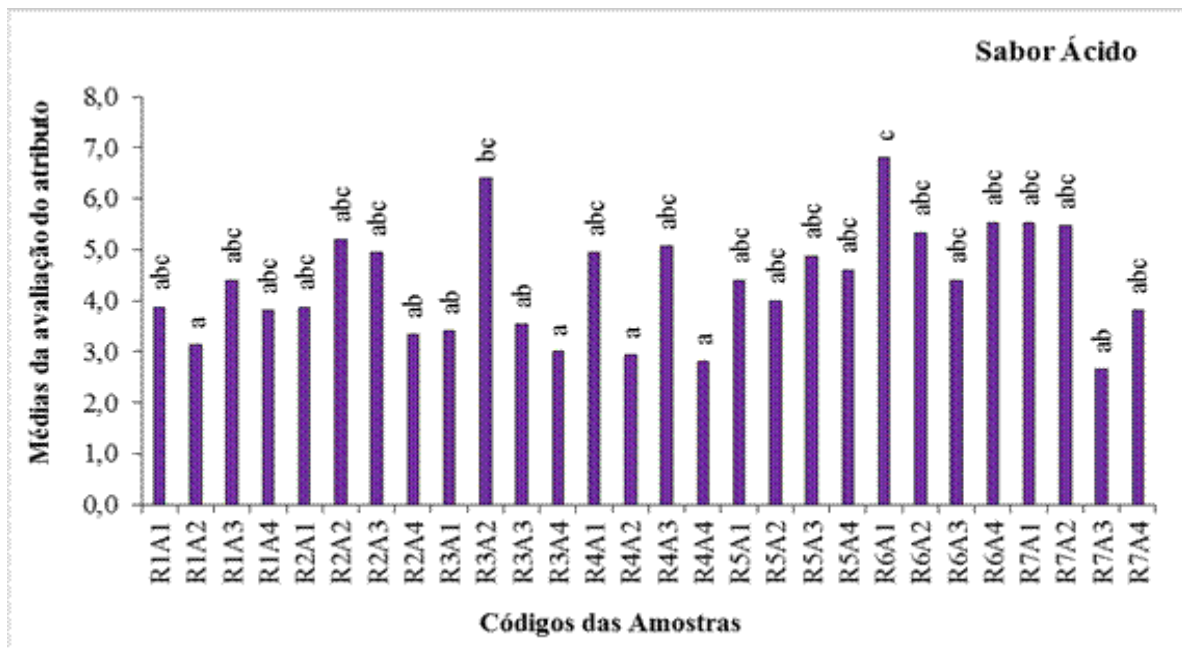


Figura 2.5: Comparação das médias do atributo sabor ácido entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

O sabor salgado depende da quantidade de NaCl que é adicionada durante a confeção do queijo. Este é o exemplo de um atributo para o qual o caráter artesanal do processamento deve introduzir alguma variabilidade que é provavelmente atenuada nos processos industrializados. A adição de sal, nos processos artesanais é frequentemente feita de forma empírica ou com medidas aproximadas sem

recurso a processos rigorosos de pesagem pelo que se observam diferenças importantes entre queijos da mesma região como é o caso da região de Patos (R4) e da região da Serra de Teixeira (R7).

O sabor salgado e sabor ácido apresentam uma variabilidade entre queijos individuais, com diferenças significativas ($p < 0,05$), entre as amostras individuais. O Queijo de Coalho da região R4A1 foi o que apresentou maior média quanto ao sabor salgado quando comparado com as amostras dos queijos R3A4 e R4A4. Mesmo sendo uma comparação entre amostras individuais, a região de Patos (R4) foi a apresentou os queijos mais salgados, com as maiores médias, mas também um dos queijos menos salgados (R4A4). Este registro vem reforçar a ausência de padronização no processamento deste queijo, resultante do processo artesanal.

Além disto, a variabilidade nas respostas dos provadores, que não é inédita, pode ter sido afetada por um caráter pessoal, uma vez que a percepção dos sabores salgado ou doce é frequentemente afetada pela sensibilidade individual a estas características, apesar do treinamento prévio realizado com os mesmos.

Sabor ácido, salgado, levemente salgado e levemente amanteigado são atributos característicos do Queijo de Coalho e foram atribuídos aos queijos produzidos com leite cru. O atributo sabor ácido apresentou maior homogeneidade entre os Queijos de Coalho do que o sabor salgado, talvez por ser mais dependente das características do leite do que do processo de fabricação. Assim observam-se diferenças significativas entre queijos individuais, em particular entre as amostras R1A2, R3A4, R4A2, R4A4 e as amostras R3A2 e R6A1, sem que se observe uma tendência regional que se possa atribuir a fatores genéticos ou ambientais. Silva *et al.* (2010) também observou diferenças na análise sensorial realizada com Queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado, com três processamentos diferentes.

A textura de borracha ou borrachosa é uma característica que está mais associada à forma de coagulação da proteína (que depende do processo de produção) e à proporção entre proteína e gordura (que é consequência das características do leite utilizado). Apesar de ser relativamente homogêneo este atributo apresentou avaliações significativamente diferentes para o queijo R1A2, que apresentou maior intensidade desta textura relativamente aos queijos R3A3, R6A2 e R7A4, ou seja, observaram-se variações pontuais entre amostras, mas não foi possível identificar tendências em regiões específicas (Figura 2.6). Segundo Mamede (2008), no ponto de vista do consumidor, a textura é uma das propriedades mais importantes. Quanto à textura borrachosa não é indesejável por todos, uma vez que o consumidor prefere o Queijo de Coalho mais elástico (borrachoso) para ser usado como churrasco (Mamede, 2008).

A Figura 2.7 representa a comparação das médias do atributo textura seca que apresentaram diferenças significativas entre amostras individuais.

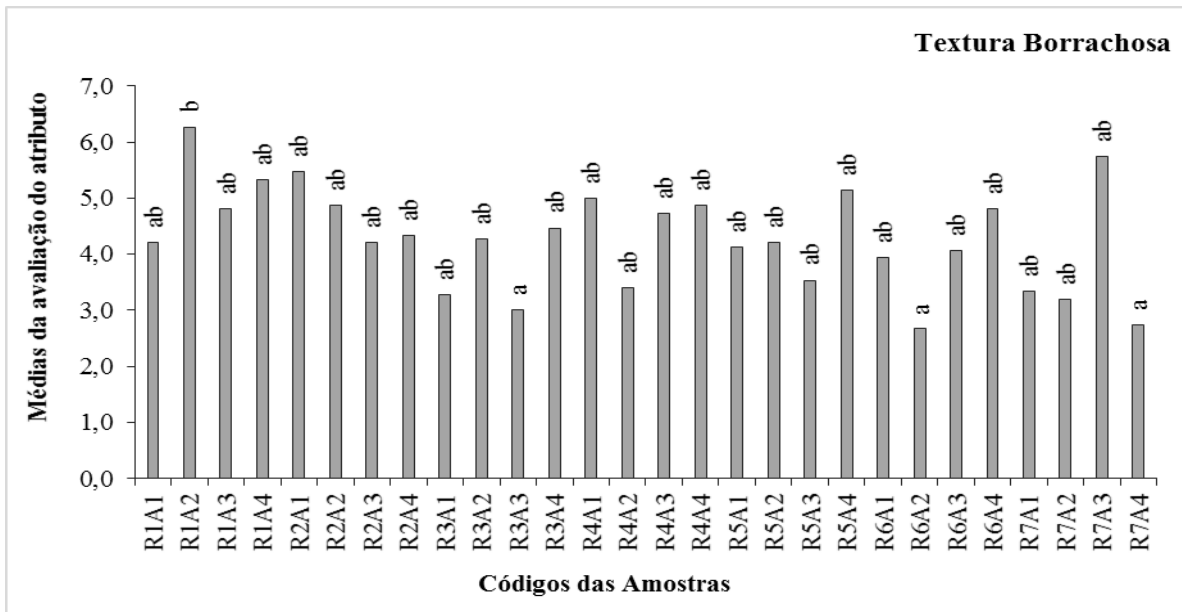


Figura 2.6: Comparação das médias do atributo textura borrachosa entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

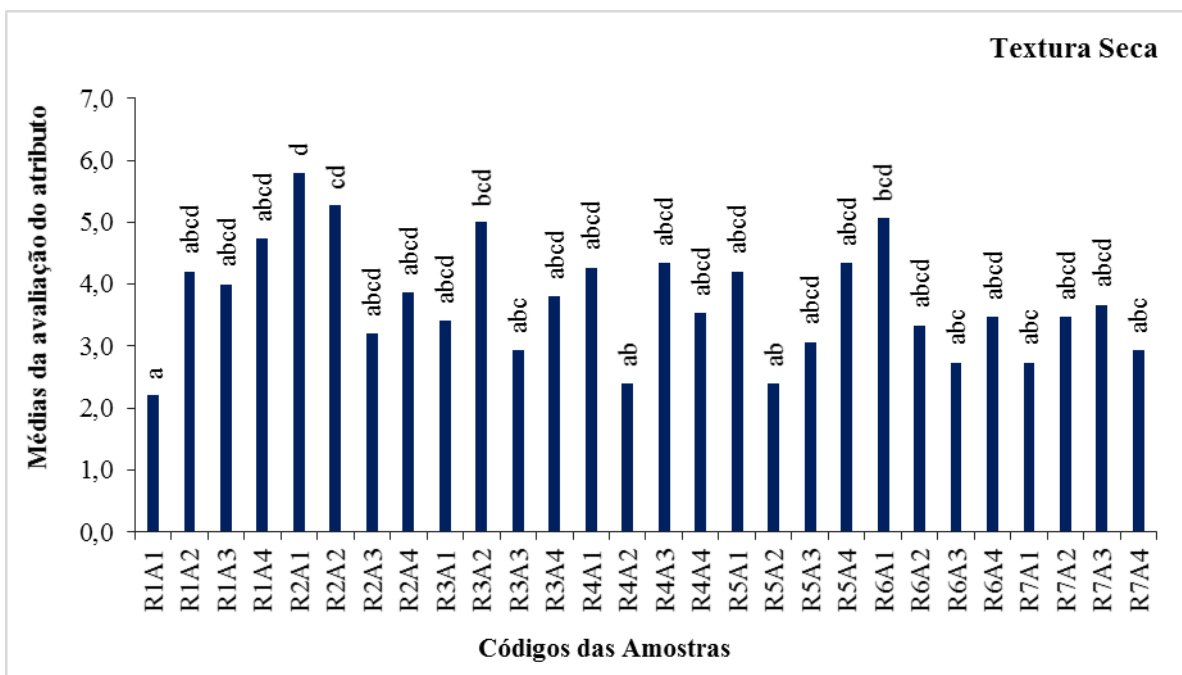


Figura 2.7: Comparação das médias do atributo textura seca entre amostras individuais de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

Na análise sensorial de queijos, alguns atributos são mais influenciados por fatores específicos como a composição do leite. Os atributos textura borrachosa e textura seca que apresentaram diferenças significativas entre amostras de queijos individuais ($p < 0,05$). De acordo com Perry (2004) o teor de gordura do leite tem um efeito marcante na textura, palatabilidade e firmeza do queijo, e Benevides *et al.* (2000) relata que o processamento também pode influenciar na textura dos queijos.

Quanto ao atributo textura seca, destacaram-se os queijos R2A1 e R2A2, com médias significativamente superiores às dos queijos R1A1, R4A2 e R5A2. As demais amostras de Queijos de Coalho foram relativamente homogêneas quanto a este atributo (Figura 2.7). Segundo Silva *et al.* (2010), comparando características sensoriais de Queijos de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado, com três diferentes processamentos no Sertão de Alagoas, também encontrou resultados distintos quanto à cor, aroma e textura. Benevides *et al.* (2000) analisando sensorialmente o Queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado, observaram que o queijo produzido com leite cru foi melhor avaliado quanto aos sabor e textura.

Foram também avaliadas as médias dos atributos analisados na ADQ para todos os queijos de cada região (Tabela 2.9) e para todos os queijos com os mesmos dias de maturação (Tabela 2.10), para verificar se haviam diferenças sensoriais entre regiões e entre tempos de maturação.

Tabela 2.9: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho por regiões, produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil

Região	Cor Amarelada	Aparência Molhada	Aroma Queijo Fresco	Aroma Ácido	Aroma Manteiga	Sabor Queijo Fresco	Sabor Manteiga	Sabor Salgado	Sabor Ácido	Textura Macia	Textura Borrachosa	Textura Seca
R1	3,2±1,4 ^{ab}	5,4±2,3 ^{ab}	5,1±2,8 ^a	4,7±2,8 ^a	2,7±1,9 ^a	4,5±2,3 ^a	3,2±2,3 ^a	4,0±1,8 ^a	3,8±2,4 ^a	4,8±2,4 ^{ab}	5,2±2,7 ^b	3,8±2,2 ^{ab}
R2	5,9±2,0 ^b	4,2±2,5 ^a	6,0±2,4 ^a	4,3±3,0 ^a	4,3±3,4 ^a	5,1±2,1 ^a	4,1±2,4 ^a	5,0±2,1 ^a	4,3±2,2 ^{ab}	4,6±2,4 ^a	4,7±2,5 ^{ab}	4,5±2,5 ^b
R3	4,7±2,6 ^{ab}	4,8±2,4 ^{ab}	4,7±2,8 ^a	5,3±2,8 ^a	3,3±2,2 ^a	4,8±2,6 ^a	3,9±2,4 ^a	4,0±2,3 ^a	4,1±2,5 ^a	5,4±2,3 ^{ab}	3,8±2,1 ^a	3,8±2,1 ^{ab}
R4	5,7±2,2 ^{ab}	5,9±2,1 ^b	4,7±2,4 ^a	4,6±2,2 ^a	3,3±1,9 ^a	5,3±2,7 ^a	3,9±2,5 ^a	4,8±3,1 ^a	3,9±2,5 ^a	5,2±2,5 ^{ab}	4,5±2,4 ^{ab}	3,6±2,1 ^{ab}
R5	5,5±2,7 ^{ab}	5,3±2,6 ^{ab}	4,7±2,3 ^a	4,7±2,6 ^a	4,6±2,9 ^a	5,1±2,9 ^a	3,4±2,2 ^a	4,8±2,0 ^a	4,5±2,6 ^{ab}	5,3±2,4 ^{ab}	4,3±2,4 ^{ab}	3,5±2,1 ^{ab}
R6	5,2±2,8 ^a	4,6±2,5 ^{ab}	4,3±2,3 ^a	4,8±2,0 ^a	4,5±3,0 ^a	5,4±2,4 ^a	3,2±2,2 ^a	5,2±2,2 ^a	5,5±2,4 ^b	5,7±2,1 ^{ab}	3,9±2,1 ^a	3,7±2,1 ^{ab}
R7	4,2±2,4 ^{ab}	5,2±2,3 ^{ab}	6,6±1,6 ^a	5,0±2,3 ^a	3,4±2,1 ^a	5,3±2,4 ^a	3,6±2,3 ^a	4,5±2,2 ^a	4,4±2,4 ^{ab}	5,9±2,2 ^b	3,8±2,3 ^a	3,2±1,9 ^a

Médias e desvios padrão da avaliação de 15 provadores; médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Tabela 2.10: Média e desvio-padrão dos atributos da análise sensorial dos Queijos de Coalho por dias de maturação, produzido na Paraíba, Nordeste, Brasil.

Grau de Maturação	Cor Amarelada	Aparência Molhada	Aroma Queijo Fresco	Aroma Ácido	Aroma Manteiga	Sabor Queijo Fresco	Sabor Manteiga	Sabor Salgado	Sabor Ácido	Textura Macia	Textura Borrachosa	Textura Seca
1,0	3,6±2,4 ^a	4,9±2,6 ^a	5,4±2,5 ^a	4,8±2,4 ^a	2,9±2,1 ^a	3,6±2,2 ^a	4,9±2,7 ^a	3,0±2,1 ^a	4,6±2,3 ^{ab}	5,4±2,8 ^b	5,6±1,9 ^a	4,3±2,2 ^a
2,0	4,0±2,3 ^a	4,8±2,6 ^a	5,3±2,5 ^a	4,5±2,4 ^a	3,8±2,6 ^a	3,8±2,3 ^a	5,4±2,4 ^a	3,8±2,5 ^a	4,4±2,3 ^{ab}	3,9±2,3 ^a	5,3±2,6 ^a	3,9±2,3 ^a
3,0	4,5±2,2 ^a	5,2±2,3 ^a	5,2±2,4 ^a	4,4±2,5 ^a	3,5±2,3 ^a	3,4±2,0 ^a	4,9±2,5 ^a	3,6±2,3 ^a	4,0±2,1 ^a	4,0±2,4 ^a	5,5±2,4 ^a	4,3±2,5 ^a
5,0	4,7±2,3 ^a	5,1±2,4 ^a	5,4±2,6 ^a	5,1±2,5 ^a	3,8±2,5 ^a	4,0±2,2 ^a	5,0±2,5 ^a	3,7±2,3 ^a	5,6±2,3 ^b	4,8±2,4 ^{ab}	4,9±2,3 ^a	4,5±2,3 ^a
> 5,0	4,7±2,6 ^a	5,1±2,6 ^a	4,7±2,8 ^a	5,3±2,8 ^a	3,3±2,2 ^a	4,0±2,2 ^a	4,7±2,2 ^a	3,2±2,4 ^a	3,9±1,8 ^a	4,4±2,7 ^{ab}	4,6±2,4 ^a	4,8±3,0 ^a

Médias e desvios padrão da avaliação de 15 provadores; médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Analisando as características agrupadas por região, observa-se que as amostras de Queijo de Coalho da região de Cajazeiras (R2) foram as que apresentaram maior intensidade de cor amarelada e valores mais baixos na avaliação da aparência molhada, sendo a sua média significativamente inferior às amostras dos queijos da região de Patos (R4) ($p < 0,05$). Estas observações podem ser decorrentes de algumas diferenças nas características do leite, ou na forma de processamento dos queijos, que podem afetar a separação do soro de leite da coalhada.

Na Figura 2.8 podem-se observar as diferenças significativas na média das avaliações para os atributos cor amareladas e aparência molhada.

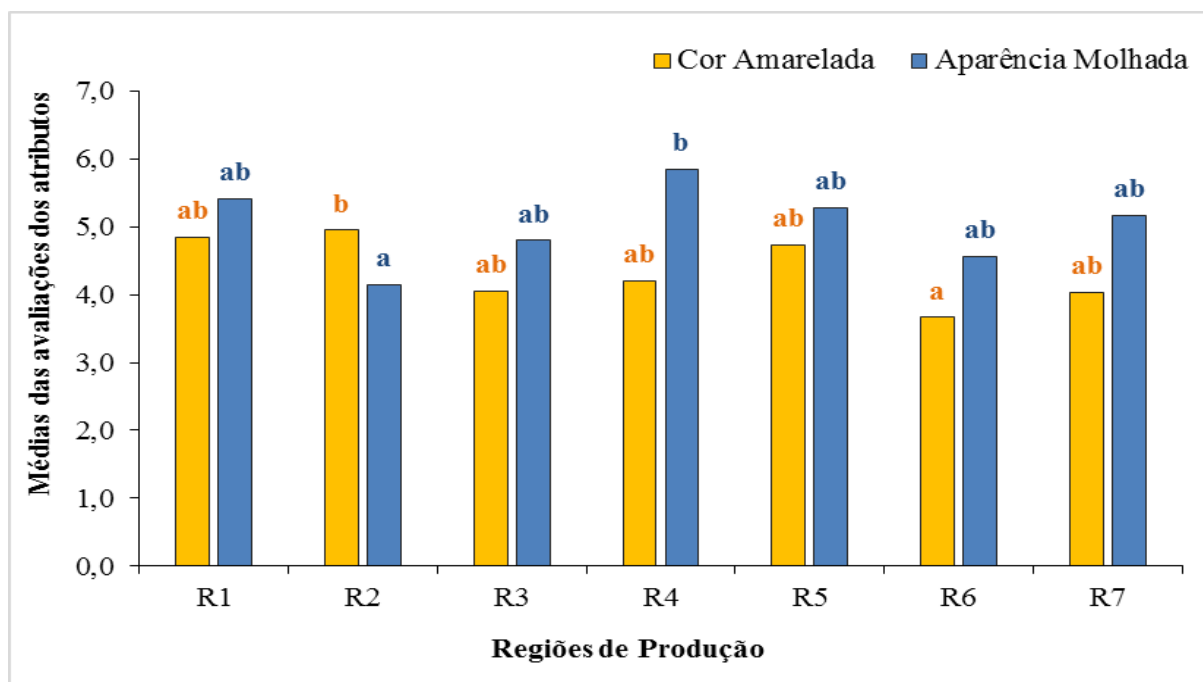


Figura 2.8: Comparação das médias das avaliações dos atributos quanto à cor amarelada e aparência molhada, entre as amostras de Queijo de Coalho das diferentes regiões da Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

Os queijos da região 2 (Cajazeiras) apresentaram uma média da avaliação da cor amarelada significativamente superior aos queijos da região 6 (Itaporanga), o que poderá refletir diferenças na composição do leite produzido nestas duas regiões; estas diferenças podem ocorrer em consequência das características específicas da vegetação, clima e genética das vacas leiteiras nestas duas regiões.

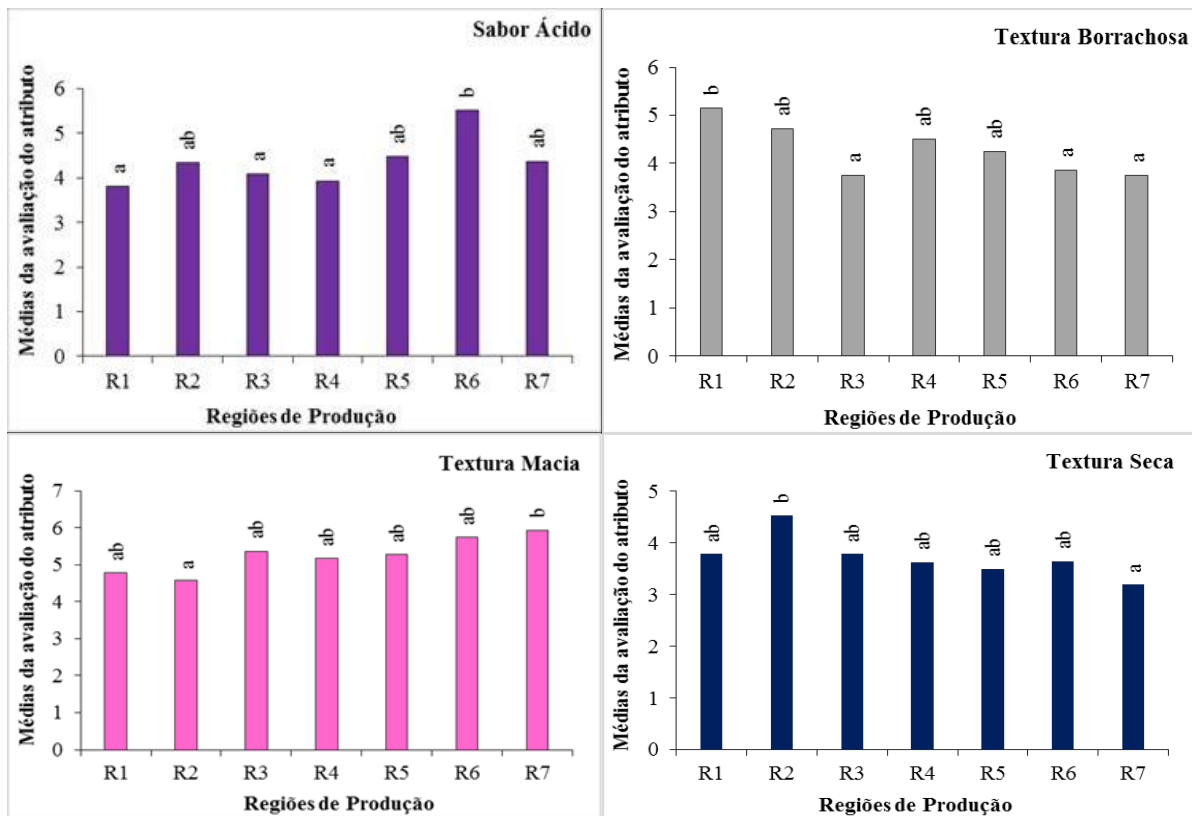


Figura 2.9: Comparação das médias das avaliações dos atributos quanto ao sabor ácido, textura borrachosa, textura macia e textura seca, entre as amostras de Queijo de Coalho das diferentes regiões da Paraíba, Brasil (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

Comparando as médias das avaliações dos atributos verificaram-se diferenças significativas nas amostras de Queijo de Coalho entre regiões quanto ao sabor ácido, à textura borrachosa, à textura macia e textura seca (Figura 2.9). Nos demais atributos (aroma queijo fresco, aroma ácido, aroma manteiga, sabor queijo fresco, sabor manteiga e sabor salgado) as diferenças entre as médias foram da mesma ordem que o desvio-padrão, considerando não significativas as diferenças entre médias. As médias dos atributos por dias de maturação também foram avaliadas. Os resultados apresentados na Tabela 2.10 demonstram que a média e o desvio-padrão dos atributos cor amarelada, aroma manteiga, aroma queijo fresco, aroma ácido, aroma manteiga, sabor queijo fresco, sabor manteiga, sabor salgado, textura borrachosa e textura seca não apresentaram diferenças significativas. Os atributos sabor ácido e textura macia, apresentaram médias e desvios-padrão com diferenças significativas, com nível de significância de $p < 0,05$, em particular o sabor ácido apresentou uma média superior para um tempo de maturação de 5 dias e a textura macia apresentou uma média mais elevada para um tempo de maturação de 1 dia.

No entanto, para verificar se ocorre alguma neutralização das diferenças entre os atributos dos queijos ao efetuar as médias de queijos de diferentes regiões e o mesmo tempo de maturação ou médias de queijos com o mesmo tempo de maturação, mas de diferentes regiões, representámos as médias dos atributos dos queijos com o mesmo tempo de maturação e a mesma região (Figura 2.10).

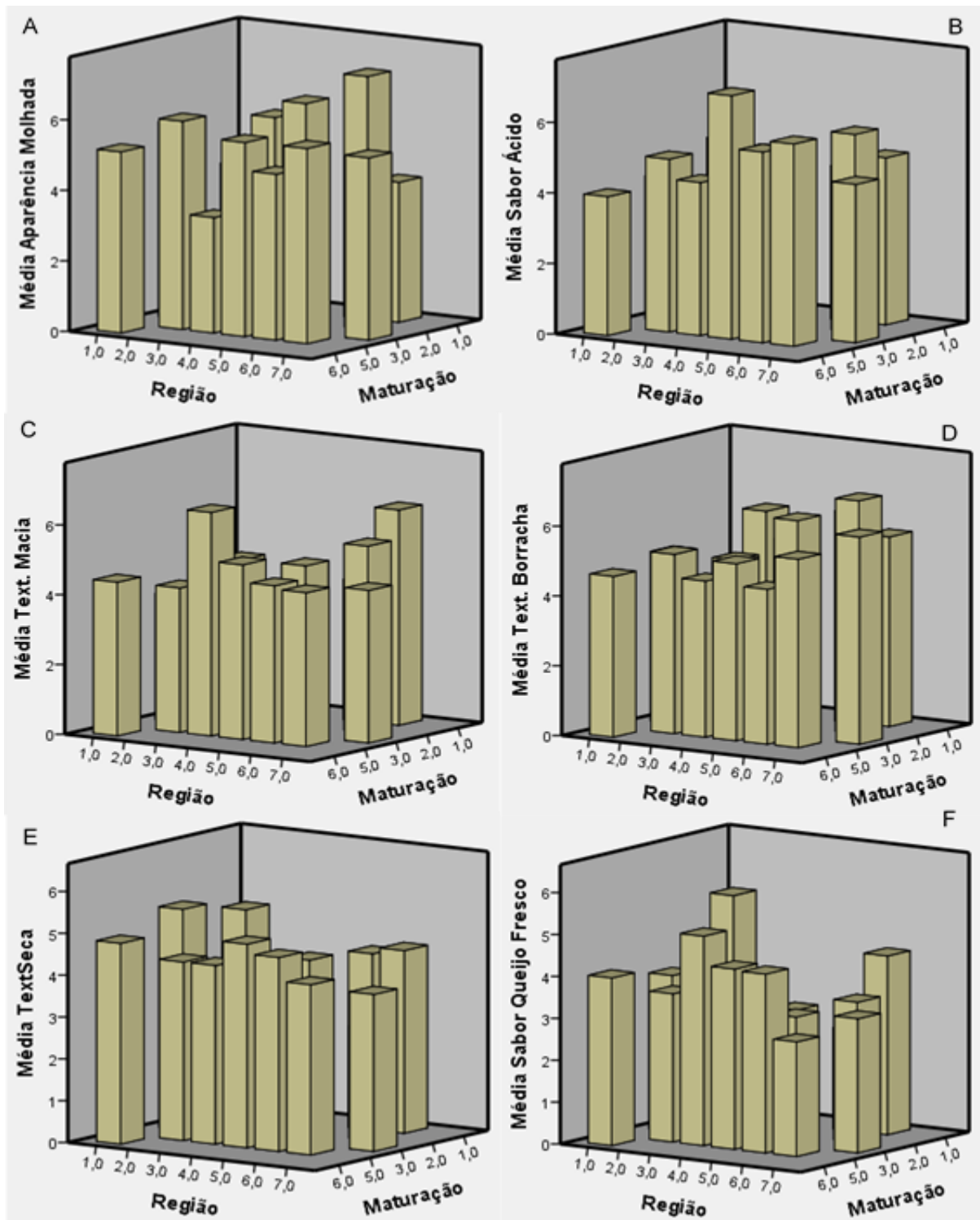


Figura 2.10: Médias dos atributos da análise sensorial com diferença significativa por região e dias de maturação A – Aparência molhada; B – Sabor ácido; C – Textura macia; D – Textura borrachosa; E – Textura seca; F – Sabor queijo fresco (médias classificadas com letras diferentes apresentam diferenças significativas, $p < 0,05$).

Ao cruzar as médias dos atributos das regiões com os dias de maturação pretendia-se avaliar a interferência dos dias de maturação nos atributos sensoriais dos Queijos de Coalho. Aparência

molhada, sabor ácido, textura macia, textura borrachosa, textura seca e sabor queijo fresco apresentaram médias com diferenças significativas. No entanto, não se observou uma tendência homogênea quanto aos dias de maturação. Isto pode ser justificado pelo fato deste queijo ser consumido fresco, com até 10 (dez) dias de fabricação (SDA, 2001).

A intensidade da associação linear existente entre as variáveis da composição química e os atributos da análise sensorial foi analisada através da Correlação de Pearson, considerando como fortemente positivas as correlações com $0,8 \leq \rho < 1$, e moderadamente positivas as correlações com $0,5 \leq \rho < 0,8$ e fortemente negativas as correlações com $-1 \leq \rho < -0,8$ (Tabela 2.11).

Tabela 2.11: Coeficientes de Correlação de Pearson entre variáveis da composição físico-química e atributos da análise sensorial do Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil, que apresentaram correlações fortemente positivas.

Variável 1	Variável 2	Coefficiente de Correlação de Pearson
Acidez	pH	-0,75
Aparência molhada	Aroma queijo fresco	0,84
	Sabor queijo fresco	0,85
	Textura macia	0,83
Aroma queijo fresco	Aroma ácido	0,90
	Aroma manteiga	0,86
	Sabor queijo fresco	0,95
	Sabor manteiga	0,85
	Sabor ácido	0,81
	Textura macia	0,91
	Textura borrachosa	0,83
	Sabor salgado	0,76
	Textura seca	0,75
	Aroma manteiga	Sabor queijo fresco
Sabor manteiga		0,96
Sabor ácido		0,82
Textura borrachosa		0,86
Textura seca		0,88
Sabor queijo fresco	Sabor manteiga	0,87
	Sabor ácido	0,78
	Textura macia	0,91
	Textura borrachosa	0,78
Sabor manteiga	Sabor salgado	0,75
	Sabor ácido	0,82
	Textura macia	0,81
	Textura borrachosa	0,84
	Textura seca	0,86
Sabor salgado	Sabor ácido	0,82
Sabor ácido	Textura macia	0,78
Sabor ácido	Textura seca	0,81
Textura borrachosa	Textura seca	0,88

Entre os componentes químicos foi encontrado uma correlação fortemente negativa ($\rho = -0,758$) entre pH e acidez titulável em ácido láctico, o que seria expectável dado que são variáveis inversas. A correlação moderadamente positiva ($\rho = 0,52$) entre cinzas e cloretos é justificada pelo facto de o cloreto ser um mineral, e, portanto, se encontrar diluído com os outros minerais.

Quanto à análise sensorial vários atributos apresentaram correlações fortemente ou moderadamente positivas. O aroma de queijo fresco apresentou correlações fortemente positivas com sete dos doze atributos analisados, com destaque para o sabor queijo fresco ($\rho = 0,95$), textura macia ($\rho = 0,91$) e aroma ácido ($\rho = 0,90$). Silva et al. (2010) relataram diferenças na caracterização sensorial

dos queijos de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado, no Sertão de Alagoas. Os queijos de Coalho produzidos com leite cru apresentaram aroma ácido, suavemente amanteigado, textura macia e borrachosa, e sabor característico de Queijo de Coalho: ácido, salgado ou levemente salgado e levemente amanteigado. O aroma manteiga também revelou uma forte correlação positiva com o sabor manteiga ($p = 0,96$), assim como textura borrachosa com textura seca, com um $p = 0,88$.

2.4 Conclusões

Os resultados obtidos nesta caracterização físico-química e sensorial dos Queijos de Coalho da Paraíba mostraram que as amostras analisadas apresentam boa qualidade do ponto de vista da sua composição e propriedades organolépticas correspondendo de uma forma geral aos padrões definidos para o Queijo de Coalho.

Foi possível registrar algumas diferenças significativas entre as médias das variáveis de composição ou dos atributos sensoriais dos queijos de cada microrregião da Paraíba o que poderá traduzir quer características específicas da matéria-prima ou do processo de produção.

Os queijos da microrregião 1 (Catolé do Rocha) caracterizaram-se por um elevado teor de proteína e baixos teores de humidade e cinzas; estes queijos apresentaram classificações elevadas no atributo textura borrachosa, o que pode estar relacionado com uma maior presença de proteína e menor presença de gordura na massa coagulada.

Os queijos da região 2 (Cajazeiras) apresentaram acidez baixa (pH elevado) e a nível sensorial obtiveram classificações elevadas nos atributos aparência molhada e textura seca; estas características distintivas poderão estar relacionadas pois o pH afeta a forma como a massa do queijo coagula bem como a sua capacidade de retenção de água.

Os queijos da região 4 (Patos) distinguiram-se por elevado teor de humidade e baixo teor de cinzas; a nível sensorial apresentaram classificações elevadas no parâmetro cor amarela, que poderá traduzir uma maior proporção de gordura relativamente à quantidade de proteína.

Os queijos da região 5 (Piancó) caracterizaram-se por valores elevados do teor de cinzas e teores baixos do teor de proteína; estes queijos apresentaram também baixa acidez, o que pode estar associado ao elevado teor de cinzas que geralmente conferem aos alimentos um carácter alcalino.

Os queijos da região 6 (Itaporanga) distinguiu-se por valores elevados de acidez, baixo teor de proteína e como seria de esperar, a nível organoléptico distinguiu-se pelo sabor ácido; estas são características menos associáveis ao processo de produção e mais às características da matéria-prima que por sua vez decorrem de características genéticas e fisiológicas do rebanho bem como de fatores ambientais.

Finalmente, os queijos da região 7 (Serra do Teixeira) apresentaram baixa acidez e baixo teor de cinzas e a nível sensorial obtiveram classificações elevadas no parâmetro textura macia; apesar de não corresponderem a valores máximos estes queijos apresentaram também valores relativamente elevados de gordura que podem contribuir para uma textura mais macia e menos borrachosa da massa coagulada.

No entanto, as diferenças observadas nas características dos Queijos de Coalho da Paraíba parecem ser sobretudo uma consequência de diferenças individuais de composição do leite quer a nível químico quer a nível do seu microbiota e em particular da sua população de bactérias do ácido láctico, cuja importância na definição das características do queijo é conhecida.

O processo de produção e as opções individuais de cada produtor afetam também de forma relevante as propriedades dos queijos sendo, por exemplo, da mesma região os queijos que apresentaram o maior e o menor teor de sal.

Referências

- Alves, L.M.C., Amaral, L.A., Corrêa, M.R., Sales, S.S. 2009. Qualidade microbiológica do leite cru e de Queijo de Coalho comercializados informalmente na cidade de São Luís - MA. *Pesquisa em Foco*, 17, 1-13.
- Andrade, A. A. 2006. Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de Queijo de Coalho produzido no Ceará. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- ANVISA. 2012. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº 50/2012.
- Aquino, F.T.M. 1983. Produção de Queijo de Coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas. 1993. Análise sensorial dos alimentos e bebidas. NBR 12806. Rio de Janeiro, p.8.
- Benevides, S.D., Telles, F.J.S., Guimarães, A.C.L, Rodrigues, M.C.P. 200. Estudo bioquímico e sensorial do Queijo de Coalho produzido com leite cru e pasteurizado no estado do Ceará. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos – B.*, 18, 193-206.
- Beresford, T. P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L., Cogan, T. M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Caridi, A., Micari, P., Foti, F., Ramondino, D., Sarullo, V. 2003. Ripening and seasonal changes in microbiological and chemical parameters of the artisanal cheese Caprino d'Aspromonte produced from raw or thermized goat's milk. *Food Microbiology*, 20, 201-209.
- Carvalho, J. D. G. 2007. Caracterização da microbiota láctica isolada de Queijo de Coalho artesanal produzido no ceará e de suas propriedades tecnológicas. Dissertação (Doutoramento), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Cavalcante, J.F.M., Andrade, N.J., Furtado, M. M., Ferreira, C.L.L.F., Pinto, C.L.O., Elard, E. 2007. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 27, 205-214.
- Durlu-Ozkaya, F., Xanthopoulos, V., Tunaii, N. e Litopoulou-Tzanetaki, E. 2001. Technologically important properties of lactic acid bacteria isolates from Beyaz cheese made from raw ewes'milk. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 861-870.
- Feitosa, T. 1984. Estudos tecnológicos, físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do Queijo de Coalho no estado do Ceará. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Felicio, T.L., Esmerino, E.A., Cruz, A.G., Nogueira, L.C., Raices, R.S., Deliza, R., Bolini, H.M., Pollonio, M.A. 2013. Cheese. What is its contribution to the sodium intake of Brazilians? *Appetite*, 66, 84-88.

Freitas, W.C. 2011. Aspectos higiênico-sanitários, físico-químicos e microbiota lática de leite cru, Queijo de Coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba. Tese (Doutoramento), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

Geissler, C. e Powers, H. 2010. *Human Nutrition*, Churchill Livingston Elsevier, Londres, p.748.

Instituto Adolfo Lutz. 1985. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. IAL, São Paulo, p.533.

Leach, C. 1978. *Introduction to statistics: A nonparametric approach for the social science*. Nova Iorque, John Wiley & Sons.

Mamede, P.L. 2008. Efeito da temperatura de cozimento sobre as propriedades tecnológicas do Queijo de Coalho. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MAPA. 1996. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 de março de 1996, p. 3977-3978

Nassu, R.T., Araujo, R.S., Guedes, C.G.M., Rocha, R.G.A. 2003. *Diagnóstico das condições de processamento e caracterização físico-química de queijos regionais e manteiga no Rio Grande do Norte*, Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza.

Nassu, R.T., Macedo, B.A., Lima, M.H.P. 2006. *Queijo de Coalho*. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, p. 40.

Nassu, R.T., Silva, M.A.A.P.D., Viotto, W.H. 2004. Variações sensoriais em Queijo de Coalho artesanal e industrial consumido em Fortaleza, Ceará. *In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Recife.

Noro, G., González, F.H.D., Campos, R., Dürr, J.W. 2006. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35, 1129-1135.

Peres, J.R. 2001. O leite como ferramenta de monitoramento nutricional. *In: O uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Perez, R. M. 2005. Perfil sensorial, físico-químico e funcional de Queijo de Coalho comercializado no município de Campinas, S.P. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Perry, K.S.P. 2004. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, 27, 293-300.

Queiroga, R., Santos, B., Gomes, A., Monteiro, M., Teixeira, S., Leite de Souza, E., Pereira, J., Queiroga, M. 2013. Nutritional, texture and sensory properties of Coalho cheese made of goats', cows' Milk and their mixture. *LWT-Food Science and Technology*, 50, 538-544.

Sant'Ana, A.M.S., Bezerril, F.F., Madruga, M.S., Batista, A.S., Magnani, M., Souza, E.L., Queiroga, R.C. 2013. Nutritional and sensory characteristics of Minas fresh cheese made with goat Milk, cow Milk, or a mixture of both. *Journal of Dairy Science*, 96, 7442-7453.

Sena, M.J., Cerqueira, M.M.O.P., Morais, C.F.A., Correa, E.S., Souza, M.R. 2000. Características físico-químicas de Queijo de Coalho comercializado em Recife-PE. *Revista Higiene Alimentar*, 14, 41-44.

SDA. 2001. Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 30 de 26 de junho de 2001. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de Manteiga da Terra, Queijo de Coalho e queijo Manteiga. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de julho de 2001, p.13.

Silva, M.C.D., Ramos, A.C.S., Moreno, I., Maraes, J.O. 2010. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de Queijos de Coalho. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69, 214-221.

Silva, R.A., Bismara, P.A., Moura, R.B., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H. 2012. Avaliação da microbiota bacteriana do Queijo de Coalho artesanal produzido na região Agreste do Estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 1732-1738.

Silva, R.A. 2012. Caracterização microbiológica, físico-química, proteômica e bioativa de Queijos de Coalho artesanal produzidos na região Agreste do Estado de Pernambuco, Brasil. Dissertação (Doutoramento), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SETDE. 2008. Governo do Estado da Paraíba. Secretaria de Estado do Turismo e do Desenvolvimento Económico. Perfil Tecnológico das Queijeiras do Sertão da Paraíba, p.59.

Stone, H., Siedel, J. 1993. *Sensory evaluation practices*. Academic Press, Nova Iorque, p.338.

Viana, A.C. 2009. Avaliação de Queijo de Coalho produzido com bactérias lácticas endógenas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia, Salvador.

CAPÍTULO

3

**Determinação do perfil de ácidos gordos do Queijo de
Coalho artesanal da Paraíba**

3.1 Introdução

3.1.1 Características funcionais do queijo

Segundo Fox e colaboradores (2000), o queijo é considerado um dos produtos alimentares mais complexos e dinâmicos que existe. O seu estudo envolve aspetos analíticos, físico-químicos, bioquímicos, microbiológicos, reológicos e sensoriais.

Segundo Zengin e colaboradores (2011) o queijo é considerado uma fonte de nutrientes essenciais, especialmente, proteínas, aminoácidos, gordura, ácidos gordos, vitaminas e minerais. Por isso, o queijo é um importante produto lácteo como parte integrante de uma dieta saudável.

De acordo com Geissler e Powers (2010) os nutrientes presentes nos diferentes tipos de queijo e sua concentração dependem da composição do leite e do seu processamento.

Durante o processamento ocorrem no queijo diversas reações metabólicas, como a lipólise, proteólise e glicólise, promovidas pelas enzimas de origem microbiana e animal presente no leite e/ou no coalho (Bezerra, 2015).

A lipólise é um processo que resulta na libertação de ácidos gordos de cadeia média e curta, através da hidrólise dos lípidos. Esses ácidos gordos libertados desempenham um importante papel no desenvolvimento do sabor e aroma dos queijos (Santos *et al.*, 2011; Randazzo *et al.*, 2010).

Além de fontes de nutrientes conhecidos e importantes, como proteínas, minerais (cálcio, fósforo), vitaminas e lactose, os produtos lácteos também são fontes ricas de ácidos gordos como o ácido linoleico, ácido eicosapentaenóico, ácido docosahexaenóico e ácido linoleico conjugado.

Segundo Perini e colaboradores (2010) os ácidos gordos estritamente essenciais são assim designados porque não podem ser sintetizados pelo homem e devem ser obtidos diretamente através da dieta. Os ácidos gordos linoleico (C18:2 n-6) e alfa-linolénico (C18:3 n-3) são considerados estritamente essenciais (Luna *et al.*, 2007). Outros ácidos gordos são considerados essenciais pois também não são sintetizados pelo homem, mas podem ser produzidos a partir de precursores presentes na dieta (Perini *et al.*, 2010).

Os ácidos gordos desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos. No homem, os ácidos linoleico e alfa-linolénico (Figura 3.1) são necessários na manutenção das condições normais as membranas celulares, cerebrais e transmissão de impulsos nervosos. Além disso estes compostos são precursores dos ácidos gordos das famílias n-6 e n-3, através das enzimas alongase e dessaturase (Martin *et al.*, 2006).

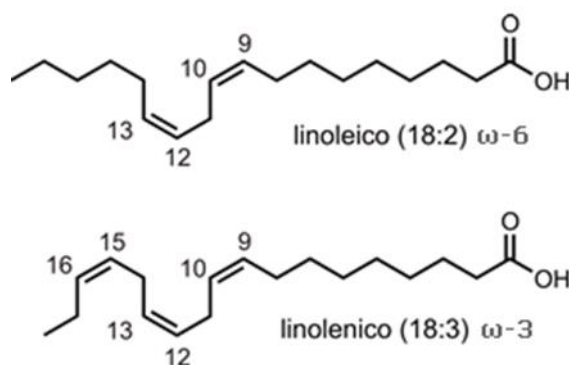


Figura 3.1: Estrutura dos ácidos linoleico e alfa-linolénico. (Fonte: Martin *et al.*, 2006).

Os ácidos gordos polinsaturados compreendem as famílias de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6, também chamados de ácidos gordos polinsaturados de cadeia muito longa (Martin *et al.*, 2006).

O ácido docosahexanóico (C22:6 n-3), também conhecido pela sigla ADH, é um ácido gordo polinsaturado que apresenta uma importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina (Perini *et al.*, 2010), sendo predominante na maioria das membranas celulares desses órgãos, atuando nas suas propriedades físicas, características dos seus recetores, nas interações celulares e atividade enzimática (Martin *et al.*, 2006).

O ácido araquidónico (C20:3 n-6) e o ácido eicosapentanóico (C20:5 n-3), também conhecido como AEP, são precursores dos prostanoídes e leucotrienos, que agem em inúmeras funções celulares com propriedade anti-inflamatória (Martin *et al.* 2006).

No entanto, além das suas importantes propriedades nutracêuticas, os ácidos gordos, livres ou conjugados destacam-se dentre os componentes químicos dos queijos pela sua participação nas reações bioquímicas responsáveis pelo sabor e aroma. Resultantes da lipólise, os ácidos gordos livres (FFA) são os principais constituintes do sabor do queijo e podem ser precursores de componentes do aroma tais como as metil cetonas, os álcoois e as lactonas.

Segundo Martin e colaboradores (2006) os ácidos gordos das famílias n-6 e n-3 estão envolvidos em inúmeras reações de alongação de cadeia de ácido gordo, em particular observou-se forte influência da conversão do ácido alfa-linolénico em ácidos de cadeia longa pelos níveis do ácido linoleico. Em virtude disto, a ingestão diária de alimentos que sejam fontes desses ácidos assume grande importância na nutrição humana.

O ácido linoleico conjugado (CLA) é formado por um grupo de isómeros posicionais e geométricos do ácido octadecadienóico (C18:2) em que as duas ligações duplas são separadas por apenas uma única ligação simples. As propriedades nutracêuticas do ácido linoleico com ligações conjugadas estão relacionadas às atividades anticarcinogénica, anticolesterolémica, imunomoduladora, bem como de proteção contra osteoporose e doenças degenerativas. Além disso, é reconhecida como um fator de crescimento e redutor de tecido adiposo. Dois isómeros destacam-se pela atividade biológica, o 9-*cis*, 11-*trans* C18:2 e o 10-*trans*, 12-*cis* C18:2 (Domagała *et al.*, 2010).

O CLA é sintetizado no rúmen como resultado de uma bio-hidrogenação incompleta do ácido linoleico, por ação de microrganismos presentes neste meio, ou por uma conversão endógena do ácido

vacénico (C18:1 *trans*-11) (Medeiros, 2009) que ocorre nos tecidos dos ruminantes, como na glândula mamária (Kramer *et al.*, 2004).

As maiores fontes de CLA na dieta do homem são o leite e seus derivados. O queijo destaca-se como o derivado lácteo mais importante, com concentrações que variam quanto à origem da matéria-prima, do processamento do queijo e dos microrganismos usados na cultura láctea. Segundo Domagala e colaboradores (2010), na gordura do leite, cerca de 73 a 93% do teor total de CLA está representado pelo isómero 9-*cis*, 11-*trans* C18:2.

Algumas pesquisas sobre o nível de CLA em produtos lácteos têm vindo a ser desenvolvidas nos últimos anos em países da Europa. Prandini e colaboradores (2011) compararam o teor de ácidos gordos e a concentração de CLA em queijos franceses e italianos comerciais e concluíram que não houve diferença na concentração de CLA entre os queijos da mesma espécie de ruminante, sugerindo que os fatores envolvidos no processo de fabricação de queijos, geralmente não afetam o conteúdo de CLA na gordura do leite.

Temiz e colaboradores (2009), pesquisando sobre o perfil de ácidos gordos em queijo de leite de vaca e/ou de ovelha cru, sem padronização de processamento, concluiu que o perfil de FFA do queijo regional Herby, da Turquia, baseia-se principalmente em três componentes que se apresentaram em maior concentração, os ácidos cáprico, palmítico e oleico.

Quanto aos queijos de leite cru isto é especialmente importante, pois a lipase nativa não é desativada pela pasteurização. Segundo Fernández-García e colaboradores (2006), a hidrólise de *triglicéridos* do leite em ácidos gordos livres (FFAs) pelas lipases dos microrganismos nativos do leite é um fenômeno importante no desenvolvimento de sabor durante a maturação do queijo. Ávila e colaboradores (2007) também encontraram associação de grupo de microrganismos específicos e uma maior taxa de acumulação de FFA durante a maturação de queijos.

Rodrigues e colaboradores (2011) e Lin e colaboradores (2003) identificaram vários microrganismos como potenciais produtores do ácido linoleico conjugado (CLA), incluindo cepas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Xu e co-autores (2005) relataram as bactérias probióticas, *Lactobacillus rhamnosus* e *Propionibacterium freudenreichii* como produtoras de CLA em modelos de leite enriquecido com óleo de soja. Oliveira e colaboradores (2009) relataram aumento do teor de CLA em leite fermentado adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Streptococcus thermophilus*. Segundo Kramer *et al.* (2004) os ruminantes que se alimentam exclusivamente de pasto apresentam níveis mais elevados de ácidos gordos, especialmente o CLA, quando comparados com animais que se alimentam de rações secas (cereais, palhas).

Os ácidos gordos juntamente com outros compostos são responsáveis pelo desenvolvimento do sabor e aroma dos queijos. Vários compostos são acumulados durante de maturação dos queijos como aldeídos, cetonas, álcoois e compostos voláteis (Melo, 2014).

Segundo Collins e colegas (2003), a lipólise é uma das reações mais importantes que ocorre no queijo. Nesta reação as lípases, enzimas lipolíticas, quebram as ligações dos ácidos gordos e do glicerol, produzem ácidos gordos livres como, mono e di-glicéridos. As enzimas que participam dessa reação podem ser do leite, do coalho ou dos microrganismos encontrados na matéria-prima ou inoculadas durante o processo de produção dos queijos.

A gordura do queijo desempenha vários papéis na qualidade do queijo, afetando diretamente a textura, atuando como fonte de compostos aromáticos e agindo como solvente para os compostos produzidos a partir de lípidos de queijos (Temiz *et al.*, 2009). Os ácidos gordos livres de cadeia curta e média resultantes da lipólise são os responsáveis pelas características sensoriais do queijo.

Marrone e os seus co-autores (2014) estudaram o perfil de ácidos gordos e colesterol no queijo Pecorino Carmasciano, queijo tradicional do Sul da Itália. Estes encontraram um elevado conteúdo de ácidos gordos monoinsaturados e poliinsaturados, além da presença dos ácidos eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e docosahexanóico (C22:6 n-3), representando 0,26 e 0,21%, respetivamente, e do ácido linoleico conjugado com 0,5%.

Addis e colaboradores (2015) avaliaram o perfil dos ácidos gordos em função da variação sazonal no queijo Pecorino Romano, um queijo de massa semi-cozida obtido com leite de ovelha. Os valores nutricionais da gordura do queijo, associado particularmente com os ácidos linoleico, ruménico e vacénico, diminuíram em função da estação do ano, em relação ao período de inverno e verão, provavelmente devido a variações da alimentação e no pasto, das condições atmosféricas (temperatura, humidade) e do estado fisiológico dos animais, que também é afetado por estes fatores sazonais.

Queiroga e colaboradores (2009) avaliaram o perfil de ácidos gordos do queijo de leite de cabra tipo 'Coalho' comercializado no estado da Paraíba. Os resultados encontrados para os ácidos mirístico, palmítico e oleico foram 11,95%, 27,96% e 15,41%, respetivamente. A ausência de padronização no processamento desses queijos tem vindo a ser indicada como um dos fatores que interfere diretamente no perfil dos ácidos gordos deste produto lácteo.

Prandini, e co-autores (2011) estudaram a composição de ácidos gordos e CLA de queijos comerciais da Itália e da França. Os queijos fabricados com leite de ovelha apresentaram maior nível de CLA, seguido do queijo de leite de vaca e depois os de leite de cabra. Quando comparada a técnica de produção, os queijos apresentaram diferenças significativas no perfil de ácidos gordos, o que pode ser atribuído ao grau de lipólise nos queijos comparados.

Microrganismos probióticos são capazes de sintetizar CLA e essa característica é desejável e adapta-se perfeitamente como valor agregado aos alimentos funcionais, considerada uma nova de linha de pesquisa para área de produtos agropecuários. Probióticos são microrganismos viáveis que podem trazer benefícios à saúde quando administrados em quantidade adequada (Sanders, 2003). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são algumas das bactérias probióticas mais comumente usadas nos alimentos lácteos funcionais devido à sua capacidade de síntese do CLA livre nos produtos lácteos (Oliveira *et al.*, 2009).

Fernández-García *et al.* (2006) estudaram a variação sazonal do conteúdo de ácidos gordos livres de queijos de ovelha espanhóis. Foram encontradas diferenças significativas na concentração dos FFA em todos os queijos, com exceção para os ácidos gordos de cadeia média (MCFA-C10:0 a C14:0). Todas as concentrações individuais de FFA aumentaram significativamente com a maturação. A maior concentração dos FFA foi encontrada nos queijos fabricados na primavera, sendo atribuída ao nascimento de boregos e diferentes estagios de lactação. Ácidos gordos de cadeia curta (C4:0 a C8:0) representaram 16,9%, 13,0% e 15,8% dos FFA nos queijos Manchego, La Serena e Zamorano,

enquanto que os ácidos gordos insaturados (C18:1 e C18:2) foram responsáveis por 27,0, 34,5 e 27,8% dos FFA dos mesmos queijos, respetivamente.

Resultados para os ácidos gordos saturados (Tabela 3.1) e mono e polinsaturados (Tabela 3.2) isolados de diversos tipos de queijos, de países diferentes, são apresentados a seguir.

Os ácidos gordos também podem ser agrupados pelo tamanho da cadeia e tipo de ligação entre carbonos. A Tabela 3.3 apresenta concentrações dos ácidos gordos agrupados por tamanho da cadeia e tipo de ligação isoladas de queijos encontradas por vários investigadores, em amostras de queijos de diferentes países.

Tabela 3.1: Referências, tipo de queijo, maturação e concentração dos ácidos gordos saturados isolados de vários tipos de queijos.

Referências/ Unidades	Tipo de Queijo	Tempo de maturação	ÁCIDOS GORDOS															
			C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C11:0	C12:0	C13:0	C14:0	C15:0	C16:0	C17:0	C18:0	C19:0	C20:0	C21:0	C22:0
Zengin <i>et al.</i> , 2011 (%)	Queijo branco (Turquia)	1 dia	0,57	0,93	0,87	2,26	0,21	2,93	0,14	10,80	1,39	37,07	0,76	7,54	0,01	0,03	0,02	0,07
Domagala <i>et al.</i> , 2010 (%)	Queijo Emmental (Polônia)	180 dias	3,72	2,44	1,47	3,16	-	3,46	-	11,25	1,21	30,66	0,66	10,64	-	-	-	-
Temiz <i>et al.</i> , 2009 (%)	Queijo Herby (Turquia)	150 dias	1,79	1,39	1,04	2,91	-	2,25	-	8,94	1,11	25,61	0,85	12,71	-	1,03	-	-
Mele <i>et al.</i> , 2011 (g/100g)	Queijo Pecorino (Itália)	1 dia	4,38	3,45	3,65	5,07	0,04	2,94	0,06	8,53	0,95	20,53	0,58	10,52	-	0,27	0,07	0,13
Atosoy e Türkoglu, 2009 (mg/100g)	Queijo Urfa (Turquia)	1 dia	0,83	0,60	0,48	0,65	-	0,98	-	12,49	-	22,57	-	11,58	-	-	-	-
Oliveira <i>et al.</i> , 2009 (%)	Queijo Mozzarella (Brasil)	45 dias	1,48	1,33	1,53	2,98	0,08	3,54	0,24	13,83	1,01	30,82	0,43	13,62	-	-	-	-
Kim <i>et al.</i> , 2014 (%)	Queijo Mozzarella (Coreia)	45 dias	-	-	-	-	-	-	-	13,25	-	37,68	-	15,31	-	-	-	-
Romano <i>et al.</i> , 2011 (%)	Queijo Mozzarella (Itália)	45 dias (verão)	3,4	1,76	,38	2,85	0,27	3,92	0,10	13,64	1,42	26,35	0,67	10,21	-	0,20	-	0,09
Esposito <i>et al.</i> , 2014 (g/100g)	Queijo Caciocavallo (Itália)	-	2,32	1,21	1,19	2,51	0,42	2,74	0,16	11,69	1,49	29,43	1,14	12,95	-	0,22	-	-

Tabela 3.2: Referências, maturação e concentração dos ácidos gordos mono e polinsaturados isolados de vários tipos de queijos.

Referências/ Unidades	Tipo de Queijos	Tempo de Maturação	ACIDOS GORDOS MONO E POLINSATURADOS										
			C14:1	C16:1	C18:1	C18:2	C18:3	C20:4	C20:5	C22:5	C22:6	CLAc9t11	CLAt10c12
Zengin <i>et al.</i> , 2011 (%)	Queijo branco (Turquia)	1 dia	1,43	2,84	24,09	2,16	0,18	0,22	0,05	0,02	0,06	0,56	0,02
Domagala <i>et al.</i> , 2010 (%)	Emmental (Polónia)	180 dias	1,12	1,76	19,35	1,67	0,65	-	-	-	-	0,74	-
Temiz <i>et al.</i> , 2009 (%)	Herby (Turquia)	150 dias	0,39	1,53	29,24	0,43	1,70	-	0,11	-	-	-	-
Mele <i>et al.</i> , 2011 (g/100g)	Pecorino (Itália)	1 dia	0,11	0,34	3,44	2,21	0,60	0,11	0,05	0,10	0,05	-	-
Atosoy e Türkoglu, 2009 (mg/100g)	Urfa (Turquia)	1 dia	-	-	14,44	0,45	-	-	-	-	-	-	-
Oliveira <i>et al.</i> , 2009 (%)	Mozzarella (Brasil)	45 dias	0,31	0,42	22,65	1,51	0,21	0,13	-	-	-	1,04	-
Kim <i>et al.</i> , 2014 (%)	Mozzarella (Coreia)	45 dias	-	-	26,27	3,39	0,20	0,23	0,04	0,05	-	-	-
Romano <i>et al.</i> , 2011 (%)	Mozzarella (Itália)	45 dias (verão)	0,38	2,56	18,69	1,91	0,15	0,07	0,04	0,07	-	0,79	0,09
Esposito <i>et al.</i> , 2014 (g/100g)	Caciocavallo (Itália)	-	0,72	2,46	24,00	2,04	0,98	0,17	-	-	-	-	-
Prandini <i>et al.</i> , 2011 (%)	Queijo fresco de vaca (Itália e França)	-	-	-	17,86	1,87	0,35	-	-	-	-	6,10	-

Tabela 3.3: Referência dos resultados de ácidos gordos agrupados por tamanho das cadeias e tipo de ligação isolados de queijos

TIPOS DE QUEIJO	REFERÊNCIAS							
	Domagala <i>et al.</i> , 2010 (%)	Temiz <i>et al.</i> , 2008 (%)	Oliveira <i>et al.</i> , 2009 (%)	Kim <i>et al.</i> , 2014 (%)	Romano <i>et al.</i> , 2011 (%)	Esposito <i>et al.</i> , 2014 (g/100g)	Prandini <i>et al.</i> , 2011 (%)	Marrone <i>et al.</i> , 2014 (%)
	Emmental (Polônia)	Herby (Turquia)	Mozzarella (Brasil)	Mozzarella (Coreia)	Mozzarella (Itália)	Caciocavallo (Itália)	Queijo fresco de vaca (Itália e França)	Pecorino Carmasciano (Itália)
SCFA (C4:0 a C9:0)	-	9,39	-	-	68,43	67,47	-	51,3
MCFA (C10:0 a C15:1)	-	39,07	-	-	-	28,22	-	19,8
LCFA (C16:0 a C22:6)	-	47,38	-	-	38,66	-	67,31	4,30
SFA	57,88	59,63	71,65	66,65	2,29	-	-	-
MUFA	25,36	33,26	25,45	22,70	25,64	-	-	-
PUFA	3,06	2,94	2,90	9,74	4,28	-	-	-

Legenda: SCFA-Ácidos gordos de cadeia curta; MCFA-Ácidos gordos de cadeia média; LCFA-Ácidos gordos de cadeia longa; SFA-Ácidos gordos saturados; MUFA-Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA-Ácidos gordos polinsaturados.

3.1.2 Técnica analítica para determinação dos ácidos gordos

A gordura é um dos componentes principais do queijo que influencia profundamente o seu valor nutricional e as suas propriedades organolépticas. A natureza dos ácidos gordos, nomeadamente, o seu número de carbonos e o seu grau de insaturação afetam o seu ponto de fusão e, portanto, a textura do queijo, bem como a sua cor e sabor. O aroma e sabor do queijo são especialmente afetados pelos ácidos gordos livres e em particular os de cadeia curta.

A análise de perfis de ácidos gordos livres e totais requer em primeiro lugar que seja isolada de forma eficiente e representativa a gordura do queijo. Alguns métodos de extração da gordura de queijo e de outros produtos lácteos que empregam ácidos concentrados para quebrar as estruturas lipoproteicas e separar a gordura, não são adequados ao estudo de perfis de ácidos gordos, pois, podem alterar a sua composição, principalmente o seu grau de insaturação.

A extração com solventes apolares (hexano, éter de petróleo) é uma forma comum de extração de gordura, mas requer que a matriz esteja isenta de água de forma a permitir a homogeneização eficiente da matriz e do solvente de forma a maximizar a extração.

Algumas técnicas são usadas na determinação e quantificação dos compostos presentes nos queijos. Na análise dos ácidos orgânicos vários autores citam o uso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detetor ultravioleta/visível (UV-Vis) em pesquisas com diversos tipos de queijos (Califano e Bevilacqua, 2000; Park e Lee, 2006; Buffa *et al.*, 2004). A literatura também reporta a utilização da técnica de HPLC com detetor de fluorescência (FD) na determinação de ácidos gordos em queijo italiano (Mangia *et al.* 2008).

Em virtude da importância dos ácidos gordos nos produtos lácteos, métodos eficientes e confiáveis para análise de ácidos gordos e do CLA são de grande importância para a obtenção de informação detalhada. A cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID) ou a um espectrómetro de massa (GC-MS), são os métodos mais usados para quantificação desses compostos.

A cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS) é citada em vários trabalhos na determinação de ácidos gordos e compostos voláteis em queijos (Tavaria *et al.*, 2006; Berard *et al.*, 2007; Delgado *et al.*, 2011; Bontinis *et al.*, 2012).

A técnica de GC-MS apresenta elevada seletividade e sensibilidade (Hübschmann, 2009). A cromatografia gasosa é uma técnica analítica que consiste na injeção vários compostos numa coluna revestida de um polímero e através da qual se desloca uma corrente de gás inerte. Os compostos gasosos interagem com o revestimento da coluna, o que faz com que cada composto seja detetado em tempos diferentes, designados como tempos de retenção dos compostos. A existência de tempos de retenção diferentes para compostos bastante semelhantes do ponto de vista estrutural é o que confere à cromatografia gasosa sua eficiência analítica (McMaster, 2008).

A espectrometria de massa é uma técnica analítica que visa identificar moléculas através da sua conversão num conjunto de iões que serão separados no espectrómetro de massa através da razão massa/carga, originando um espectro cujas características se podem relacionar com a estrutura e peso molecular das moléculas originais.

O aparelho de GC-MS é composto essencialmente por um cromatógrafo gasoso e um espectrómetro de massa. O GC compreende um injetor, que pode ser manual ou automático, um forno que aquece a coluna, uma coluna geralmente capilar onde circula um gás de arraste, que pode ser azoto, hidrogénio ou hélio (geralmente o último). O gás de arraste é responsável pela eluição dos compostos volatilizados pelo aumento de temperatura do forno cromatográfico. O espectrómetro de massa é composto por uma fonte de ionização, lentes de focalização, analisador de massa, um detetor de iões e uma bomba (Melo, 2014). A Figura 3.2 mostra os componentes do GC-MS.

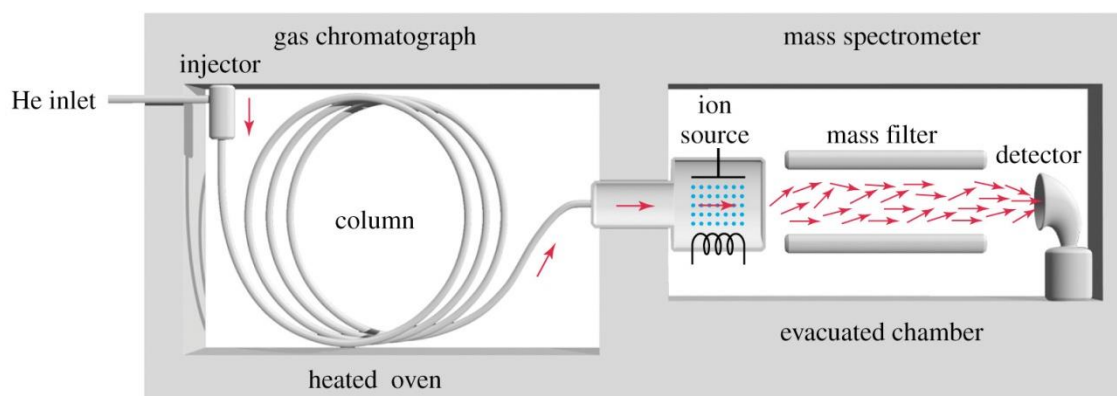


Figura 3.2: Componentes de um aparelho de cromatografia gasosa com espectrometria de massa (GC-MS). (Fonte: *Best images of diagram of the GC MS, 2016*).

O processo de derivatização da amostra é exigido pelo facto desta técnica analisar amostras voláteis. Este processo é a modificação química da molécula do analito de forma a minimizar a possibilidade de ocorrerem interações fortes no estado líquido. Após a extração dos compostos de fase aquosa para uma fase orgânica, a derivatização consiste em promover uma reação entre os grupos polares OH, NH ou SH e o agente derivatizante que vai geralmente substituir os hidrogénios desses grupos por grupos alquila não polares e ligados de forma estável por ligações covalentes (McMaster, 2008). Esta alteração aumenta fortemente a volatilidade dos analitos na medida em que limita a sua capacidade para se envolverem em ligações por pontes de hidrogénio.

No caso dos triglicéridos, componentes principais da fração lipídica dos alimentos, o processo de derivatização permite quebrar a ligação entre os ácidos gordos e o glicerol, seguindo-se a conversão dos ácidos gordos em ésteres metílicos por um processo designado por transesterificação. Este processo não só reduz de forma muito significativa o peso molecular dos analitos mas também os converte de uma forma mais polar (ácidos carboxílicos) numa forma menos polar (ésteres metílicos) (McMaster, 2008).

Apesar de existirem estudos sobre o perfil de ácidos gordos livres em diversos tipos de queijos de vários países, não existem dados detalhados sobre este perfil em Queijos de Coalho artesanais produzidos na Paraíba, no Nordeste do Brasil. Neste contexto, este estudo visou determinar e quantificar o perfil dos ácidos gordos totais no Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, como instrumento de identidade na qualidade deste queijo. Em particular, procurar-se-á

dosear o CLA e outros ácidos gordos polinsaturados que contribuem para as propriedades funcionais destes queijos.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Amostragem

As 28 amostras de Queijo de Coalho produzidas com leite sem pasteurização foram recolhidas em queijeiras e comércio local, acondicionadas e preservadas tal como descrito no Capítulo 2. As amostras destinadas à determinação do perfil de ácidos gordos foram acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo seco e transportadas para os Laboratórios do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa (DCTB), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, (FCT-UNL), Lisboa, Portugal. Após receção as amostras foram preservadas a -20°C até serem analisadas.

3.2.2 Extrato bruto da gordura

A extração da gordura bruta das amostras de queijo foi realizada com base no método de De Jong e Badings (1990), com algumas modificações. Cerca de 2 g de queijo foram pesados numa balança analítica Mettler Toledo AB204-S, e em seguida foram adicionados aproximadamente 6 g de sulfato de sódio anidro e a mistura foi macerada em almofariz até obter uma massa solta e triturada. Transferiu-se o conteúdo para frascos de 50 mL e adicionou-se 0,6 mL de ácido sulfúrico 2N. De seguida procedeu-se à extração da gordura bruta pela adição de 10 mL de éter/heptano (1:1) e colocou-se sob agitação magnética durante 20 minutos numa placa de agitação Asincro Selecta. Recolheu-se o sobrenadante e transferiu-se o extrato bruto de gordura (EBG) para novo frasco. Esta etapa foi realizada três vezes e os extratos obtidos foram combinados. Ao EBG resultante adicionou-se sulfato de sódio anidro, cobriu-se com papel alumínio e foi armazenado a -20 °C. Cada extração foi realizada em duplicado.

3.2.3 Determinação do teor de gordura

O teor de gordura das amostras de queijo foi determinado por eliminação do solvente a partir do extrato bruto da gordura (EBG). Foram transferidos 5 mL do EBG para um balão tarado na balança Mettler Toledo AB204-S. Com o auxílio de um evaporador rotativo Buchi (B490) o solvente foi eliminado sob vácuo, a uma temperatura de 40 °C e pesou-se o resíduo de gordura. O teor de gordura no extrato foi determinado e os resultados foram expressos em % (m/m), numa base seca e numa base húmida.

3.2.4 Derivatização dos ácidos gordos totais

Transferiram-se 3 mL do EBG para tubos de centrifuga e adicionaram-se 2 mL de hidróxido de potássio metanólico 2N; agitou-se a mistura no vórtex, adicionaram-se 2 mL de solução salina 1% e

homogeneizou-se a mistura, lentamente por inversão do tubo. De seguida, deixaram-se os tubos em repouso até ocorrer a separação de fases, rejeitou-se a fase aquosa e recolheu-se a fase orgânica que foi lavada duas vezes com 2 mL de água destilada. Secou-se a fase orgânica por adição de sulfato de sódio anidro, e após filtração para separar o sal anidro eliminou-se o solvente, sob vácuo, à temperatura de 40 °C. O resíduo foi dissolvido em 5 mL de éter:hexano (1:1), transferiu-se 1 mL desta solução para frascos de 2 mL e adicionou-se 1 mL de solução padrão de ácido heptadecanóico (500 mg/50 mL). De seguida procedeu-se à análise desta solução em GC-MS.

Os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram separados e identificados por cromatografia gasosa e espectrometria de massa utilizando o aparelho Focus GC- Polaris Q (Thermo Unicam), constituído por um cromatógrafo Focus GC e um espectrómetro de massa Polaris Q. Este aparelho está equipado com uma coluna DB5-MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. As amostras foram injetadas utilizando o injetor automático (AS2000) e o volume de injeção foi de 1 µL. A temperatura do injetor foi de 270 °C e a injeção foi efetuada em modo sem repartição de fluxo, durante 2 minutos, posteriormente a válvula de repartição de fluxo foi aberta com um fluxo de 30 mL/min.

A temperatura inicial do forno foi de 40 °C, tendo-se mantido nesse valor durante 2 minutos. Em seguida, a temperatura foi programada até 140 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C/minuto, seguida de um aumento para 280 °C a uma taxa de 5 °C/minuto. A temperatura da interface foi de 270 °C e a temperatura da fonte iónica foi de 250 °C.

As áreas cromatográficas dos ésteres metílicos foram avaliadas e a sua concentração individual foi calculada em termos relativos como a percentagem da área cromatográfica total e em termos absolutos por comparação com uma mistura de ésteres metílicos de concentração conhecida (Supelco 47885). A identificação de cada éster metílico individual foi realizada por análise do seu espectro de massa, da ordem de eluição e por comparação com os tempos de retenção do padrão de ésteres metílicos utilizado e também por comparação do espectro de massa de padrões autênticos e de ésteres da biblioteca de espectros (Wiley, NIST).

3.2.5 Análise estatística

Avaliou-se a existência de diferenças significativas entre as médias das concentrações relativas dos ácidos gordos totais através da análise de variância (ANOVA); as médias foram também comparadas duas a duas através do Teste de Tukey, para definir subgrupos homogêneos de médias que não apresentam diferenças significativas. Esses cálculos foram realizados utilizando o software SPSS, versão 21 (IBM Analytics).

3.3 Resultados e discussão

O sabor e o aroma dos queijos têm uma forte contribuição dos ácidos gordos e álcoois produzidos durante o processo de fermentação. Ésteres carboxílicos, aldeídos e cetonas presentes no leite também contribuem para o sabor e aroma final do queijo produzido a partir desse leite, mas estão

geralmente presentes em menores quantidades e têm menor impacto nestas propriedades sensoriais. Queijos artesanais são muitas vezes produzidos a partir de leite não pasteurizado, de forma que incorporam um grau mais elevado dos componentes de aroma de leite original e beneficiam da população microbiológica nativa de bactérias lácticas que dão origem a um produto fermentado com propriedades únicas que não são facilmente reproduzidas quando se utiliza coalhada de leite pasteurizado na produção de queijo industrial.

Neste trabalho foram estudados os perfis de ácidos gordos totais do Queijo de Coalho artesanal, produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste do Brasil.

A extração da gordura foi efetuada utilizando temperaturas moderadas e uma quantidade reduzida de ácido para minimizar a degradação dos ácidos gordos polinsaturados ou outras reações secundárias que provocassem alterações indesejadas do perfil original de ácidos gordos. Para poder analisar os ácidos gordos por cromatografia gasosa efetuou-se a sua transesterificação com um catalisador básico (KOH metanólico). A reação entre o metanol e o hidróxido de potássio dá origem a metóxido de potássio e água, produtos que são rapidamente solvatados pelo metanol em excesso. Esta solução é então posta em contacto com a solução de triglicéridos num solvente orgânico apolar e a homogeneização eficiente da mistura permite o ataque do metóxido de potássio ao carbono do grupo carbonilo dos ácidos gordos, fomentando assim a substituição do glicerol pelo metanol como álcool esterificante do grupo carboxilo do ácido gordo. Esta reação ocorre na interface entre a fase orgânica que contém os triglicéridos e a fase metanol:água que contém o metóxido de potássio, pelo que a homogeneização é fundamental para que a reação ocorra, mas deve ser efetuada com cuidado para não conduzir à formação de emulsões. A formação dos ésteres metílicos é acompanhada pela libertação do glicerol que é preferencialmente dissolvido na fase aquosa enquanto os ésteres metílicos se dissolvem prioritariamente na fase orgânica. Após a separação das fases a lavagem da fase orgânica com água e secagem com sulfato de sódio anidro visa remover os resíduos de base presentes nas gotículas de fase aquosa dispersas na fase orgânica e que poderiam contribuir para a hidrólise dos ésteres metílicos nos passos seguintes de eliminação do solvente para normalização das soluções. Este procedimento foi efetuada com e sem adição de padrão interno de forma a poder avaliar a presença do próprio ácido heptadecanóico nas amostras analisadas e poder, se necessário, efetuar alguma correção.

Após análise das amostras de ácidos gordos por cromatografia gasosa com espectrometria de massa (CG-MS) os ácidos gordos individuais foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção e dos seus espectros de massa com os mesmos parâmetros obtidos na análise de padrões cromatográficos relevantes nomeadamente uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) e um padrão de ácido linoleico conjugado (SIGMA, O5632-250MG, ésteres metílicos de ácidos *cis*- e *trans*-9,11- octadecadienóico e *cis*- e *trans*-10,12- octadecadienóico). Alguns ácidos gordos foram ainda identificados pela sua ordem de eluição bem como por comparação dos seus espectros de massa com espectros de referência a partir das bibliotecas Wiley e NIST e por co-injeção de padrões internos.

O perfil cromatográfico do padrão de ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) utilizado na identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes

nas amostras de Queijos de Coalho, é apresentado na Figura 3.3. Na Tabela 3.4 encontram-se os tempos de retenção e concentração dos 37 ésteres metílicos identificados neste mesmo padrão.

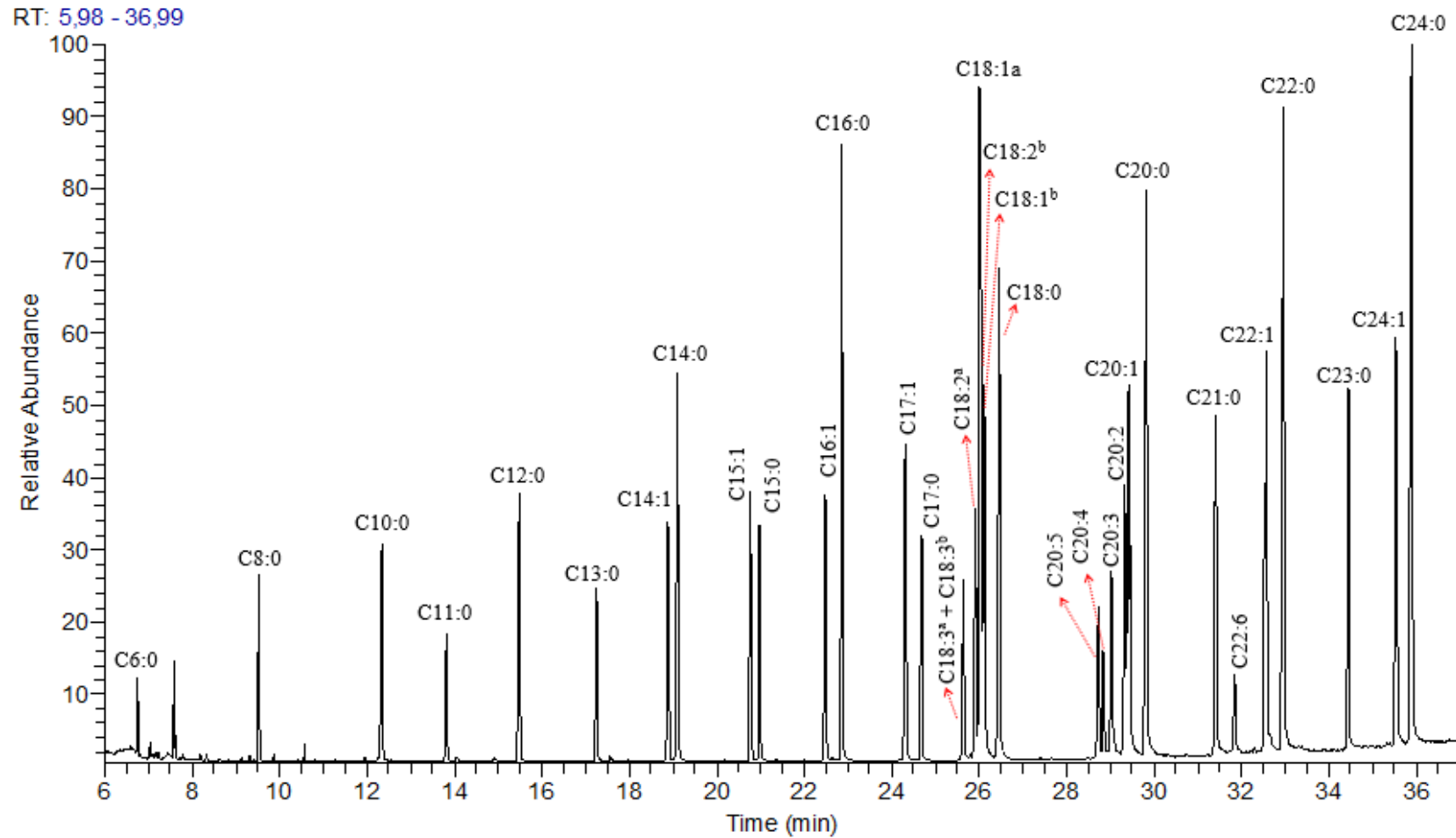


Figura 3.3: Perfil cromatográfico do padrão de ésteres metílicos de ácidos gordos (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) utilizado na identificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos presentes nas amostras de Queijo de Coalho.

Tabela 3.4: Identificação do tempo de retenção e concentração dos 37 ésteres metílicos do padrão (Supelco-47885-U, 37 Component FAME Mix) nas condições cromatográficas utilizadas.

Nº	Éster metílico	Ác.G.	C (% m/m)	T _R	Nº	Éster metílico	Ác.G.	C (% m/m)	T _R
1	Butirato de metilo	C4:0	n.d.	n.d.	20	Linoleaidato de metilo	C18:2 _b	2	26,05
2	Hexanoato de metilo	C6:0	4	6,73	21	Elaidato de metilo	C18:1 _b	2	26,13
3	Octanoato de metilo	C8:0	4	9,52	22	Estearato de metilo	C18:0	4	26,46
4	Decanoato de metilo	C10:0	4	12,33	23	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-Eicosapentaenoato de metilo	C20:5	2	28,73
5	Undecanoato de metilo	C11:0	2	13,82	24	Araquidonato de metilo	C20:4	2	28,85
6	Dodecanoato de metilo	C12:0	4	15,48	25	<i>cis</i> -8,11,14-Eicosatrienoato de metilo	C20:3 _a	2	29,02
7	Tridecanoato de metilo	C13:0	2	17,25	26	<i>cis</i> -11,14-Eicosadienoato de metilo	C20:2	2	29,33
8	Miristoleato de metilo	C14:1	2	18,88	27	<i>cis</i> -11-Eicosenoato de metilo	C20:1	2	29,41
9	Miristato de metilo	C14:0	4	19,12	28	<i>cis</i> -11,14,17-Eicosatrienoato de metilo	C20:3 _b	2	29,46
10	<i>cis</i> -10-Pentadecenoato de metilo	de C15:1	2	20,77	29	Araquidato de metilo	C20:0	4	29,83
11	Pentadecanoato de metilo	C15:0	2	20,98	30	Heneicosanoato de metilo	C21:0	2	31,42
12	Palmitoleato de metilo	C16:1	2	22,47	31	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoato de metilo	C22:6	2	31,85
13	Palmitato de metilo	C16:0	6	22,86	32	<i>cis</i> -13,16-Docosadienoato de metilo	C22:2	2	32,53
14	<i>cis</i> -10-Heptadecenoato de metilo	de C17:1	2	24,31	33	Erucato de metilo	C22:1	2	32,58
15	Heptadecanoato de metilo	C17:0	2	24,67	34	Behenato de metilo	C22:0	4	32,97
16	Linolenato de metilo	C18:3 _a	2	25,63	35	Tricosanoato de metilo	C23:0	2	34,44
17	γ-Linolenato de metilo	C18:3 _b	2	25,63	36	<i>cis</i> -15-Tetracosenoato de metilo	C24:1	2	35,54
18	Linoleato de metilo	C18:2 _a	2	25,90	37	Tetracosanoato de metilo	C24:0	4	35,89
19	Oleato de metilo	C18:1 _a	4	26,02					

O perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos identificados em amostras de Queijo de Coalho da Paraíba é apresentado na Figura 3.4. Tal como é habitual, em perfis de ácidos gordos de alimentos e em particular de produtos lácteos, o perfil de ácidos gordos é dominado pelos ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0). A Tabela 3.5 apresenta os ésteres metílicos dos ácidos gordos identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba, bem como os seus iões moleculares e as suas janelas de retenção definidas como as médias dos tempos de retenção de cada pico cromatográfico nas diversas análises realizadas afetadas pelos desvios-padrão dos mesmos tempos de retenção.

Procurou-se identificar todos os ésteres metílicos cujos espectros tinham suficiente definição para se poderem distinguir inequivocamente do ruído de fundo da coluna.

A identificação destes componentes minoritários visa sobretudo identificar características distintivas que permitam associar elementos do perfil de ácidos gordos à presença de determinadas bactérias lácticas ou a composições específicas do leite de determinadas regiões; estas diferenças encontram-se por vezes nos componentes minoritários, que correspondem a diferenças específicas na composição do leite ou a produtos da atividade microbiana durante a maturação do queijo.

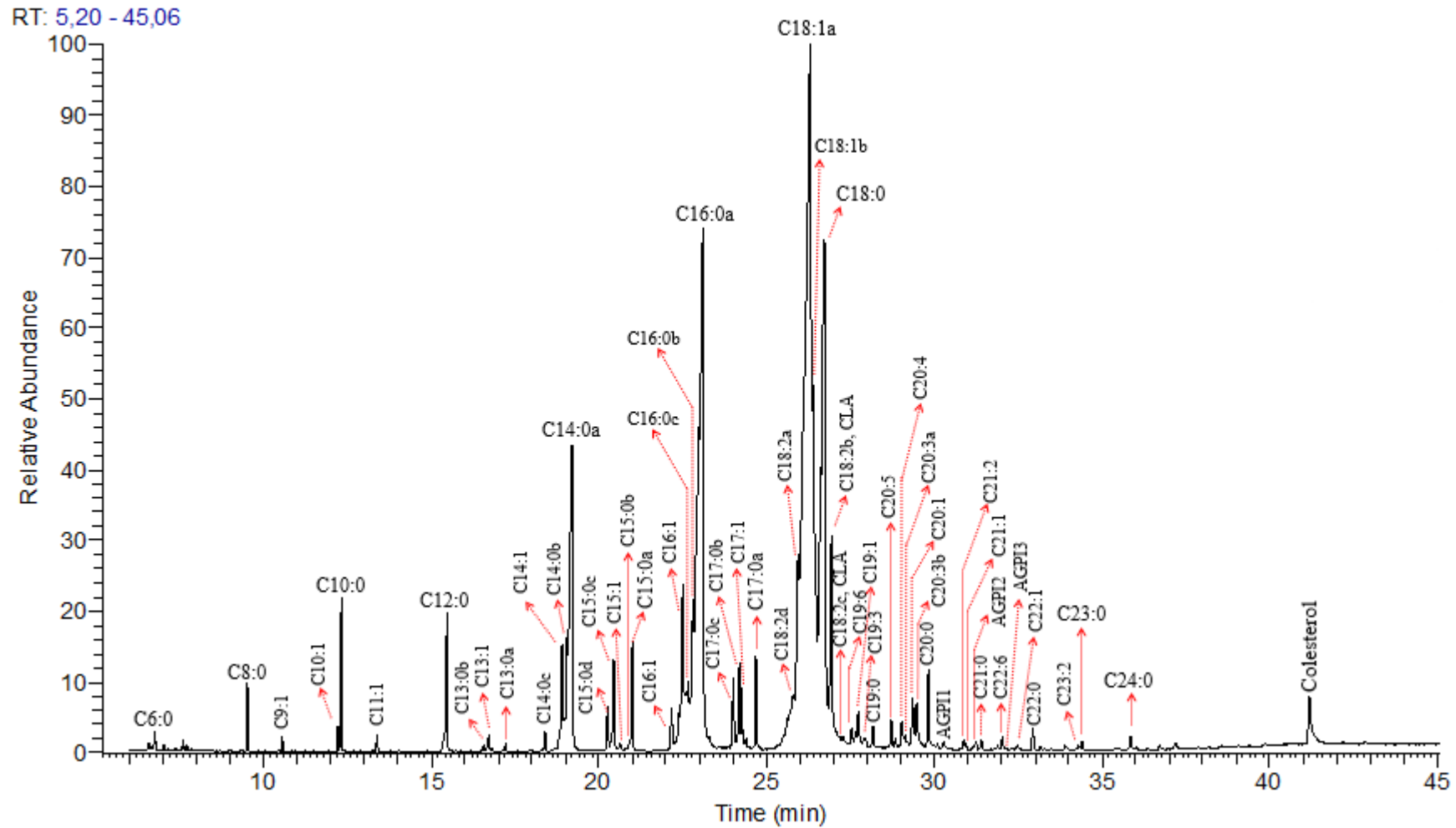


Figura 3.4: Perfil de ácidos gordos identificados em Queijo de Coalho da Paraíba (amostra R1A1, microrregião de Catolé do Rocha, São Bento).

Tabela 3.5: Identificação dos 57 ácidos gordos identificados nos Queijos de Coalho da Paraíba, do respetivo ião molecular e da respetiva janela de retenção.

Nº	Ésteres metílicos – Nome Comum	Ésteres metílicos – Nome IUPAC	M+	Ác.G.	Janela de Retenção
1	Caproato de metilo	Hexanoato de metilo ^{1,2}	131	C6:0	7,5±0,16
2	Caprilato de metilo	Octanoato de metilo ^{1,2}	159	C8:0	9,5±0,02
3	Nonenoato de metilo	Nonenoato de metilo ²	170	C9:1	10,5±0,24
4	Decenoato de metilo	Decenoato de metilo ²	185	C10:1	12,2±0,03
5	Caprato de metilo	Decanoato de metilo ¹	187	C10:0	12,3±0,01
6	Undecenoato de metilo	Undecenoato de metilo ²	198	C11:1	13,4±0,01
7	Laurato de metilo	Dodecanoato de metilo ¹	215	C12:0	15,5±0,01
8	Isómero 1 do tridecílato de metilo	Isómero do tridecanoato de metilo ²	228	C13:0b	16,6±0,01
9	Tridecenoato de metilo	Tridecenoato de metilo ²	226	C13:1	16,7±0,01
10	Tridecílato de metilo	Tridecanoato de metilo ^{1,2}	228	C13:0a	17,2±0,01
11	Isómero 2 do miristato de metilo	Isómero 2 do tetradecanoatato de metilo ²	242	C14:0c	18,4±0,01
12	Miristoleato de metilo	Tetradecenoato de metilo ^{1,2}	241	C14:1	18,90±0,01
13	Isómero 1 do miristato de metilo	Isómero 1 do tetradecanoatato de metilo ²	243	C14:0b	19,03±0,03
14	Miristato de metilo	Tetradecanoato de metilo ^{1,2}	243	C14:0a	19,21±0,02
15	Isómero 3 do pentadecílato de metilo	Isómero 3 do pentadecanoato de metilo ²	256	C15:0d	20,29±0,01
16	Isómero 2 do pentadecílato de metilo	Isómero 2 do pentadecanoato de metilo ²	256	C15:0c	20,46±0,01
17	Pentadecenoato de metilo	<i>cis</i> -10-Pentadecenoato de metilo ^{1,2}	254	C15:1	20,67±0,01
18	Isómero 1 do pentadecanoato de metilo	Isómero 1 do pentadecanoato de metilo ²	256	C15:0b	20,85±0,04
19	Pentadecílato de metilo	Pentadecanoato de metilo ^{1,2}	256	C15:0a	21,01±0,01
20	Isómero 3 do palmitato de metilo	Isómero 3 do hexadecanoato de metilo ²	270	C16:0d	22,16±0,01

(Tabela 3.5 continuação)

Nº	Ésteres metílicos – Nome Comum	Ésteres metílicos – Nome IUPAC	M+	Ac.G.	Janela de Retenção
21	Palmitoleato de metilo	Hexadecenoato de metilo ^{1,2}	268	C16:1	22,50±0,03
22	Isómero 2 do palmitato de metilo	Isómero 2 do hexadecanoato de metilo ²	270	C16:0c	22,65±0,03
23	Isómero 1 do palmitato de metilo	Isómero 1 do hexadecanoato de metilo ²	270	C16:0b	22,78±0,04
24	Palmitato de metilo	Hexadecanoato de metilo ^{1,2}	271	C16:0a	23,10±0,04
25	Isómero 2 do margarato de metilo	Isómero 2 do heptadecanoato de metilo ²	284	C17:0c	24,02±0,01
26	Isómero 1 do margarato de metilo	Isómero 1 do heptadecanoato de metilo ²	284	C17:0b	24,19±0,02
27	Margaroleato de metilo	<i>cis</i> -10-Heptadecenoato de metilo ^{1,2}	282	C17:1	24,28±0,02
28	Margarato de metilo	Heptadecanoato de metilo ^{1,2}	284	C17:0a	24,70±0,02
29	Isómero 3 do linoleato de metilo	Isómero 3 do linoleato de metilo ²	294	C18:2d	25,78±0,08
30	Linoleato de metilo	(9Z,12Z) -Octadeca-9,12-dienoato de metilo ^{1,2}	294	C18:2a	25,92±0,07
31	Oleato de metilo	<i>cis</i> -9-Octadecenoate de metilo ^{1,2}	296	C18:1a	26,27±0,06
32	Elaidato de metilo	<i>trans</i> -9-Octadecenoate de metilo ^{1,2}	296	C18:1b	26,36±0,05
33	Estearato de metilo	Octadecanoato de metilo ^{1,2}	298	C18:0	26,67±0,05
34	Isómero 1 do linoleato de metilo (CLA)	<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 Octadecadienoato de metilo ^{1,2}	294	C18:2b	26,88±0,04
35	Isómero 2 do linoleato de metilo (CLA)	<i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 Octadecadienoato de metilo ^{1,2}	294	C18:2c	27,06±0,03
36	Nonadecahexaenoato de metilo	Nonadecahexaenoato de metilo ²	300	C19:6	27,54±0,02
37	Nonadecenoato de metilo	Nonadecenoato de metilo ²	310	C19:1	27,72±0,02
38	Nonadecatrienato de metilo	Nonadecatrienato de metilo ²	306	C19:3	27,94±0,03
39	Nonadecanoato de metilo	Nonadecanoato de metilo ²	312	C19:0	28,17±0,01
40	Eicosapentaenoato de metilo (EPA)	<i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaenoato de metilo ^{1,2}	316	C20:5	28,73±0,01
41	Araquidonato de metilo	(5Z,8Z,11Z,14Z) -Eicosa-5,8,11,14-tetraenoate de metilo ^{1,2}	318	C20:4	29,03±0,02

(Tabela 3.5 continuação)

Nº	Ésteres metílicos – Nome Comum	Ésteres metílicos – Nome IUPAC	M+	Ác.G.	Janela de Retenção
42	Eicosatrienoato de metilo	<i>cis</i> -8,11,14-eicosatrienoato de metilo ^{1,2}	320	C20:3a	29,15±0,02
43	Eicosenoato de metilo	<i>cis</i> -11-eicosenoato de metilo ^{1,2}	324	C20:1	29,35±0,01
44	Isómero 1 do eicosatrienoato de metilo	<i>cis</i> -11,14,17-eicosatrienoato de metilo ^{1,2}	320	C20:3b	29,49±0,02
45	Araquidato de metilo	Eicosanoato de metilo ^{1,2}	326	C20:0	29,82±0,01
46	Ácido gordo polinsaturado 1	Ácido gordo polinsaturado ^{1,2}	nd	AGPI1	30,29±0,04
47	Heneicosadienoato de metilo	Heneicosadienoato de metilo ²	336	C21:2	30,88±0,03
48	Heneicosenoato de metilo	Heneicosenoato de metilo ²	338	C21:1	30,95±0,07
49	Ácido gordo polinsaturado 2	Ácido gordo polinsaturado 2	nd	AGPI3	31,24±0,03
50	Heneicosanoato de metilo	Heneicosanoato de metilo ^{1,2}	340	C21:0	31,40±0,01
51	Docosahexaenoato de metilo (DHA)	<i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaenoato de metilo ^{1,2}	nd	C22:6	32,04±0,01
52	Ácido gordo polinsaturado 3	Ácido gordo polinsaturado 3	nd	AGPI3	32,33±0,01
53	Erucato de metilo	<i>cis</i> -13-Docosenoato de metilo ^{1,2}	352	C22:1	32,48±0,01
54	Behenato de metilo	Docosanoato de metilo ^{1,2}	354	C22:0	32,94±0,01
55	Tricosadienoato de metilo	Tricosadienoato de metilo ²	364	C23:2	34,23±0,27
56	Tricosanoato de metilo	Tricosanoato de metilo ^{1,2}	368	C23:0	34,42±0,01
57	Tetracosanoato de metilo	Tetracosanoato de metilo ^{1,2}	382	C24:0	35,86±0,01
58	Colesterol	-	386	-	41,17±0,12

¹ Ésteres metílicos identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros de massa com os de padrões analisados nas mesmas condições.

² Ésteres metílicos identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros de massa com os de padrões das bibliotecas NIST e WILEY e por análise da ordem de eluição e dos íões moleculares

A determinação da concentração relativa dos ácidos gordos individuais foi realizada através da razão da área absoluta de cada pico e do somatório das áreas absolutas de todos os picos correspondentes a ésteres metílicos de ácidos gordos detetados entre o pico cromatográfico correspondente ao ácido hexanóico e o pico cromatográfico correspondente ao colesterol. Desta forma eliminaram-se interferências correspondentes a impurezas ou interferentes resultantes do processo de preparação dos extratos ou da própria coluna, sendo assim, esta área cromatográfica relativa é equivalente à concentração relativa de ácidos gordos na fração de gordura das amostras de queijo. Esta é também a forma mais comum de abordar o perfil de ácidos gordos de queijos que é encontrada na literatura.

Os Queijos de Coalho analisados apresentaram ácidos gordos com número de carbono que variou entre 6 e 24, com predominância dos ácidos com 18 e 16 carbonos. Como é comum em alimentos de origem animal, observa-se também a presença de alguns ácidos gordos saturados, como os ácidos cáprico, láurico ou mirístico. No entanto, o perfil de ácidos gordos do Queijo de Coalho caracteriza-se também pela presença de alguns ácidos gordos polinsaturados com propriedades funcionais reconhecidas como é o caso do ácido linoleico conjugado, do ácido eicosapentaenóico e do ácido docosahexaenóico (Lucatto *et al.*, 2014).

O somatório dos ésteres metílicos dos ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados foi avaliado de forma a poder analisar o padrão de variação destas classes de ácidos gordos nas amostras de Queijo de Coalho (Tabela 3.6).

Tabela 3.6: Concentrações relativas de ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	Saturados		Insaturados		Monoinsaturados		Di-insaturados		Polinsaturados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	48,1 ^{ab}	4,0	50,8 ^{ab}	3,9	44,5 ^a	5,3	4,3 ^a	1,3	2,1 ^{def}	0,07
R1A2	45,5 ^a	0,5	53,7 ^b	0,5	46,0 ^a	0,1	5,8 ^a	0,4	1,9 ^{cdef}	0,04
R1A3	49,8 ^{ab}	1,1	49,3 ^{ab}	0,9	41,3 ^a	0,1	6,1 ^a	0,6	1,9 ^{cdef}	0,2
R1A4	48,5 ^{ab}	1,1	50,5 ^{ab}	1,0	42,9 ^a	0,9	5,8 ^a	0,04	1,8 ^{bcdef}	0,1
R2A1	55,7 ^{ab}	5,8	43,0 ^{ab}	5,5	37,1 ^a	5,4	4,8 ^a	0,4	1,1 ^{ab}	0,3
R2A2	55,8 ^{ab}	3,4	43,0 ^{ab}	3,4	37,2 ^a	3,1	4,7 ^a	0,2	1,1 ^{ab}	0,08
R2A3	56,2 ^{ab}	8,9	42,6 ^{ab}	8,2	37,0 ^a	7,1	4,3 ^a	1,0	1,3 ^{abcd}	0,06
R2A4	53,1 ^{ab}	2,0	45,6 ^{ab}	1,8	39,6 ^a	1,3	4,8 ^a	0,4	1,1 ^{ab}	0,06
R3A1	48,2 ^{ab}	0,0	50,5 ^{ab}	0,3	43,0 ^a	0,9	6,4 ^a	1,3	1,1 ^{ab}	0,01
R3A2	51,0 ^{ab}	2,0	46,7 ^{ab}	2,1	36,4 ^a	4,9	8,8 ^a	2,6	1,6 ^{bcdef}	0,2
R3A3	53,6 ^{ab}	3,2	44,4 ^{ab}	3,0	37,2 ^a	4,0	5,9 ^a	1,1	1,2 ^{abc}	0,04
R3A4	52,9 ^{ab}	0,4	46,5 ^{ab}	0,5	40,6 ^a	0,02	4,3 ^a	0,2	1,6 ^{bcdef}	0,2
R4A1	49,7 ^{ab}	4,2	49,2 ^{ab}	4,1	42,1 ^a	3,0	5,5 ^a	0,5	1,6 ^{bcdef}	0,6
R4A2	58,5 ^b	0,2	40,5 ^a	0,2	35,0 ^a	0,06	4,2 ^a	0,1	1,2 ^{abc}	0,05
R4A3	53,7 ^{ab}	2,0	44,9 ^a	2,1	38,3 ^a	3,3	5,5 ^a	1,2	1,2 ^{abc}	0,08
R4A4	57,2 ^{ab}	4,7	40,9 ^{ab}	4,6	35,5 ^a	3,8	4,5 ^a	0,5	0,9 ^a	0,2
R5A1	51,2 ^{ab}	1,8	48,1 ^{ab}	1,6	42,2 ^a	1,6	4,3 ^a	0,08	1,5 ^{bcdef}	0,2
R5A2	51,8 ^{ab}	0,9	47,4 ^{ab}	0,9	41,5 ^a	0,6	4,2 ^a	0,3	1,7 ^{bcdef}	0,01
R5A3	50,2 ^{ab}	1,6	48,8 ^{ab}	1,5	42,6 ^a	1,2	4,4 ^a	0,2	1,8 ^{bcdef}	0,2
R5A4	52,4 ^{ab}	0,2	46,8 ^{ab}	0,1	40,7 ^a	0,2	4,6 ^a	0,2	1,5 ^{abcde}	0,1
R6A1	57,3 ^{ab}	0,3	42,0 ^{ab}	0,3	36,6 ^a	0,2	4,2 ^a	0,08	1,2 ^{abc}	0,08

(Tabela 3.6 continuação)

Queijos	Saturados		Insaturados		Monoinsaturados		Di-insaturados		Polinsaturados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R6A2	56,9 ^{ab}	0,7	42,3 ^{ab}	0,8	36,9 ^a	0,6	3,7 ^a	0,5	1,7 ^{abcdef}	0,3
R6A3	58,5 ^b	3,9	40,4 ^a	4,1	34,2 ^a	4,9	4,7 ^a	0,6	1,6 ^{abcdef}	0,2
R6A4	55,9 ^{ab}	4,1	43,0 ^{ab}	3,8	33,2 ^a	11,2	8,3 ^a	7,5	1,5 ^{abcdef}	0,1
R7A1	56,8 ^{ab}	1,1	42,4 ^{ab}	1,3	35,23 ^a	3,1	5,3 ^a	4,5	1,8 ^{bcdef}	0,1
R7A2	56,9 ^{ab}	1,2	42,45 ^{ab}	1,1	36,1 ^a	4,9	4,6 ^a	3,9	1,8 ^{bcdef}	0,1
R7A3	56,1 ^{ab}	0,1	43,2 ^{ab}	0,12	38,9 ^a	0,7	2,2 ^a	0,5	2,1 ^{ef}	0,34
R7A4	53,8 ^{ab}	0,4	45,4 ^{ab}	0,1	40,0 ^a	0,5	3,0 ^a	0,5	2,3 ^f	0,06

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

Os Queijos de Coalho analisados apresentaram concentrações relativas de ácidos gordos saturados na gordura total que oscilaram entre 48,1% e 58,9%, valores típicos dos produtos lácteos e dos produtos de origem animal, mas que situa estes produtos na categoria dos alimentos ricos em ácidos gordos saturados pelo que se aconselha uma ingestão moderada, e de preferência acompanhada por alimentos ricos em antioxidantes como é o caso dos frutos e legumes crus.

No entanto, as amostras de queijos analisados da região de Catolé do Rocha (R1A1, R1A2 e R1A4) e da região de Sousa (R3A1) apresentam a média de ácidos gordos saturados menor que a dos insaturados. As demais amostras apresentam a média de ácidos gordos saturados superior aos dos ácidos gordos insaturados em particular os queijos provenientes das regiões R6 e R7.

Os ácidos gordos mais representados a seguir aos saturados foram os ácidos gordos monoinsaturados cujas concentrações relativas na gordura do queijo oscilaram entre 33,2% e 46,0%, não apresentando, no entanto, diferenças significativas entre as médias para cada amostra. Esta categoria inclui o ácido gordo mais abundante na fração lipídica (o ácido oleico), que contribui significativamente para a concentração total dos ácidos gordos monoinsaturados.

As concentrações de ácidos gordos di-insaturados, categoria onde se incluem alguns componentes individuais de grande relevância funcional como o ácido linoleico e os seus isómeros, em particular o ácido linoleico conjugado, variaram entre 3,04% e 8,82% da gordura total, não apresentando, no entanto, diferenças significativas entre ácidos gordos individuais.

Os ácidos gordos polinsaturados, são a classe com menores concentrações totais (0,91% a 2,31%), mas compreende elementos com elevado valor nutracêutico como o EPA e o DHA e foi a classe que apresentou mais diferenças significativas entre as médias. Nesta categoria destacam-se os queijos das regiões R1 e R7 com maior número de amostras com concentrações de ácidos gordos polinsaturados superiores a 1,7%.

Nem sempre se registaram diferenças significativas entre médias apesar de os valores numéricos serem distintos pois as diferenças observadas entre amostras foram de uma ordem de grandeza comparável às diferenças observadas entre duplicados, registando-se coeficientes de variação entre 0,1% e 37%. Esta observação é expectável, pois os duplicados da análise de ácidos gordos são duplicados de todo o processo desde a extração da gordura, derivatização dos ácidos gordos e análise

cromatográfica. Por outro lado, os coeficientes de variação mais elevados estão associados aos componentes de maior concentração cuja integração está afetada de alguma variabilidade, por se tratarem de picos de grande área cromatográfica, que apresentam graus diferentes de arrastamento final (*tailing*). Esta consequência é inevitável na análise cromatográfica de extratos concentrados com grande diversidade de componentes e concentrações, pois para obter uma melhor reprodutibilidade cromatográfica na integração dos componentes mais concentrados teria que se diluir o extrato, perdendo assim informação sobre os componentes minoritários, que são frequentemente os mais relevantes para a definição das características específicas da amostra.

Na Tabela 3.7 e Figura 3.5 apresentam-se as médias e os desvios padrão das médias das concentrações de ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados para os queijos provenientes da mesma região.

Tabela 3.7: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados, insaturados, monoinsaturados, di-insaturados e polinsaturados de Queijos de Coalho produzidos na mesma microrregião.

Regiões	Saturados		Insaturados		Monoinsaturados		Di-insaturados		Polinsaturados	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1	48,0 ^a	2,3	51,1 ^c	2,3	43,7 ^b	2,8	5,5 ^a	0,9	1,9 ^d	0,1
R2	55,2 ^{bc}	4,5	43,5 ^{ab}	4,2	37,7 ^{ab}	3,8	4,7 ^a	0,5	1,1 ^a	0,2
R3	51,4 ^{ab}	2,7	47,0 ^{bc}	2,8	39,3 ^{abc}	3,8	6,4 ^a	2,1	1,4 ^{abc}	0,3
R4	54,8 ^{bc}	4,4	43,9 ^{ab}	4,5	37,7 ^{ab}	3,7	4,9 ^a	0,8	1,2 ^{ab}	0,4
R5	51,4 ^a	1,3	47,8 ^{bc}	1,2	41,8 ^{bc}	1,1	4,4 ^a	0,2	1,6 ^{cd}	0,2
R6	57,2 ^c	2,4	41,9 ^a	2,4	35,2 ^a	4,9	5,2 ^a	3,4	1,5 ^{bc}	0,2
R7	55,9 ^{bc}	1,5	43,4 ^{ab}	1,4	37,6 ^{ab}	3,1	3,8 ^a	2,6	1,9 ^d	0,3

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

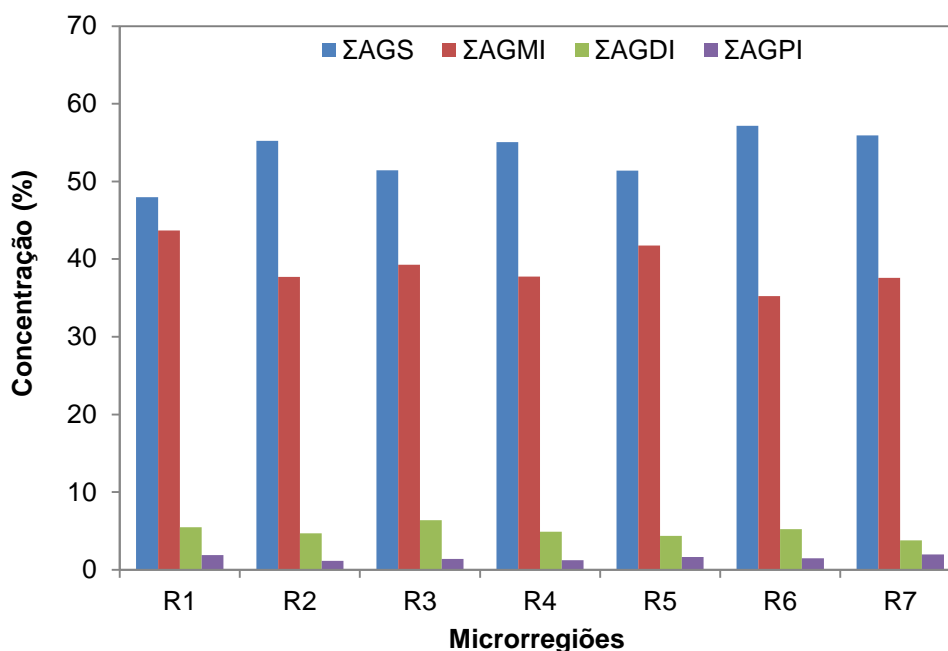


Figura 3.5: Ácidos gordos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI), di-insaturados (AGDI) e polinsaturados (AGPI) presentes nas amostras do Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.

Os queijos da região de Catolé do Rocha (R1), distinguem-se dos restantes por apresentar a média mais baixa de ácidos gordos saturados e a média mais alta de ácidos gordos monoinsaturados, uma característica relevante do ponto de vista nutricional; estes queijos apresentam ainda médias elevadas de ácidos gordos di-insaturados e polinsaturados o que globalmente lhes confere características interessantes do ponto de vista nutracêutico.

A situação inversa observa-se para a região de Itaporanga (R6) que apresenta o menor teor médio de ácidos gordos insaturados, o maior teor de ácidos gordos saturados e uma média relativamente baixa de ácidos gordos polinsaturados. Quanto aos ácidos gordos polinsaturados a região de Cajazeiras (R2) foi a que apresentou menor média (1,13%) e as regiões Serra do Teixeira (R7) e Catolé do Rocha (R1) apresentaram médias mais elevadas, respetivamente, 1,99% e 1,91%.

As Tabelas 3.8, 3.9 e 3.10 apresentam as médias e desvios padrão das concentrações dos ésteres metílicos dos ácidos gordos saturados individuais por amostra.

Tabela 3.8: Médias e desvios padrão das concentrações de ácidos gordos saturados de C6:0 a C14:0a identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C6:0		C8:0		C10:0		C12:0		C13:0b		C13:0a		C14:0c		C14:0b		C14:0a	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,07 ^a	0,00	0,3 ^a	0,01	1,0 ^{ab}	0,05	1,8 ^{bcd}	0,08	0,05 ^{bcde}	0,00	0,05 ^{bcdef}	0,00	0,2 ^{abcde}	0,01	0,00 ^a	0,00	7,0 ^{abcd}	0,09
R1A2	0,1 ^{ab}	0,00	0,2 ^a	0,09	0,8 ^a	0,04	1,4 ^{ab}	0,05	0,04 ^{abcde}	0,00	0,04 ^{abc}	0,00	0,3 ^{defg}	0,01	0,00 ^a	0,00	5,9 ^{ab}	0,7
R1A3	0,07 ^a	0,01	0,3 ^a	0,05	0,8 ^a	0,1	1,4 ^{ab}	0,2	0,04 ^{abcde}	0,01	0,05 ^{abcde}	0,01	0,3 ^{defg}	0,02	0,00 ^a	0,00	5,9 ^{ab}	0,7
R1A4	0,08 ^a	0,00	0,3 ^a	0,00	1,1 ^{abc}	0,01	1,9 ^{bcde}	0,06	0,05 ^{bcde}	0,00	0,06 ^{bcdef}	0,00	0,3 ^{fg}	0,01	1,2 ^a	0,05	6,4 ^{abcd}	0,05
R2A1	0,08 ^a	0,06	0,1 ^a	0,02	0,9 ^{ab}	0,00	1,8 ^{bcd}	0,1	0,04 ^{abcde}	0,00	0,04 ^{abcd}	0,01	0,2 ^{cdefg}	0,01	0,8 ^a	0,7	7,5 ^{abcd}	0,1
R2A2	0,09 ^{ab}	0,03	0,3 ^a	0,02	0,9 ^{ab}	0,01	1,7 ^{abcd}	0,07	0,04 ^{abcde}	0,00	0,04 ^{abcd}	0,00	0,2 ^{cdefg}	0,02	1,0 ^a	0,08	6,1 ^{abc}	0,01
R2A3	0,05 ^a	0,02	0,2 ^a	0,07	1,1 ^{ab}	0,05	1,7 ^{bcd}	0,2	0,04 ^{abcde}	0,01	0,05 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{cdefg}	0,06	1,2 ^a	0,1	6,7 ^{abcd}	0,2
R2A4	0,08 ^a	0,02	0,3 ^a	0,03	1,2 ^{abc}	0,1	1,9 ^{cde}	0,09	0,03 ^{abcde}	0,01	0,05 ^{abcdef}	0,00	0,3 ^{fg}	0,02	0,4 ^a	0,09	7,8 ^{bcd}	0,09
R3A1	0,1 ^{ab}	0,01	0,2 ^a	0,1	0,9 ^{ab}	0,1	1,6 ^{abcd}	0,03	0,04 ^{abcde}	0,00	0,04 ^{ab}	0,00	0,1 ^{ab}	0,01	0,8 ^a	0,3	5,9 ^{ab}	0,2
R3A2	0,2 ^{ab}	0,07	0,3 ^a	0,02	1,8 ^c	0,6	1,9 ^{bcde}	0,1	0,02 ^a	0,01	0,03 ^a	0,01	0,2 ^{ab}	0,01	1,2 ^a	1,7	5,9 ^{ab}	1,9
R3A3	0,1 ^{ab}	0,01	0,3 ^a	0,00	1,2 ^{abc}	0,05	1,9 ^{cde}	0,2	0,03 ^{abcd}	0,01	0,04 ^{abcd}	0,01	0,3 ^{abcd}	0,08	1,2 ^a	0,8	6,9 ^{abcd}	1,0
R3A4	0,06 ^a	0,08	0,2 ^a	0,02	0,9 ^{ab}	0,4	1,2 ^a	0,04	0,04 ^{abcde}	0,00	0,05 ^{abcde}	0,00	0,3 ^{defg}	0,01	0,6 ^a	0,02	5,4 ^a	0,2
R4A1	0,08 ^a	0,02	0,2 ^a	0,02	0,8 ^{ab}	0,00	1,5 ^{abc}	0,05	0,03 ^{abcd}	0,00	0,03 ^a	0,00	0,1 ^a	0,00	0,5 ^a	0,04	5,8 ^{ab}	0,6
R4A2	0,09 ^{ab}	0,01	0,3 ^a	0,00	1,2 ^{abc}	0,1	1,9 ^{bcde}	0,02	0,05 ^{bcde}	0,00	0,06 ^{bcdef}	0,00	0,2 ^{cdefg}	0,01	0,4 ^a	0,01	8,5 ^d	0,04
R4A3	0,2 ^{abc}	0,09	0,3 ^a	0,01	1,3 ^{abc}	0,02	1,9 ^{bcde}	0,4	0,02 ^{ab}	0,01	0,05 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^{ab}	0,03	1,2 ^a	0,9	7,6 ^{bcd}	0,9
R4A4	0,2 ^{abc}	0,06	0,1 ^a	0,2	0,7 ^a	0,4	1,6 ^{abcd}	0,3	0,03 ^{abc}	0,01	0,04 ^{abcd}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,03	0,2 ^a	0,06	7,0 ^{abcd}	0,7
R5A1	0,08 ^a	0,02	0,3 ^a	0,05	0,9 ^{ab}	0,07	1,7 ^{abcd}	0,07	0,03 ^{abcde}	0,00	0,05 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^{defg}	0,01	0,9 ^a	0,1	6,6 ^{abcd}	0,05
R5A2	0,07 ^a	0,01	0,2 ^a	0,02	0,9 ^{ab}	0,01	1,5 ^{abc}	0,02	0,06 ^{de}	0,01	0,05 ^{bcdef}	0,00	0,3 ^{defg}	0,00	0,9 ^a	0,02	6,2 ^{abc}	0,09

(Tabela 3.8 continuação)

Queijos	C6:0		C8:0		C10:0		C12:0		C13:0b		C13:0a		C14:0c		C14:0b		C14:0a	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R5A3	0,07 ^a	0,01	0,2 ^a	0,05	0,9 ^{ab}	0,07	1,6 ^{abcd}	0,1	0,05 ^{cde}	0,01	0,05 ^{bcdef}	0,01	0,3 ^{efg}	0,03	0,9 ^a	0,2	6,1 ^{abc}	0,1
R5A4	0,09 ^{ab}	0,02	0,2 ^a	0,03	0,9 ^{ab}	0,05	1,6 ^{abcd}	0,1	0,04 ^{abcde}	0,01	0,06 ^{bcdef}	0,00	0,3 ^g	0,02	0,9 ^a	0,2	6,4 ^{abc}	0,07
R6A1	0,09 ^{ab}	0,01	0,4 ^a	0,06	1,6 ^{bc}	0,02	2,5 ^e	0,09	0,04 ^{abcde}	0,00	0,05 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^{bcdef}	0,01	0,9 ^a	0,1	8,2 ^{abcd}	0,05
R6A2	0,09 ^{ab}	0,02	0,3 ^a	0,02	0,9 ^{ab}	0,09	1,6 ^{abc}	0,2	0,06 ^e	0,01	0,05 ^{abcde}	0,00	0,3 ^{efg}	0,04	0,7 ^a	0,3	6,9 ^{abcd}	0,1
R6A3	0,06 ^a	0,02	0,3 ^a	0,02	1,1 ^{abc}	0,08	1,8 ^{bcd}	0,12	0,04 ^{abcde}	0,00	0,06 ^{cdef}	0,00	0,2 ^{cdefg}	0,04	0,9 ^a	0,2	7,2 ^{abcd}	0,6
R6A4	0,04 ^a	0,00	0,4 ^a	0,02	1,1 ^{abc}	0,06	2,0 ^{cde}	0,1	0,05 ^{cde}	0,01	0,05 ^{abcde}	0,01	0,3 ^{fg}	0,02	1,1 ^a	0,01	6,9 ^{abcd}	0,1
R7A1	0,4 ^d	0,01	0,1 ^a	0,04	1,1 ^{abc}	0,3	1,7 ^{abcd}	0,04	0,05 ^{abcde}	0,01	0,06 ^{cdef}	0,00	0,3 ^{fg}	0,01	0,00 ^a	0,00	7,8 ^{bcd}	0,05
R7A2	0,4 ^d	0,2	0,2 ^a	0,1	1,2 ^{abc}	0,01	2,1 ^{de}	0,02	0,05 ^{de}	0,00	0,07 ^f	0,00	0,3 ^g	0,02	0,00 ^a	0,00	8,5 ^d	0,05
R7A3	0,4 ^{cd}	0,09	0,2 ^a	0,1	1,2 ^{abc}	0,2	1,7 ^{abcd}	0,03	0,06 ^{de}	0,00	0,07 ^{ef}	0,00	0,3 ^{fg}	0,02	0,00 ^a	0,00	7,8 ^{cd}	0,1
R7A4	0,3 ^{bcd}	0,07	0,1 ^a	0,08	0,9 ^{ab}	0,00	1,6 ^{abcd}	0,06	0,06 ^{de}	0,00	0,06 ^{def}	0,00	0,3 ^{fg}	0,00	0,00 ^a	0,00	7,3 ^{abcd}	0,06

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

Tabela 3.9: Médias e desvios padrão das concentrações de ácidos gordos saturados de C15:0d a C17:0a identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C15:0d		C15:0c		C15:0b		C15:0a		C16:0d		C16:0c		C16:0b		C16:0a		C17:0c		C17:0b	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,4 ^{abcd}	0,01	0,9 ^{abcdefgh}	0,04	0,04 ^a	0,00	1,1 ^{abcd}	0,04	0,4 ^{abcd}	0,01	1,3 ^a	0,02	0,00 ^a	0,00	18,2 ^{ab}	1,4	0,6 ^{abcdef}	0,06	0,9 ^{bcd}	0,00
R1A2	0,5 ^{abcde}	0,01	1,1 ^{cdefghij}	0,00	0,00 ^a	0,00	1,5 ^{cdefg}	0,05	0,6 ^{abcdef}	0,03	0,6 ^a	0,8	0,4 ^a	0,6	18,0 ^{ab}	0,5	0,7 ^{bcdefg}	0,02	1,2 ^{ghijk}	0,02
R1A3	0,5 ^{abcdef}	0,08	1,1 ^{defhij}	0,04	0,00 ^a	0,00	1,4 ^{cdefg}	0,06	0,6 ^{bcdef}	0,09	0,8 ^a	1,1	0,00 ^a	0,00	19,3 ^{ab}	1,1	0,7 ^{bcdefg}	0,01	1,1 ^{efghij}	0,04
R1A4	0,5 ^{abcdef}	0,02	1,2 ^{fghij}	0,04	0,01 ^a	0,02	1,3 ^{bcd}	0,02	0,6 ^{abcdef}	0,05	0,9 ^a	0,1	0,00 ^a	0,00	17,4 ^{ab}	0,5	0,7 ^{abcdef}	0,02	1,0 ^{efghij}	0,03

(Tabela 3.9 continuação)

Queijos	C15:0d		C15:0c		C15:0b		C15:0a		C16:0d		C16:0c		C16:0b		C16:0a		C17:0c		C17:0b	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R2A1	0,5 ^{abcdef}	0,06	0,9 ^{abcdefghi}	0,04	0,10 ^a	0,07	1,5 ^{defg}	0,06	0,5 ^{abcdef}	0,1	0,5 ^a	0,7	1,3 ^a	0,5	22,4 ^{ab}	1,1	0,7 ^{abcdef}	0,05	0,9 ^{bcde}	0,09
R2A2	0,5 ^{abcdef}	0,01	0,9 ^{abcdef}	0,06	0,06 ^a	0,08	1,5 ^{efg}	0,2	0,6 ^{abcdef}	0,03	0,00 ^a	0,00	2,5 ^a	0,3	23,2 ^{ab}	1,5	0,8 ^{efgh}	0,01	0,9 ^{bcdefgh}	0,04
R2A3	0,6 ^{cdefg}	0,1	0,9 ^{abcdefg}	0,2	0,2 ^a	0,03	1,5 ^{defg}	0,08	0,6 ^{abcdef}	0,1	0,00 ^a	0,00	1,6 ^a	0,4	21,6 ^{ab}	4,6	0,8 ^{efgh}	0,03	1,0 ^{defghij}	0,1
R2A4	0,6 ^{defg}	0,03	1,0 ^{cdefghij}	0,07	0,04 ^a	0,01	1,6 ^{efgh}	0,09	0,6 ^{abcdef}	0,03	0,00 ^a	0,00	1,2 ^a	0,1	21,9 ^{ab}	1,7	0,8 ^{defgh}	0,01	1,0 ^{defghij}	0,03
R3A1	0,3 ^{ab}	0,02	0,7 ^{ab}	0,01	0,03 ^a	0,04	0,9 ^a	0,02	0,3 ^{ab}	0,06	0,00 ^a	0,00	1,6 ^a	0,6	16,8 ^a	0,01	0,5 ^{abc}	0,04	0,6 ^a	0,02
R3A2	0,6 ^{defg}	0,2	0,8 ^{abcde}	0,05	0,03 ^a	0,04	1,0 ^{abc}	0,00	0,6 ^{abcdef}	0,1	1,1 ^a	1,5	2,5 ^a	3,6	17,8 ^{ab}	4,1	0,5 ^a	0,05	0,8 ^{abc}	0,01
R3A3	0,6 ^{cdefg}	0,1	0,9 ^{abcdefghi}	0,2	0,02 ^a	0,03	1,4 ^{bcdef}	0,3	0,6 ^{abcdef}	0,04	0,9 ^a	1,3	2,2 ^a	1,2	19,9 ^{ab}	0,8	0,7 ^{abcdef}	0,1	0,9 ^{bcdefg}	0,2
R3A4	0,6 ^{cdefg}	0,02	1,1 ^{cdefghij}	0,01	0,00 ^a	0,00	1,6 ^{efgh}	0,2	0,7 ^{cdef}	0,02	2,7 ^a	0,05	1,5 ^a	0,06	19,4 ^{ab}	0,5	0,7 ^{cdefg}	0,00	1,2 ^{hijk}	0,00
R4A1	0,3 ^a	0,02	0,6 ^a	0,07	0,03 ^a	0,00	1,0 ^{ab}	0,09	0,3 ^a	0,04	0,00 ^a	0,00	1,5 ^a	0,1	20,3 ^{ab}	1,5	0,6 ^{abcde}	0,06	0,6 ^a	0,08
R4A2	0,6 ^{bcdefg}	0,00	1,1 ^{cdefghij}	0,01	0,04 ^a	0,01	1,7 ^{efgh}	0,01	0,5 ^{abcdef}	0,00	0,00 ^a	0,00	1,1 ^a	0,03	23,6 ^{ab}	0,1	0,7 ^{abcdefg}	0,01	1,0 ^{cdefghi}	0,01
R4A3	0,4 ^{abcd}	0,03	0,8 ^{abc}	0,1	0,09 ^a	0,09	0,99 ^{ab}	0,08	0,4 ^{abcd}	0,04	0,7 ^a	1,0	1,9 ^a	1,2	19,2 ^{ab}	0,1	0,5 ^{ab}	0,00	0,8 ^{abcd}	0,08
R4A4	0,4 ^{abc}	0,05	0,8 ^{abcd}	0,1	0,01 ^a	0,01	1,3 ^{abcde}	0,05	0,4 ^{abc}	0,05	0,00 ^a	0,00	0,8 ^a	0,00	24,7 ^b	3,7	0,6 ^{abcd}	0,07	0,7 ^{ab}	0,1
R5A1	0,5 ^{bcdef}	0,03	1,1 ^{cdefghij}	0,08	0,00 ^a	0,00	1,5 ^{cdefg}	0,00	0,5 ^{abcdef}	0,1	0,4 ^a	0,5	1,3 ^a	0,4	19,9 ^{ab}	0,9	0,8 ^{fgh}	0,02	1,1 ^{efghij}	0,02
R5A2	0,6 ^{cdefg}	0,01	1,1 ^{cdefghij}	0,00	0,00 ^a	0,00	1,7 ^{efgh}	0,04	0,6 ^{abcdef}	0,02	0,3 ^a	0,5	1,4 ^a	0,4	19,0 ^{ab}	0,3	0,8 ^{fgh}	0,03	1,1 ^{efghijk}	0,03
R5A3	0,6 ^{cdefg}	0,07	1,1 ^{defghij}	0,05	0,07 ^a	0,09	1,5 ^{efg}	0,03	0,6 ^{abcdef}	0,09	0,4 ^a	0,5	1,3 ^a	0,3	19,0 ^{ab}	1,3	0,7 ^{cdefg}	0,03	1,1 ^{efghijk}	0,05
R5A4	0,7 ^g	0,06	1,3 ^{ghij}	0,03	0,00 ^a	0,00	1,7 ^{efgh}	0,07	0,6 ^{abcdef}	0,03	0,00 ^a	0,00	1,5 ^a	0,2	19,3 ^{ab}	0,4	0,8 ^{fgh}	0,03	1,2 ^{ghijk}	0,03
R6A1	0,6 ^{cdefg}	0,02	1,0 ^{cdefghij}	0,03	0,00 ^a	0,00	1,4 ^{cdefg}	0,04	0,5 ^{abcde}	0,04	0,00 ^a	0,00	1,5 ^a	0,2	22,2 ^{ab}	0,1	0,7 ^{abcdefg}	0,01	0,9 ^{bcdefgh}	0,02
R6A2	0,6 ^{cdefg}	0,09	1,0 ^{cdefghij}	0,07	0,00 ^a	0,00	1,7 ^{efgh}	0,09	0,6 ^{bcdef}	0,06	0,3 ^a	0,5	1,2 ^a	0,03	23,2 ^{ab}	0,00	0,8 ^{fgh}	0,05	1,1 ^{efghijk}	0,07
R6A3	0,5 ^{abcdef}	0,01	1,1 ^{cdefghij}	0,2	0,04 ^a	0,06	1,7 ^{efgh}	0,2	0,6 ^{abcdef}	0,2	0,00 ^a	0,00	1,7 ^a	0,2	23,3 ^{ab}	1,4	0,8 ^{fgh}	0,1	1,0 ^{cdefgh}	0,09
R6A4	0,7 ^{efg}	0,03	0,9 ^{b^{cdefghij}}	0,08	0,05 ^a	0,07	1,4 ^{bcdef}	0,07	0,6 ^{abcdef}	0,1	0,7 ^a	0,04	1,2 ^a	0,03	23,1 ^{ab}	1,7	0,9 ^{fgh}	0,02	1,1 ^{efghijk}	0,05
R7A1	0,8 ^g	0,01	1,3 ^{hij}	0,03	0,05 ^a	0,08	1,8 ^{gh}	0,2	0,8 ^f	0,1	1,5 ^a	0,8	2,0 ^a	2,8	19,4 ^{ab}	3,3	0,9 ^{gh}	0,08	1,3 ^{jk}	0,06
R7A2	0,7 ^{efg}	0,03	1,3 ⁱ	0,06	0,07 ^a	0,08	1,9 ^h	0,08	0,8 ^{ef}	0,05	1,2 ^a	1,2	2,3 ^a	3,2	20,0 ^{ab}	3,2	0,9 ^h	0,09	1,4 ⁱ	0,02
R7A3	0,7 ^g	0,07	1,3 ^{ji}	0,07	0,08 ^a	0,04	1,8 ^{gh}	0,00	0,7 ^{def}	0,08	0,9 ^a	0,5	0,9 ^a	1,4	20,3 ^{ab}	1,7	0,9 ^h	0,06	1,3 ^{ijk}	0,01
R7A4	0,6 ^{cdefg}	0,02	1,2 ^{efghij}	0,01	0,06 ^a	0,05	1,6 ^{efgh}	0,06	0,7 ^{bcdef}	0,08	0,8 ^a	1,1	0,00 ^a	0,00	22,3 ^{ab}	0,5	0,8 ^{fgh}	0,03	1,0 ^{cdefghi}	0,06

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

Tabela 3.10: Médias e desvios padrão de ácidos gordos saturados de C18:0 a C24:0 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C17:0a		C18:0		C19:0		C20:0		C21:0		C22:0		C23:0		C24:0	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,8 ^{abc}	0,1	11,6 ^a	2,3	0,1 ^{abcd}	0,04	0,8 ^c	0,1	0,06 ^{ab}	0,03	0,1 ^{ab}	0,04	0,05 ^{abc}	0,01	0,1 ^{abcd}	0,03
R1A2	1,3 ^{def}	0,05	9,8 ^a	0,2	0,2 ^{abcde}	0,01	0,5 ^{ab}	0,01	0,08 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,00	0,09 ^{abcde}	0,01	0,1 ^{abcde}	0,00
R1A3	1,3 ^{defg}	0,00	12,6 ^a	1,1	0,2 ^{bcdef}	0,00	0,6 ^{abc}	0,03	0,1 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{abcdef}	0,00	0,1 ^{abcdef}	0,01
R1A4	1,0 ^{abcd}	0,04	11,3 ^a	0,8	0,2 ^{abcde}	0,01	0,5 ^{ab}	0,01	0,06 ^{ab}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,00	0,08 ^{abcde}	0,00	0,1 ^{abcde}	0,00
R2A1	1,1 ^{bcde}	0,1	12,3 ^a	1,4	0,2 ^{abcdef}	0,08	0,5 ^{abc}	0,2	0,1 ^{abcde}	0,06	0,3 ^{abcd}	0,1	0,1 ^{efg}	0,08	0,2 ^{ef}	0,1
R2A2	1,4 ^{efgh}	0,2	11,5 ^a	1,2	0,2 ^{abcdef}	0,04	0,5 ^{ab}	0,06	0,1 ^{abcde}	0,01	0,3 ^{abcd}	0,02	0,1 ^{efg}	0,01	0,2 ^{ef}	0,02
R2A3	1,4 ^{defgh}	0,2	12,8 ^a	3,6	0,3 ^f	0,09	0,7 ^{abc}	0,2	0,1 ^e	0,05	0,37 ^d	0,1	0,2 ^g	0,05	0,2 ^f	0,05
R2A4	1,2 ^{de}	0,05	9,6 ^a	0,8	0,2 ^{abcdef}	0,02	0,4 ^{abc}	0,03	0,08 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{bcdef}	0,01	0,2 ^{abcdef}	0,01
R3A1	0,7 ^a	0,02	15,0 ^a	0,3	0,1 ^{ab}	0,00	0,7 ^{b^c}	0,00	0,03 ^a	0,00	0,1 ^a	0,00	0,04 ^a	0,00	0,09 ^{ab}	0,00
R3A2	0,8 ^{abc}	0,02	12,1 ^a	0,2	0,1 ^{ab}	0,00	0,4 ^a	0,05	0,04 ^{ab}	0,00	0,1 ^a	0,02	0,04 ^{ab}	0,01	0,07 ^a	0,00
R3A3	1,1 ^{bcde}	0,1	10,9 ^a	2,9	0,2 ^{abcdef}	0,04	0,5 ^{abc}	0,1	0,08 ^{abcd}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,04	0,09 ^{abcde}	0,02	0,1 ^{abcdef}	0,02
R3A4	1,3 ^{def}	0,01	12,3 ^a	0,3	0,2 ^{abcdef}	0,01	0,5 ^{ab}	0,02	0,07 ^{abcd}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{abcdef}	0,00	0,1 ^{bcdef}	0,00
R4A1	0,7 ^a	0,1	13,6 ^a	1,8	0,1 ^a	0,03	0,5 ^{abc}	0,02	0,07 ^{ab}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,2	0,05 ^{ab}	0,01	0,1 ^{abcde}	0,04
R4A2	1,3 ^{defgh}	0,00	12,3 ^a	0,07	0,3 ^{def}	0,00	0,7 ^{abc}	0,01	0,1 ^{de}	0,00	0,4 ^{cd}	0,00	0,1 ^{efg}	0,00	0,2 ^{ef}	0,00
R4A3	0,8 ^{ab}	0,00	13,3 ^a	0,5	0,1 ^{abc}	0,01	0,6 ^{abc}	0,01	0,04 ^{ab}	0,00	0,1 ^{ab}	0,01	0,05 ^{abc}	0,00	0,1 ^{abcd}	0,01
R4A4	1,1 ^{cde}	0,00	14,9 ^a	2,8	0,2 ^{abcde}	0,02	0,6 ^{abc}	0,06	0,08 ^{abcd}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,04	0,1 ^{abcdef}	0,01	0,2 ^{abcdef}	0,02
R5A1	1,3 ^{def}	0,07	10,8 ^a	1,4	0,2 ^{abcdef}	0,02	0,4 ^{ab}	0,03	0,07 ^{abc}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,01	0,09 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^{abcdef}	0,03
R5A2	1,4 ^{efgh}	0,06	12,1 ^a	0,2	0,2 ^{abcdef}	0,01	0,6 ^{abc}	0,03	0,1 ^{bcde}	0,01	0,3 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{cdefg}	0,00	0,2 ^{cdef}	0,01
R5A3	1,3 ^{defgh}	0,06	11,2 ^a	1,4	0,2 ^{abcdef}	0,02	0,5 ^{ab}	0,01	0,09 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,00	0,1 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^{abcdef}	0,00
R5A4	1,4 ^{efgh}	0,01	11,8 ^a	0,6	0,3 ^{ef}	0,00	0,5 ^{abc}	0,01	0,09 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,01	0,2 ^{efg}	0,01	0,2 ^{ef}	0,01
R6A1	1,2 ^{de}	0,01	12,1 ^a	0,7	0,2 ^{cdef}	0,01	0,4 ^a	0,01	0,09 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^{abcdef}	0,00
R6A2	1,7 ^{gh}	0,02	12,1 ^a	0,9	0,3 ^{ef}	0,01	0,6 ^{abc}	0,00	0,1 ^{cde}	0,00	0,3 ^{bcd}	0,01	0,2 ^{efg}	0,00	0,2 ^{def}	0,00

(Tabela 3.10 continuação)

Queijos	C17:0a		C18:0		C19:0		C20:0		C21:0		C22:0		C23:0		C24:0	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R6A3	1,3 ^{def}	0,04	13,4 ^a	0,4	0,2 ^{abcdef}	0,00	0,5 ^{ab}	0,02	0,09 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,02	0,1 ^{abcdef}	0,01	0,2 ^{abcdef}	0,02
R6A4	1,4 ^{efgh}	0,1	10,3 ^a	2,5	0,3 ^{def}	0,06	0,5 ^{ab}	0,04	0,1 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,03	0,2 ^{fg}	0,01	0,2 ^{def}	0,01
R7A1	1,6 ^{gh}	0,1	12,7 ^a	0,5	0,3 ^{def}	0,02	0,5 ^{abc}	0,05	0,08 ^{abcde}	0,01	0,2 ^{abcd}	0,03	0,09 ^{abcde}	0,01	0,1 ^{abcde}	0,02
R7A2	1,7 ^h	0,04	10,1 ^a	0,1	0,3 ^f	0,01	0,6 ^{abc}	0,03	0,1 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,00	0,1 ^{defg}	0,02	0,1 ^{abcdef}	0,00
R7A3	1,6 ^{gh}	0,01	12,3 ^a	0,6	0,3 ^{ef}	0,00	0,6 ^{abc}	0,00	0,09 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{abcdef}	0,00	0,1 ^{abcdef}	0,00
R7A4	1,3 ^{defgh}	0,02	11,8 ^a	1,2	0,2 ^{abcdef}	0,01	0,5 ^{abc}	0,03	0,1 ^{abcde}	0,04	0,2 ^{abc}	0,01	0,06 ^{abcd}	0,00	0,09 ^{abc}	0,01

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

Os ácidos gordos C6, C8, C10 e os ácidos gordos com um número impar de carbonos como C13, C15, C17, C19, C21 e C23 estão presentes em concentrações reduzidas nas amostras de queijo, no entanto são ácidos que apresentam maior variabilidade entre queijos pelo que poderão estar mais relacionados com características específicas de cada queijo e em particular com a sua microbiota.

Os ácidos gordos com um número de carbonos inferior a 10 apresentam alguma volatilidade, contribuindo dessa forma para a definição do aroma dos queijos. No entanto, os ácidos gordos com mais de 10 carbonos por serem menos voláteis influenciam mais o sabor do que o aroma dos queijos.

Zengin e colaboradores (2011) encontraram os mesmos ácidos gordos saturados em amostras de queijo branco na Turquia, e ainda o ácido gordo C11:0 que não foi identificado nas amostras de Queijo de Coalho da Paraíba.

Os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0a), palmítico (C16:0a) e esteárico (C18:0) são os que apresentam maiores concentrações relativas, de entre os ácidos gordos saturados. Os mesmos ácidos gordos foram identificados em queijos Mozzarella por Kim *et al.* (2014). Estes ácidos gordos saturados de cadeia média, em particular os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) exercem efeitos hipercolesterémicos, pelo que a sua presença não favorece o potencial nutracêutico dos queijos (Moraes e Colla, 2006; Lima *et al.*, 1998). O queijo com menor concentração de ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0) foi o queijo R3A4 (microrregião Sousa; localidade St. Redenção), que também não apresentou um teor elevado de ácido palmítico (C16:0). O queijo com o menor teor de ácido palmítico foi também da região de Sousa, mas da localidade de Paulista (R3A1). Os restantes queijos da região de Sousa (R3) bem como da região de Catolé do Rocha (R1) apresentaram alguns dos teores mais baixos destes ácidos gordos saturados de cadeia média. Pelo contrário, os queijos das regiões de Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) tiveram concentrações elevadas destes ácidos gordos saturados de cadeia curta nomeadamente, foi da região 7 o queijo com os maiores teores dos ácidos láurico e mirístico (R7A2 - Serra do Teixeira, Mãe d'Água). Os queijos da região de Itaporanga (R6) apresentaram os teores consistentemente mais altos de ácido palmítico, mas a amostra com a concentração mais elevada deste ácido foi da região de Patos, da localidade St. Cachoeira (R4A4). Temiz e colaboradores (2008) encontraram teores relativos dos principais ácidos gordos saturados em queijo Herby situados nas gamas encontradas para o Queijo de Coalho - C14:0 (5,38 a 8,48), C16:0 (16,75 a 24,71) e C18:0 (9,60 a 15,01).

As concentrações relativas médias dos ácidos gordos saturados C6:0 a C24:0, para o conjunto dos queijos produzidos em cada microrregião são apresentadas nas Tabelas 3.11, 3.12 e 3.13.

Tabela 3.11: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C6:0 a C14:0a identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.

REGIÕES	C6:0		C8:0		C10:0		C12:0		C13:0b		C13:0a		C14:0c		C14:0b		C14:0a	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1	0,08 ^a	0,01	0,3 ^{ab}	0,06	0,9 ^a	0,2	1,6 ^a	0,3	0,04 ^{abc}	0,01	0,05 ^{ab}	0,01	0,2 ^{bc}	0,05	0,3 ^{ab}	0,6	6,3 ^{ab}	0,6
R2	0,07 ^a	0,03	0,3 ^{ab}	0,09	1,0 ^a	0,1	1,8 ^a	0,2	0,04 ^{abc}	0,01	0,04 ^{ab}	0,01	0,2 ^{bc}	0,04	0,9 ^b	0,4	7,0 ^{abc}	0,7
R3	0,1 ^a	0,05	0,3 ^{ab}	0,1	1,2 ^a	0,5	1,7 ^a	0,4	0,03 ^a	0,01	0,04 ^a	0,01	0,2 ^{ab}	0,08	0,9 ^b	0,8	6,0 ^a	1,0
R4	0,1 ^a	0,05	0,2 ^{ab}	0,1	1,0 ^a	0,3	1,7 ^a	0,3	0,03 ^{ab}	0,01	0,05 ^{ab}	0,01	0,2 ^a	0,06	0,6 ^{ab}	0,5	7,2 ^{bc}	1,1
R5	0,08 ^a	0,01	0,2 ^{ab}	0,05	0,9 ^a	0,06	1,6 ^a	0,1	0,05 ^{bcd}	0,01	0,05 ^{bc}	0,00	0,3 ^c	0,03	0,9 ^b	0,1	6,3 ^{ab}	0,2
R6	0,07 ^a	0,02	0,3 ^b	0,05	1,2 ^a	0,3	1,9 ^a	0,4	0,05 ^{cd}	0,01	0,05 ^b	0,01	0,2 ^{bc}	0,04	0,9 ^b	0,2	7,3 ^{bc}	0,6
R7	0,4 ^b	0,1	0,1 ^a	0,09	1,1 ^a	0,2	1,8 ^a	0,2	0,05 ^d	0,01	0,07 ^c	0,01	0,3 ^c	0,02	0,00 ^a	0,00	7,9 ^c	0,4

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas (p < 0.05)

Tabela 3.12: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C15:0d a C17:0a identificados no Queijo de Coalho produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.

REGIÕES	C15:0d		C15:0c		C15:0b		C15:0a		C16:0d		C16:0c		C16:0b		C16:0a		C17:0c		C17:0b	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1	0,5 ^{ab}	0,05	1,1 ^{cd}	0,1	0,01 ^a	0,02	1,3 ^{ab}	0,2	0,6 ^{ab}	0,1	0,9 ^{ab}	0,6	0,1 ^a	0,3	18,2 ^a	1,0	0,7 ^{ab}	0,05	1,0 ^{bcd}	0,1
R2	0,6 ^{bc}	0,08	0,9 ^{ab}	0,1	0,09 ^b	0,07	1,5 ^{abc}	0,1	0,6 ^b	0,08	0,1 ^a	0,3	1,6 ^{ab}	0,6	22,3 ^c	2,1	0,8 ^{bc}	0,06	0,9 ^{abc}	0,1
R3	0,5 ^{ab}	0,2	0,9 ^{ab}	0,2	0,02 ^a	0,03	1,2 ^a	0,3	0,5 ^{ab}	0,1	1,2 ^b	1,3	1,9 ^b	1,5	18,5 ^a	2,1	0,6 ^a	0,1	0,8 ^{ab}	0,2
R4	0,4 ^a	0,1	0,8 ^a	0,2	0,04 ^{ab}	0,05	1,2 ^a	0,3	0,4 ^a	0,1	0,2 ^{ab}	0,5	1,3 ^{ab}	0,7	21,9 ^{bc}	2,9	0,6 ^a	0,09	0,8 ^a	0,1
R5	0,6 ^{bc}	0,09	1,1 ^{cd}	0,09	0,02 ^{ab}	0,05	1,6 ^{bc}	0,1	0,6 ^{ab}	0,06	0,3 ^{ab}	0,4	1,4 ^{ab}	0,3	19,4 ^{ab}	0,7	0,8 ^{cd}	0,05	1,1 ^{cd}	0,04
R6	0,6 ^{bc}	0,07	1,0 ^{bc}	0,09	0,02 ^{ab}	0,04	1,5 ^{abc}	0,2	0,6 ^b	0,1	0,3 ^{ab}	0,4	1,4 ^{ab}	0,2	22,9 ^c	0,9	0,8 ^{cd}	0,09	1,0 ^{bcd}	0,08
R7	0,7 ^c	0,1	1,3 ^d	0,08	0,07 ^{ab}	0,05	1,8 ^c	0,2	0,7 ^c	0,09	1,1 ^{ab}	0,8	1,3 ^{ab}	1,9	20,5 ^{abc}	2,2	0,9 ^d	0,09	1,2 ^d	0,1

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas (p < 0.05)

Tabela 3.13: Média e desvio padrão das concentrações relativas de ácidos gordos saturados de C18:0 a C24:0a identificados no Queijo de Coalho produzido nas microrregiões no Sertão da Paraíba, Brasil.

REGIÕES	C17:0a		C18:0		C19:0		C20:0		C21:0		C22:0		C23:0		C24:0	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1	1,1 ^{ab}	0,2	11,3 ^a	1,5	0,2 ^{abc}	0,04	0,6 ^a	0,1	0,07 ^{ab}	0,02	0,2 ^{ab}	0,04	0,08 ^{ab}	0,02	0,1 ^a	0,02
R2	1,3 ^{ab}	0,2	11,5 ^a	2,0	0,2 ^{bcd}	0,06	0,5 ^a	0,1	0,1 ^b	0,04	0,3 ^b	0,09	0,1 ^d	0,05	0,2 ^b	0,05
R3	0,9 ^a	0,2	12,6 ^a	1,9	0,2 ^a	0,05	0,5 ^a	0,1	0,06 ^a	0,02	0,2 ^a	0,07	0,07 ^a	0,04	0,1 ^a	0,05
R4	0,9 ^a	0,3	13,5 ^a	1,6	0,2 ^{ab}	0,07	0,6 ^a	0,06	0,08 ^{ab}	0,04	0,2 ^{ab}	0,10	0,09 ^{abc}	0,04	0,2 ^{ab}	0,05
R5	1,4 ^{bc}	0,07	11,5 ^a	0,9	0,2 ^{bcd}	0,03	0,5 ^a	0,06	0,09 ^{ab}	0,02	0,2 ^{ab}	0,04	0,1 ^{bcd}	0,03	0,2 ^{ab}	0,04
R6	1,4 ^{bc}	0,2	11,9 ^a	1,6	0,2 ^{cd}	0,04	0,5 ^a	0,09	0,1 ^b	0,02	0,3 ^{ab}	0,05	0,1 ^{cd}	0,03	0,2 ^{ab}	0,03
R7	1,5 ^c	0,1	11,7 ^a	1,2	0,3 ^d	0,03	0,6 ^a	0,04	0,09 ^{ab}	0,02	0,2 ^{ab}	0,04	0,1 ^{abc}	0,03	0,1 ^a	0,03

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$).

As concentrações médias mais elevadas dos ácidos gordos saturados C6:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 e C19:0 encontraram-se para o conjunto de queijos da microregião de Serra do Teixeira (R7), o que evidencia a relevância destes ácidos na fração lipídica dos queijos desta região.

Além dos ácidos gordos saturados com número de carbono par, que são os maioritários, a fração lipídica dos queijos apresentou também concentrações não vestigiais de ácidos gordos saturados com número de carbonos ímpar (C13:0, C15:0, C17:0, C19:0, C21:0 e C23:0) em particular os ácidos C15:0 e C17:0 com concentrações relativas superiores a 1%. Por outro lado, estes ácidos gordos apresentam-se em concentrações que diferem significativamente entre as regiões, que pode contribuir para uma caracterização diferenciadora destes queijos.

Nas Tabelas 3.14 e 3.15 apresentam-se as concentrações relativas médias dos ácidos gordos monoinsaturados individuais identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba.

Tabela 3.14: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos monoinsaturados de C9:1 a C17:1 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C9:1		C10:1		C11:1		C13:1		C14:1		C15:1		C16:1		C17:1	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,07 ^{def}	0,01	0,2 ^a	0,01	0,2 ^{ef}	0,02	0,1 ^{gh}	0,01	1,2 ^{abcd}	0,09	0,05 ^{abc}	0,00	2,8 ^{bcd}	0,1	0,6 ^{abcd}	0,02
R1A2	0,09 ^f	0,00	0,1 ^a	0,00	0,2 ^f	0,00	0,2 ^h	0,00	1,2 ^{abcd}	0,06	0,1 ^{bcdefgh}	0,05	3,2 ^{bcd}	0,02	1,2 ^{ghi}	0,01
R1A3	0,06 ^{cdef}	0,01	0,1 ^a	0,02	0,2 ^{cdef}	0,00	0,1 ^{gh}	0,02	1,0 ^{abc}	0,3	0,1 ^{bcdefgh}	0,05	3,1 ^{bcd}	0,3	0,7 ^{abcdef}	0,04
R1A4	0,07 ^{def}	0,00	0,2 ^a	0,01	0,2 ^{def}	0,01	0,1 ^{gh}	0,01	1,2 ^{abcd}	0,08	0,1 ^{defgh}	0,01	2,8 ^{bcd}	0,1	0,7 ^{bcdefg}	0,03
R2A1	0,02 ^{abcde}	0,01	0,2 ^a	0,01	0,04 ^{ab}	0,02	0,02 ^{ab}	0,04	1,2 ^{abcd}	0,01	0,1 ^{bcdefgh}	0,01	2,6 ^{bcd}	0,03	0,6 ^{abcde}	0,06
R2A2	0,00 ^a	0,00	0,2 ^a	0,00	0,01 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00	1,0 ^{abc}	0,05	0,1 ^{bcdefgh}	0,01	2,4 ^{bcd}	0,04	0,8 ^{cdefgh}	0,07
R2A3	0,01 ^{abc}	0,01	0,09 ^a	0,1	0,05 ^{abc}	0,02	0,04 ^{abc}	0,01	1,2 ^{abcd}	0,2	0,1 ^{bcdefgh}	0,04	3,6 ^{cd}	0,9	0,8 ^{cdefgh}	0,2
R2A4	0,01 ^{abcd}	0,02	0,2 ^a	0,03	0,03 ^a	0,01	0,00 ^a	0,00	1,5 ^{cd}	0,1	0,08 ^{abcdef}	0,01	3,2 ^{bcd}	0,3	0,9 ^{defghi}	0,08
R3A1	0,01 ^{ab}	0,01	0,1 ^a	0,04	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00	0,8 ^a	0,05	0,03 ^a	0,00	1,7 ^{ab}	0,06	0,3 ^a	0,01
R3A2	0,02 ^{abcde}	0,03	0,2 ^a	0,02	0,03 ^{abc}	0,04	0,03 ^a	0,04	1,1 ^{abcd}	0,2	0,06 ^{abcd}	0,00	2,4 ^{bcd}	0,5	0,4 ^{ab}	0,1
R3A3	0,02 ^{abcde}	0,03	0,2 ^a	0,01	0,05 ^{abc}	0,04	0,04 ^{abc}	0,05	1,4 ^{bcd}	0,2	0,09 ^{bcdefg}	0,01	2,8 ^{bcd}	0,9	0,8 ^{bcdefg}	0,3
R3A4	0,07 ^{ef}	0,00	0,06 ^a	0,09	0,2 ^{ef}	0,01	0,1 ^{gh}	0,01	0,9 ^{ab}	0,07	0,1 ^{bcdefgh}	0,05	0,4 ^a	0,01	0,9 ^{defghi}	0,02
R4A1	0,02 ^{abcd}	0,02	0,2 ^a	0,01	0,04 ^{abc}	0,04	0,03 ^a	0,04	0,9 ^{ab}	0,03	0,08 ^{abcdef}	0,01	2,5 ^{bcd}	0,1	0,4 ^{ab}	0,04
R4A2	0,03 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^a	0,1	0,08 ^{abcde}	0,00	0,06 ^{bcdefg}	0,00	1,0 ^{abc}	0,00	0,1 ^{bcdefgh}	0,00	2,5 ^{bcd}	0,03	0,7 ^{abcdef}	0,00
R4A3	0,04 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^a	0,00	0,07 ^{abcde}	0,02	0,06 ^{abcdef}	0,00	1,3 ^{abcd}	0,06	0,04 ^{ab}	0,02	2,0 ^{bc}	0,07	0,4 ^{ab}	0,07
R4A4	0,02 ^{abcde}	0,03	0,1 ^a	0,07	0,08 ^{abcde}	0,02	0,05 ^{bcdefg}	0,03	1,0 ^{abc}	0,2	0,07 ^{abcde}	0,05	2,1 ^{bc}	0,3	0,4 ^{abc}	0,08
R5A1	0,06 ^{bcdef}	0,01	0,2 ^a	0,01	0,1 ^{cdef}	0,01	0,1 ^{efgh}	0,01	1,3 ^{abcd}	0,1	0,09 ^{bcdefgh}	0,05	3,2 ^{bcd}	0,3	1,0 ^{fghi}	0,09
R5A2	0,06 ^{bcdef}	0,00	0,2 ^a	0,00	0,1 ^{bcdef}	0,01	0,1 ^{efgh}	0,01	1,0 ^{abcd}	0,00	0,2 ^h	0,00	2,6 ^{bcd}	0,05	0,9 ^{defghi}	0,02
R5A3	0,06 ^{cdef}	0,02	0,1 ^a	0,02	0,2 ^{cdef}	0,03	0,1 ^{fgh}	0,03	1,0 ^{abc}	0,03	0,2 ^{fgh}	0,01	2,9 ^{bcd}	0,3	0,9 ^{defghi}	0,07
R5A4	0,07 ^{def}	0,01	0,2 ^a	0,01	0,2 ^{def}	0,03	0,1 ^h	0,02	1,3 ^{abcd}	0,1	0,1 ^{cdefgh}	0,00	2,7 ^{bcd}	0,2	0,9 ^{defghi}	0,05
R6A1	0,04 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^a	0,01	0,08 ^{abcde}	0,00	0,06 ^{bcdefg}	0,00	1,0 ^{abc}	0,03	0,1 ^{bcdefgh}	0,00	2,4 ^{bcd}	0,02	0,7 ^{abcdef}	0,05

(Tabela 3.14 continuação)

Queijos	C9:1		C10:1		C11:1		C13:1		C14:1		C15:1		C16:1		C17:1	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R6A2	0,04 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^a	0,02	0,08 ^{abcde}	0,01	0,06 ^{abcdefg}	0,01	0,9 ^{ab}	0,08	0,2 ^{gh}	0,02	2,7 ^{bcd}	0,3	1,0 ^{fghi}	0,1
R6A3	0,04 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^a	0,01	0,08 ^{abcde}	0,01	0,06 ^{abcdefg}	0,01	1,0 ^{abc}	0,2	0,2 ^{efgh}	0,01	2,9 ^{bcd}	0,6	0,7 ^{bcdefg}	0,06
R6A4	0,03 ^{abcde}	0,00	0,2 ^a	0,02	0,06 ^{abcd}	0,01	0,04 ^{abcde}	0,00	1,4 ^{bcd}	0,1	0,1 ^{abcdefgh}	0,02	3,9 ^d	0,4	1,2 ⁱ	0,2
R7A1	0,04 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^a	0,01	0,1 ^{abcde}	0,03	0,08 ^{defgh}	0,02	1,2 ^{abcd}	0,1	0,1 ^{defgh}	0,02	2,7 ^{bcd}	0,6	0,9 ^{defghi}	0,03
R7A2	0,04 ^{abcdef}	0,00	0,2 ^a	0,00	0,1 ^{abcde}	0,04	0,09 ^{cdefgh}	0,01	1,6 ^d	0,2	0,1 ^{defgh}	0,01	3,1 ^{bcd}	0,2	1,2 ^{hi}	0,08
R7A3	0,03 ^{abcdef}	0,01	0,2 ^a	0,06	0,1 ^{abcde}	0,00	0,06 ^{bcdefgh}	0,00	1,1 ^{abcd}	0,1	0,2 ^{defgh}	0,02	2,9 ^{bcd}	0,07	1,0 ^{efghi}	0,1
R7A4	0,04 ^{abcdef}	0,01	0,1 ^a	0,02	0,2 ^{abcde}	0,05	0,08 ^{gh}	0,03	0,9 ^{abc}	0,07	0,07 ^{efgh}	0,02	2,8 ^{bcd}	0,9	0,7 ^{bcdefg}	0,01

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Tabela 3.15: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos monoinsaturados de C18:1a a C22:1 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C18:1a		C18:1b		C19:1		C20:1		C21:1		C22:1	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	32,1 ^a	6,2	5,9 ^{abc}	0,9	0,45 ^{defgh}	0,01	0,7 ^{ab}	0,04	0,02 ^a	0,02	0,04 ^{abc}	0,01
R1A2	35,4 ^a	3,9	2,7 ^a	3,8	0,7 ^{jk}	0,00	0,8 ^{ab}	0,00	0,05 ^a	0,03	0,08 ^{cdef}	0,00
R1A3	27,7 ^a	0,1	6,8 ^{bc}	0,7	0,6 ^{fghij}	0,00	0,7 ^{ab}	0,02	0,07 ^{ab}	0,00	0,08 ^{cdef}	0,00
R1A4	29,1 ^a	0,03	6,7 ^{bc}	0,9	0,6 ^{fghij}	0,02	0,7 ^{ab}	0,01	0,05 ^a	0,00	0,07 ^{abcdef}	0,01
R2A1	25,4 ^a	4,9	5,6 ^{abc}	0,3	0,4 ^{abcdef}	0,00	0,6 ^{ab}	0,1	0,09 ^{ab}	0,00	0,09 ^{def}	0,03
R2A2	26,7 ^a	3,1	4,3 ^{ab}	0,07	0,4 ^{cdefg}	0,02	0,8 ^b	0,03	0,2 ^b	0,1	0,1 ^{def}	0,01
R2A3	25,0 ^a	4,8	4,6 ^{abc}	0,4	0,5 ^{fghi}	0,1	0,8 ^{ab}	0,3	0,1 ^{ab}	0,02	0,1 ^{def}	0,01
R2A4	27,0 ^a	0,6	5,1 ^{abc}	0,2	0,6 ^{fghij}	0,05	0,7 ^{ab}	0,2	0,09 ^{ab}	0,01	0,08 ^{cdef}	0,01
R3A1	31,0 ^a	1,0	8,2 ^c	0,03	0,2 ^a	0,00	0,5 ^{ab}	0,03	0,02 ^a	0,00	0,02 ^{ab}	0,00
R3A2	25,2 ^a	2,6	6,2 ^{abc}	1,9	0,3 ^{abc}	0,02	0,5 ^{ab}	0,01	0,02 ^a	0,01	0,02 ^a	0,02
R3A3	25,8 ^a	1,7	4,7 ^{abc}	0,7	0,5 ^{bcdefgh}	0,2	0,6 ^{ab}	0,1	0,08 ^{ab}	0,03	0,08 ^{cdef}	0,00

(Tabela 3.15 continuação)

Queijos	C18:1a		C18:1b		C19:1		C20:1		C21:1		C22:1	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R3A4	31,4 ^a	0,03	4,8 ^{abc}	0,00	0,7 ^{ijk}	0,02	0,7 ^{ab}	0,03	0,07 ^{ab}	0,01	0,08 ^{cdef}	0,00
R4A1	28,8 ^a	3,2	8,2 ^c	0,4	0,2 ^{ab}	0,01	0,5 ^{ab}	0,1	0,05 ^a	0,01	0,03 ^{ab}	0,01
R4A2	23,6 ^a	0,1	5,6 ^{abc}	0,1	0,5 ^{defghi}	0,01	0,6 ^{ab}	0,01	0,1 ^{ab}	0,00	0,08 ^{cdef}	0,00
R4A3	27,8 ^a	3,2	5,4 ^{abc}	0,00	0,3 ^{abcd}	0,03	0,5 ^{ab}	0,05	0,05 ^a	0,01	0,06 ^{abcde}	0,01
R4A4	24,8 ^a	2,5	5,8 ^{abc}	0,3	0,3 ^{abcde}	0,04	0,5 ^a	0,09	0,05 ^a	0,04	0,04 ^{abc}	0,01
R5A1	30,0 ^a	1,4	4,7 ^{abc}	0,5	0,7 ^{hijk}	0,00	0,6 ^{ab}	0,06	0,06 ^{ab}	0,01	0,06 ^{abcde}	0,01
R5A2	29,4 ^a	0,3	5,1 ^{abc}	0,3	0,6 ^{ghij}	0,00	0,7 ^{ab}	0,01	0,1 ^{ab}	0,01	0,09 ^{def}	0,00
R5A3	30,8 ^a	0,9	4,6 ^{abc}	0,1	0,6 ^{ghij}	0,01	0,7 ^{ab}	0,05	0,1 ^{ab}	0,02	0,1 ^{ef}	0,02
R5A4	28,5 ^a	0,1	5,0 ^{abc}	0,4	0,7 ^{ik}	0,04	0,7 ^{ab}	0,03	0,1 ^{ab}	0,04	0,09 ^{cdef}	0,01
R6A1	24,4 ^a	0,3	6,5 ^{abc}	0,2	0,5 ^{efghi}	0,04	0,5 ^a	0,02	0,09 ^{ab}	0,00	0,05 ^{abcd}	0,00
R6A2	26,2 ^a	0,2	4,0 ^{ab}	1,0	0,6 ^{ghij}	0,05	0,7 ^{ab}	0,09	0,1 ^{ab}	0,01	0,08 ^{cdef}	0,01
R6A3	21,8 ^a	6,6	5,9 ^{abc}	0,8	0,4 ^{bcdefg}	0,01	0,6 ^{ab}	0,06	0,09 ^{ab}	0,01	0,07 ^{bcdef}	0,01
R6A4	21,5 ^a	10,2	2,9 ^a	0,07	0,7 ^{jk}	0,10	0,8 ^{ab}	0,07	0,1 ^{ab}	0,01	0,1 ^f	0,02
R7A1	23,5 ^a	2,5	5,1 ^{abc}	0,2	0,7 ^{hij}	0,04	0,5 ^{ab}	0,05	0,07 ^{ab}	0,01	0,03 ^{ab}	0,00
R7A2	23,9 ^a	4,7	3,8 ^{ab}	0,1	0,9 ^k	0,02	0,7 ^{ab}	0,07	0,1 ^{ab}	0,01	0,06 ^{abcde}	0,01
R7A3	26,8 ^a	0,8	5,0 ^{abc}	0,2	0,7 ^{hij}	0,03	0,5 ^{ab}	0,03	0,08 ^{ab}	0,07	0,04 ^{abc}	0,01
R7A4	26,1 ^a	0,4	7,5 ^{bc}	0,07	0,7 ^{ijk}	0,03	0,6 ^{ab}	0,01	0,05 ^a	0,00	0,04 ^{abc}	0,03

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Os ácidos gordos monoinsaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho foram de C9:1 a C22:1, com exceção do C12:1. Os ácidos miristoleico (C14:1), palmitoleico (C16:1), vacénico (C18:1a) e oleico (C18:1b) são os que apresentam valores médios mais expressivos.

Zengin e colaboradores (2011) e Domagala e colaboradores (2010) encontraram resultados semelhantes nas suas pesquisas para os ácidos miristoleico (0,83 a 1,60), palmitoleico (0,42 a 3,90) e vacénico (21,49 a 35,43) quando comparados com os encontrados nas amostras de Queijo de Coalho.

Alguns ácidos gordos monoinsaturados são referenciados em outros estudos sobre o perfil de ácidos gordos em queijo, como os ácidos nonadecénico (C19:1), gondóico (C20:1), heneicosanóico (C21:1) e erúcico (C22:1), mas que foram evidenciados nas amostras de Queijo de Coalho, o que pode contribuir na diferenciação deste queijo. No seu trabalho, Melo encontrou alguns destes ácidos gordos no queijo do Pico, de Portugal, com exceção do ácido erúcico (Melo, 2014).

Os ácidos gordos di-insaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, encontram-se na Tabela 3.16.

Tabela 3.16: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos di-insaturados de C18:2d a C23:2 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C18:2d		C18:2a		C18:2b		C18:2c		C21:2		C23:2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,9 ^{abcd}	0,3	1,4 ^a	1,9	1,9 ^{abcd}	0,2	0,01 ^{abc}	0,00	0,05 ^{ab}	0,04	0,04 ^{abcd}	0,00
R1A2	0,00 ^{abcde}	0,00	3,5 ^a	0,3	2,1 ^{abcde}	0,02	0,02 ^{abcd}	0,00	0,06 ^{ab}	0,04	0,06 ^d	0,01
R1A3	0,9 ^e	0,2	2,3 ^a	0,4	2,8 ^e	0,04	0,00 ^a	0,00	0,07 ^{ab}	0,01	0,04 ^{abcd}	0,01
R1A4	0,9 ^{cde}	0,01	2,3 ^a	0,08	2,4 ^{cde}	0,05	0,02 ^{abc}	0,00	0,07 ^{ab}	0,00	0,04 ^{bcd}	0,00
R2A1	0,4 ^{abcde}	0,6	2,2 ^a	0,7	2,1 ^{abcde}	0,2	0,1 ^{cdef}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,01
R2A2	0,7 ^{abcd}	0,05	2,0 ^a	0,01	1,8 ^{abcd}	0,1	0,1 ^{bcdef}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
R2A3	0,6 ^{abcde}	0,2	1,6 ^a	0,3	2,0 ^{abcde}	0,5	0,1 ^{ef}	0,03	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
R2A4	0,00 ^{cde}	0,00	2,3 ^a	0,1	2,4 ^{cde}	0,2	0,1 ^{def}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
R3A1	1,0 ^{cde}	0,2	2,9 ^a	0,8	2,4 ^{cde}	0,1	0,02 ^{abc}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
R3A2	1,7 ^{abcde}	0,7	5,0 ^a	1,9	1,9 ^{abcde}	0,2	0,08 ^{abcdef}	0,09	0,00 ^a	0,00	0,00 ^{ab}	0,00
R3A3	1,1 ^{abcde}	0,4	2,7 ^a	1,3	2,1 ^{abcde}	0,6	0,09 ^{abcdef}	0,05	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,01
R3A4	0,7 ^{abcd}	0,06	1,7 ^a	0,1	1,7 ^{abcd}	0,04	0,00 ^{ab}	0,00	0,07 ^b	0,01	0,04 ^{cd}	0,01
R4A1	0,00 ^{de}	0,00	2,9 ^a	0,4	2,5 ^{de}	0,1	0,09 ^{abcdef}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,01
R4A2	0,00 ^{bcde}	0,00	1,8 ^a	0,1	2,3 ^{bcde}	0,05	0,09 ^{abcdef}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,00
R4A3	0,6 ^{abc}	0,8	3,3 ^a	0,7	1,6 ^{abc}	0,3	0,02 ^{abc}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,01
R4A4	0,00 ^{abcde}	0,00	2,5 ^a	0,1	1,9 ^{abcde}	0,3	0,05 ^{abcde}	0,02	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,01
R5A1	0,6 ^{abcde}	0,01	1,4 ^a	0,1	2,0 ^{abcde}	0,02	0,1 ^{ef}	0,01	0,06 ^{ab}	0,00	0,02 ^{abcd}	0,02
R5A2	0,6 ^{abcde}	0,06	1,5 ^a	0,2	1,9 ^{abcde}	0,05	0,1 ^{bcdef}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,04 ^{abcd}	0,00
R5A3	0,6 ^{abcde}	0,08	1,6 ^a	0,03	1,9 ^{abcde}	0,09	0,07 ^{abcdef}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,04 ^{cd}	0,02
R5A4	0,7 ^{abcde}	0,07	1,5 ^a	0,08	2,1 ^{abcde}	0,02	0,1 ^{ef}	0,01	0,04 ^{ab}	0,06	0,04 ^{cd}	0,01
R6A1	0,3 ^{abcd}	0,4	1,8 ^a	0,4	1,9 ^{abcd}	0,02	0,1 ^{ef}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,00

(Tabela 3.16 continuação)

Queijos	C18:2d		C18:2a		C18:2b		C18:2c		C21:2		C23:2	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R6A2	0,3 ^{abcd}	0,4	1,7 ^a	0,9	1,6 ^{abcd}	0,04	0,1 ^{ef}	0,02	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,00
R6A3	0,6 ^{abcde}	0,09	1,7 ^a	0,1	2,2 ^{abcde}	0,3	0,1 ^f	0,05	0,00 ^a	0,00	0,01 ^{abc}	0,00
R6A4	0,6 ^{abcd}	0,05	5,9 ^a	7,7	1,7 ^{abcd}	0,1	0,09 ^{abcdef}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,00 ^a	0,00
R7A1	1,0 ^a	1,4	2,7 ^a	3,4	1,4 ^a	0,2	0,08 ^{abcdef}	0,02	0,05 ^{ab}	0,02	0,02 ^{abc}	0,02
R7A2	1,0 ^a	1,4	2,1 ^a	2,9	1,4 ^a	0,3	0,05 ^{abcde}	0,01	0,03 ^{ab}	0,04	0,01 ^{abc}	0,01
R7A3	0,2 ^{ab}	0,05	0,4 ^a	0,6	1,4 ^{ab}	0,1	0,08 ^{abcdef}	0,01	0,07 ^{ab}	0,00	0,02 ^{abcd}	0,02
R7A4	0,1 ^{cde}	0,06	0,4 ^a	0,6	2,4 ^{cde}	0,09	0,04 ^{abcde}	0,00	0,08 ^b	0,02	0,03 ^{abcd}	0,02

Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$).

Os ácidos linolelaídico (C18:2d), linoleico (C18:2a) e linoleico conjugado (C18:2b) são os ácidos gordos di-insaturados que apresentam valores médios mais expressivos identificados nas amostras de Queijo de Coalho, que variaram de (0,0 a 1,7), (0,4 a 6,0) e (1,4 a 2,5), respetivamente.

Dada a concentração dos extratos observa-se uma co-eluição parcial dos ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) o que afeta a integração deste último e pode também contribuir para uma variabilidade acrescida nas concentrações relativas deste ácido entre amostras individuais.

Concentrações relativas semelhantes foram encontradas para o ácido linoleico por Kim e colaboradores (2014) em queijo Mozzarella, por Zengin e co-autores (2011) em queijo branco da Turquia, por Romano e colaboradores (2011) em queijo Mozzarella e por Prandini, e co-autores (2011) em queijos frescos de leite de vaca. As concentrações de CLA evidenciadas nas amostras de Queijo de Coalho são superiores às concentrações encontradas por outros autores, o que pode constituir um fator importante de valorização deste queijo (Zengin *et al.*, 2014; Romano *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2009). Em particular observaram-se concentrações de CLA superiores a 2% da fração lipídica em queijos de todas as regiões, em particular da região de Catolé do Rocha (R1A2, R1A3 e R1A4) e na região de Cajazeiras (R2A1, R2A3, R2A4); por outro lado as regiões de Itaporanga e Serra do Teixeira são as que apresentam menor número de queijos com concentrações de CLA superiores a 2%, sendo desta última as amostras com menor concentração de CLA (1,4% nos queijos R7A1 e R7A2).

Zengin e colaboradores (2011) analisaram o efeito da temperatura da pasteurização do leite sobre a composição dos ácidos gordos em queijos branco na Turquia. Essa pesquisa revelou que o ácido vacénico foi o ácido gordo *trans* em maior quantidade nas amostras de queijo (24,09%), que o ácido ruménico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) foi o maior isómero do CLA encontrado nas amostras (2,16%) e ainda que a pasteurização não interferiu na concentração desses ácidos gordos.

Romano e colaboradores (2011), pesquisaram o conteúdo dos triglicéridos, ácidos gordos e CLA em amostras de queijo Mozzarella por um período de um ano. Os resultados encontrados para as concentrações relativas de CLA variaram de 0,74 a 0,93%, nas diferentes estações do ano.

Prandini e co-autores (2009), estudaram a composição dos ácidos gordos e do CLA em amostras de queijos comerciais, entre os quais, queijo fresco de leite de vaca. Os autores agruparam as amostras de queijo relativamente à origem do leite (vaca, cabra e ovelha) e quanto ao processamento dos queijos. Os queijos de ovelha apresentaram maior conteúdo de CLA que os queijos de cabra e de vaca. A média do CLA em queijo de leite de vaca foi de 5,66 mg/g de gordura (0,566%) e em queijo fresco de vaca foi de 6,10 mg/g de gordura (0,610%). No entanto, não foi encontrada uma diferença significativa no conteúdo de CLA em queijos com técnicas de processamento.

Oliveira e colaboradores (2009) avaliaram o perfil dos ácidos gordos em queijos Mozzarella produzidos a partir do leite de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lípidos. O óleo de soja apresentou a maior capacidade de elevar as concentrações do CLA e do ácido vacénico no leite e no queijo Mozzarella, aumentando o teor de CLA de 1,04% para 2,86%, quando a alimentação foi suplementada com óleo de soja.

Santos e colaboradores (2011) observaram o mesmo efeito de aumento do teor de CLA em Queijo de Coalho produzido a partir de leite de cabra, suplementando a ração animal com óleo de soja.

O grão de soja ou o farelo de soja são fontes proteicas vulgarmente utilizada para alimentação de gado produtor de leite na região do Nordeste, o que pode explicar os valores relativamente elevados de CLA encontrados nos queijos produzidos nesta região (Gonçalves *et al.*, 2009).

Estas observações sugerem o potencial da utilização de outras plantas oleaginosas ou resíduos do seu processamento em alimentação animal de forma a favorecer a presença de componentes funcionais no leite produzido e nos produtos derivados.

Os ácidos gordos polinsaturados individuais identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba encontram-se na Tabela 3.17.

Tabela 3.17: Médias e desvios padrão das concentrações relativas de ácidos gordos poliinsaturados de C19:6a a AGPI3 identificados nas amostras de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Brasil.

Queijos	C19:6		C19:3		C20:5		C20:4		C20:3a		C20:3b		AGPI1		AGPI2		C22:6		AGPI3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R1A1	0,2 ^{ghi}	0,01	0,2 ^{efg}	0,00	0,3 ^{abc}	0,03	0,06 ^b	0,01	0,1 ^a	0,00	0,1 ^{ghi}	0,00	0,01 ^a	0,00	0,4 ^a	0,02	0,2 ^{abcd}	0,00	0,6 ^a	0,10
R1A2	0,2 ^{ghi}	0,00	0,2 ^g	0,01	0,2 ^{abc}	0,01	0,06 ^{ab}	0,00	0,1 ^a	0,02	0,2 ^{bcdefg}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,3 ^a	0,01	0,2 ^{cdef}	0,00	0,3 ^a	0,02
R1A3	0,2 ^{ijk}	0,01	0,3 ^h	0,01	0,2 ^{ab}	0,02	0,07 ^{ab}	0,01	0,09 ^a	0,01	0,2 ^{defgh}	0,02	0,00 ^a	0,00	0,3 ^a	0,05	0,1 ^{abcd}	0,00	0,4 ^a	0,06
R1A4	0,2 ^{hij}	0,01	0,2 ^{fg}	0,00	0,2 ^{ab}	0,01	0,06 ^{ab}	0,01	0,1 ^a	0,05	0,1 ^{bcdefg}	0,01	0,02 ^a	0,00	0,3 ^a	0,00	0,2 ^{abcd}	0,04	0,4 ^{ab}	0,01
R2A1	0,1 ^{defg}	0,02	0,02 ^{ab}	0,03	0,2 ^{ab}	0,02	0,02 ^a	0,00	0,05 ^a	0,05	0,2 ^{abc}	0,00	0,05 ^a	0,08	0,1 ^a	0,01	0,1 ^{abcde}	0,01	0,1 ^{ab}	0,18
R2A2	0,06 ^{ab}	0,01	0,01 ^{ab}	0,00	0,2 ^{abc}	0,02	0,00 ^{ab}	0,00	0,02 ^a	0,01	0,3 ^a	0,03	0,04 ^a	0,00	0,2 ^a	0,01	0,2 ^f	0,01	0,00 ^{ab}	0,00
R2A3	0,1 ^{abcde}	0,01	0,06 ^{abc}	0,01	0,2 ^{abc}	0,08	0,01 ^{ab}	0,01	0,03 ^a	0,02	0,2 ^{abc}	0,07	0,07 ^a	0,02	0,2 ^a	0,08	0,2 ^{cdef}	0,05	0,1 ^{ab}	0,18
R2A4	0,1 ^{abcde}	0,03	0,00 ^a	0,00	0,2 ^{abc}	0,02	0,00 ^a	0,00	0,09 ^a	0,11	0,2 ^{ab}	0,03	0,07 ^a	0,02	0,2 ^a	0,02	0,2 ^{cdef}	0,02	0,08 ^{ab}	0,12
R3A1	0,1 ^{abcd}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,2 ^{abc}	0,01	0,00 ^{ab}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,07 ^{cdefg}	0,01	0,03 ^a	0,01	0,2 ^a	0,01	0,1 ^{ab}	0,00	0,4 ^{ab}	0,02
R3A2	0,1 ^{cdefg}	0,02	0,2 ^{efg}	0,04	0,4 ^c	0,17	0,05 ^{ab}	0,03	0,03 ^a	0,00	0,09 ^{abcd}	0,02	0,00 ^a	0,00	0,4 ^a	0,06	0,2 ^{abc}	0,03	0,2 ^a	0,09
R3A3	0,06 ^a	0,01	0,01 ^{ab}	0,00	0,2 ^{abc}	0,05	0,01 ^{ab}	0,01	0,06 ^a	0,06	0,2 ^{abcd}	0,08	0,09 ^a	0,02	0,2 ^a	0,02	0,2 ^{abcde}	0,01	0,2 ^b	0,01
R3A4	0,1 ^{defg}	0,00	0,2 ^{fg}	0,01	0,2 ^{abc}	0,00	0,05 ^{ab}	0,00	0,20 ^a	0,20	0,2 ^{bcdef}	0,00	0,00 ^a	0,00	0,2 ^a	0,02	0,1 ^{cdef}	0,01	0,3 ^a	0,00
R4A1	0,3 ^{kl}	0,00	0,05 ^{abc}	0,04	0,2 ^{ab}	0,03	0,1 ^{ab}	0,21	0,05 ^a	0,05	0,06 ^{bcdefg}	0,01	0,03 ^a	0,02	0,2 ^a	0,02	0,3 ^a	0,20	0,3 ^{ab}	0,09
R4A2	0,09 ^{abcd}	0,01	0,05 ^{abc}	0,01	0,1 ^{ab}	0,01	0,01 ^{ab}	0,01	0,06 ^a	0,05	0,2 ^{abcd}	0,01	0,07 ^a	0,00	0,2 ^a	0,00	0,2 ^{bcde}	0,00	0,2 ^{ab}	0,01
R4A3	0,07 ^{abc}	0,00	0,03 ^{abc}	0,01	0,3 ^{bc}	0,03	0,01 ^{ab}	0,02	0,08 ^a	0,07	0,1 ^{abcd}	0,00	0,03 ^a	0,03	0,2 ^a	0,02	0,09 ^{abc}	0,04	0,2 ^{ab}	0,01
R4A4	0,1 ^{abcd}	0,00	0,03 ^{abc}	0,02	0,2 ^{ab}	0,05	0,00 ^a	0,00	0,02 ^a	0,01	0,1 ^{abcd}	0,01	0,01 ^a	0,02	0,2 ^a	0,06	0,1 ^{abc}	0,05	0,2 ^{ab}	0,01
R5A1	0,2 ^{fghi}	0,01	0,07 ^{abcd}	0,00	0,2 ^{ab}	0,03	0,05 ^{ab}	0,00	0,05 ^a	0,00	0,2 ^{bcdefg}	0,03	0,05 ^a	0,01	0,2 ^a	0,04	0,2 ^{cdef}	0,03	0,3 ^{ab}	0,03
R5A2	0,2 ^{efghi}	0,00	0,1 ^{def}	0,01	0,2 ^{ab}	0,00	0,06 ^{ab}	0,00	0,06 ^a	0,00	0,2 ^{bcdefg}	0,00	0,04 ^a	0,00	0,3 ^a	0,02	0,21 ^{def}	0,01	0,3 ^{ab}	0,01
R5A3	0,1 ^{defgh}	0,01	0,1 ^{ef}	0,01	0,2 ^{abc}	0,02	0,06 ^{ab}	0,01	0,07 ^a	0,01	0,2 ^{bcdefg}	0,03	0,05 ^a	0,01	0,3 ^a	0,05	0,2 ^{def}	0,03	0,3 ^{ab}	0,04
R5A4	0,1 ^{defg}	0,00	0,08 ^{bcd}	0,01	0,1 ^a	0,02	0,05 ^{ab}	0,01	0,06 ^a	0,02	0,2 ^{bcdefg}	0,02	0,06 ^a	0,01	0,2 ^a	0,02	0,2 ^{cdef}	0,02	0,4 ^{ab}	0,03
R6A1	0,1 ^{abcdef}	0,01	0,05 ^{abc}	0,00	0,2 ^{ab}	0,01	0,03 ^a	0,00	0,03 ^a	0,00	0,2 ^{abcde}	0,02	0,06 ^a	0,00	0,2 ^a	0,02	0,2 ^{abcde}	0,00	0,2 ^{ab}	0,01

(Tabela 3.17 continuação)

Queijos	C19:6		C19:3		C20:5		C20:4		C20:3a		C20:3b		AGPI1		AGPI2		C22:6		AGPI3	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
R6A2	0,1 ^{bcdefg}	0,00	0,1 ^{cde}	0,03	0,2 ^{abc}	0,03	0,04 ^{ab}	0,01	0,03 ^a	0,00	0,3 ^{bcdef}	0,05	0,04 ^a	0,01	0,3 ^a	0,05	0,3 ^{ef}	0,05	0,3 ^{ab}	0,06
R6A3	0,09 ^{abcd}	0,03	0,07 ^{abcd}	0,05	0,3 ^{abc}	0,06	0,03 ^{ab}	0,04	0,04 ^a	0,03	0,2 ^{abcde}	0,02	0,1 ^a	0,03	0,3 ^a	0,01	0,2 ^{bcde}	0,03	0,2 ^b	0,01
R6A4	0,09 ^{abcd}	0,00	0,06 ^{abc}	0,03	0,2 ^{abc}	0,03	0,04 ^{ab}	0,01	0,02 ^a	0,01	0,2 ^{bcdef}	0,04	0,07 ^a	0,02	0,3 ^a	0,02	0,2 ^{def}	0,04	0,3 ^{ab}	0,02
R7A1	0,2 ^{jk}	0,01	0,2 ^{fg}	0,00	0,2 ^{ab}	0,02	0,1 ^{ab}	0,03	0,08 ^a	0,06	0,1 ^{efghi}	0,03	0,01 ^a	0,00	0,2 ^a	0,1	0,2 ^{abc}	0,01	0,5 ^a	0,08
R7A2	0,2 ^{ijk}	0,02	0,06 ^{abc}	0,01	0,1 ^a	0,02	0,1 ^{ab}	0,01	0,06 ^a	0,05	0,1 ^{fghi}	0,00	0,01 ^a	0,00	0,3 ^a	0,1	0,2 ^{abcd}	0,00	0,6 ^a	0,06
R7A3	0,2 ^{kl}	0,02	0,2 ^{fg}	0,01	0,2 ^{ab}	0,01	0,1 ^{ab}	0,01	0,02 ^a	0,02	0,1 ^{hi}	0,02	0,01 ^a	0,01	0,3 ^a	0,2	0,2 ^{abcd}	0,03	0,7 ^a	0,07
R7A4	0,3 ^l	0,01	0,3 ^h	0,01	0,1 ^a	0,00	0,1 ^{ab}	0,01	0,00 ^a	0,00	0,1 ⁱ	0,03	0,00 ^a	0,01	0,2 ^a	0,03	0,2 ^{abcd}	0,17	0,8 ^a	0,08

Legenda: AGPI1-ácido gordo polinsaturado 1; AGPI2-ácido gordo polinsaturado 2; AGPI3-ácido gordo polinsaturado 3.
Médias nas mesmas colunas e com diferentes letras em sobrescrito, apresentam diferenças significativas ($p < 0.05$)

De entre os ácidos gordos polinsaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho, os que apareceram em todas as amostras foram os ácidos nonadeca-hexanóico (C19:6), eicosapentaenóico (C20:5, EPA), eicosatrienóico (C20:3b) e docosahexaenóico (C22:6, DHA). Além destes, alguns ácidos gordos poliinsaturados não identificados foram contabilizados no perfil de ácidos gordos da fração lipídica e classificados como AGPI1 (ácido gordo polinsaturado 1), AGPI2 (ácido gordo polinsaturado 2) e AGPI3 (ácido gordo polinsaturado 3), porque estavam presentes na maior parte das amostras e apesar de não ter sido possível encontrar padrões com tempos de retenção coincidentes os espectros de massa são inequivocamente de ácidos gordos polinsaturados, pelo que lhes foi atribuída a identificação enquanto grupo funcional.

O conteúdo dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico encontrado nas amostras de Queijo de Coalho variaram de 0,10% a 0,38% e 0,17% a 0,26%, respetivamente. Estes resultados foram bem superiores aos encontrados por Zengin e colaboradores (2011), 0,05 e 0,06%, respetivamente. Romano e colaboradores (2011) relatam apenas a presença do ácido eicosapentaenóico (0,02 a 0,05%) em queijo Mozzarella. Foi encontrado um conteúdo similar para o ácido eicosapentaenóico (0,06 a 0,19 g/100g) no queijo Herby (Temiz *et al.*, 2009), no entanto, o autor não faz referência ao ácido docosahexaenóico.

Os ácidos gordos polinsaturados abrangem as famílias de ácidos gordos ómega-3 e ómega-6. Os ácidos araquidónico e docosahexaenóico desempenham importantes funções no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina. Entretanto, os ácidos araquidónico e o eicosapentaenóico são precursores dos prostanóides e dos leucotrienos, que influenciam inúmeras funções celulares que controlam mecanismos fisiológicos e patológicos no organismo; em particular é a estes ácidos atribuída uma ação anti-inflamatória mediada pelos metabolitos que deles derivam, pelo que são considerados de grande importância na prevenção e melhoria de patologias do sistema cardiovascular, da artrite reumatóide e de outros estados fisiológicos que envolvem inflamação (Martin *et al.*, 2006).

Na Figura 3.6 representam-se as concentrações relativas médias dos ácidos gordos predominantes no perfil lipídico de queijos produzidos na mesma microrregião do Sertão da Paraíba. Como já foi referido, neste grupo dos ácidos gordos maioritários incluem-se os ácidos gordos monoinsaturados oleico (C18:1) e elaídico (C18:1), que se encontram em concentrações superiores a 5%, juntamente com os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0).

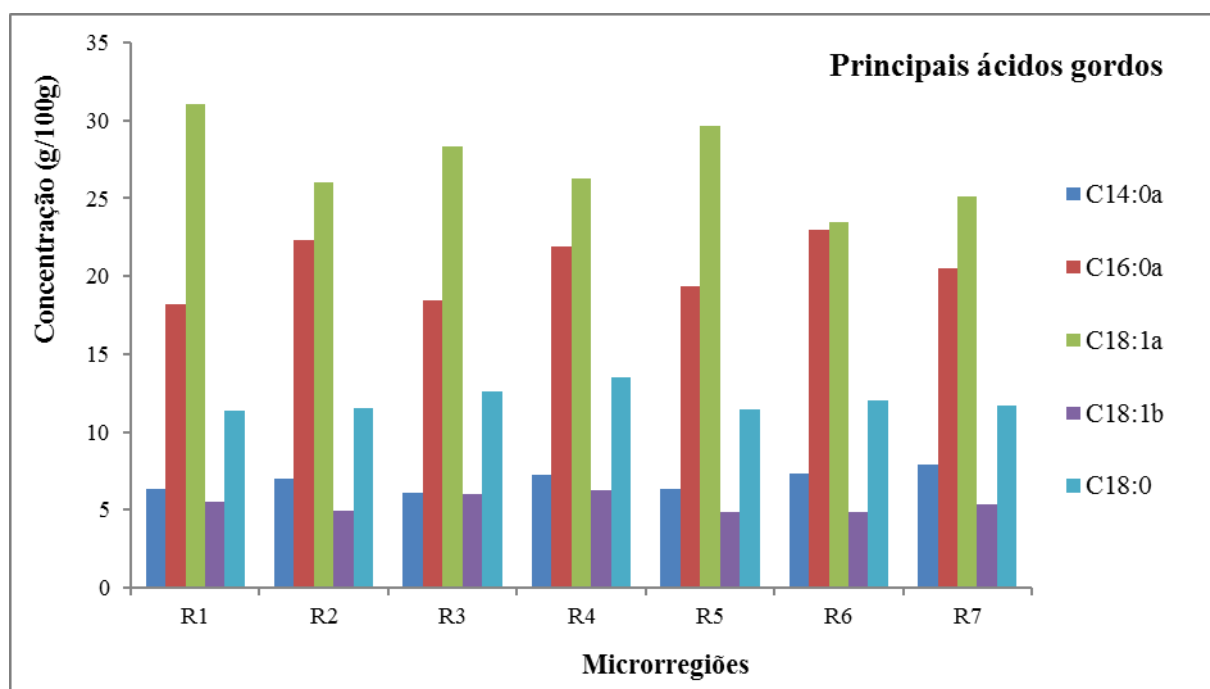


Figura 3.6: Ácidos gordos maioritários (C14:0a, C16:0a, C18:1a, C18:1b, C18:0 e C18:2b) do perfil de ácidos gordos do Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.

Os componentes de maior concentração, os ácidos oleico (C18:1a) e palmítico (C16:0a) condicionam fortemente a relação entre ácidos gordos saturados e insaturados, e pode observar-se que nas regiões R1 (Catolé do Rocha), R3 (Sousa) e R5 (Piancó), a razão entre as médias das concentrações de ácido oleico e palmítico são claramente superiores a 1, reflectindo uma maior insaturação da fração lipídica desses queijos. Pelo contrário, na região de Itaporanga (R6) essa razão é próxima de 1 o que se traduz num maior grau de saturação dos queijos dessa região.

Se considerarmos a razão entre o somatório das concentrações médias de ácidos palmíticos e esteárico e a concentração média de ácido oleico teremos uma boa aproximação ao índice de saturação da fração lipídica dos queijos, uma vez que estes são os componentes que mais contribuem para esse balanço; feita essa avaliação a única região com uma razão inferior a 1 é a região de Catolé do Rocha (R1), com um valor de 0,95 e a região com uma razão mais elevada é a região de Itaporanga (R6) com um valor de 1,49.

Os ácidos gordos di-insaturados apresentaram concentrações médias por região que variaram na gama de 0 a 3,5% e representam-se na Figura 3.7.

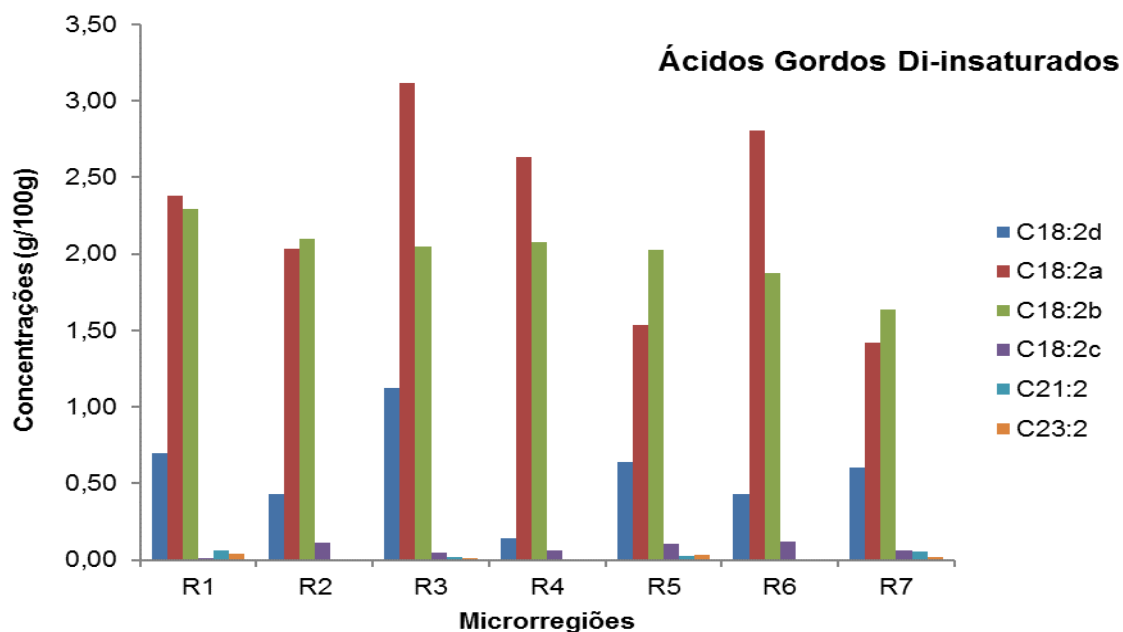


Figura 3.7.: Ácidos gordos di-insaturados C18:2d, C18:2a, C18:2b, C18:2c, C21:2 e C23:2 identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba

Os ácidos linoleico e linoleico conjugado destacam-se como os ácidos que se apresentam em maior concentração, dentre os ácidos gordos di-insaturados. As regiões de Sousa (R3), Patos (R4) e Itaporanga (R6) destacam-se pelas concentrações elevadas de ácido linoleico enquanto as regiões da Serra do Teixeira (R7) e de Piancó (R5) apresentam concentrações mais baixas deste ácido. A presença de concentrações elevadas de ácido linoleico não constitui uma característica favorável na medida em que este ácido é um precursor do ácido araquidónico ao qual estão associadas a propriedades inflamatórias e adipogénicas (Naughton *et al.*, 2016).

Este efeito negativo do ácido linoleico pode ser parcialmente compensado pelo ácido linoleico conjugado (CLA), na medida em que alguns autores (Auld et al., 2016; Jelińska *et al.*, 2014; Perini *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2006) observaram em modelos animais que a suplementação da alimentação com CLA contribuiu para uma redução na biossíntese de eicosanóides pro-inflamatórios, derivados do ácido linoleico, e associaram ao CLA atividades anticarcinogénicas, antiaterogénicas, anti-inflamatórias e de redução da massa gorda.

Assim, se considerarmos a razão entre a concentração média de CLA e a concentração média de ácido linoleico podemos avaliar o contributo destes dois ácidos gordos para o carácter anti-inflamatório da fração lipídica e observar que esta razão é mais alta ($> 1,15$) para as regiões de Piancó (R5) e Serra do Teixeira (R7) e mais baixa ($< 0,7$) para as regiões Itaporanga (R6) e Sousa (R3). A região do Catolé do Rocha (R1) é a região que apresenta maior concentração do CLA, enquanto a região Serra do Teixeira (R7) apresenta a menor concentração.

A concentração dos ácidos gordos monoinsaturados que se apresentam em pequena quantidade distribuídos por região encontra-se na Figura 3.8.

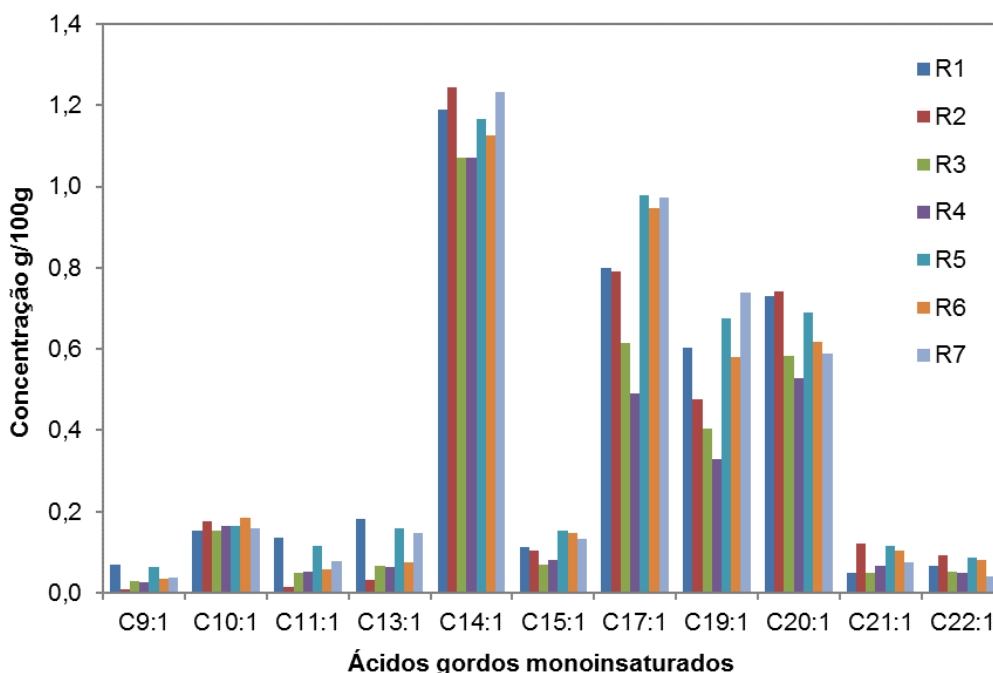


Figura 3.8: Ácidos gordos monoinsaturados com pequena concentração identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.

O ácido miristoleico (C14:1) é o ácido monoinsaturado de maior concentração relativa neste grupo e apresentou valores médios comparáveis para as diversas regiões consideradas. Os ácidos heptadecenóico (C17:1) e nonadecenóico (C19:1), estão presentes em concentrações comparáveis ou mesmo superiores às do ácido eicosenóico (C20:1) e apresentam valores médios mais elevados nas regiões Piancó (R5), Itaporanga (R6) ou Serra do Teixeira (R7), o que pode reflectir uma influência das características do leite e da microbiota do queijo desta região.

Na Figura 3.9 apresentam-se as concentrações médias dos ácidos gordos polinsaturados agrupados por região. Apesar de se tratarem dos ácidos gordos minoritários no perfil lipídico total com concentrações relativas que variaram entre 0 e 0,7%, incluem componentes de grande relevância funcional mesmo em concentrações reduzidas como é o caso do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5) e docosahexaenóico (DHA, C22:6), precursores da biossíntese de metabolitos anti-inflamatórios e que portanto se consideram benéficos para diversas patologias que envolvem inflamação.

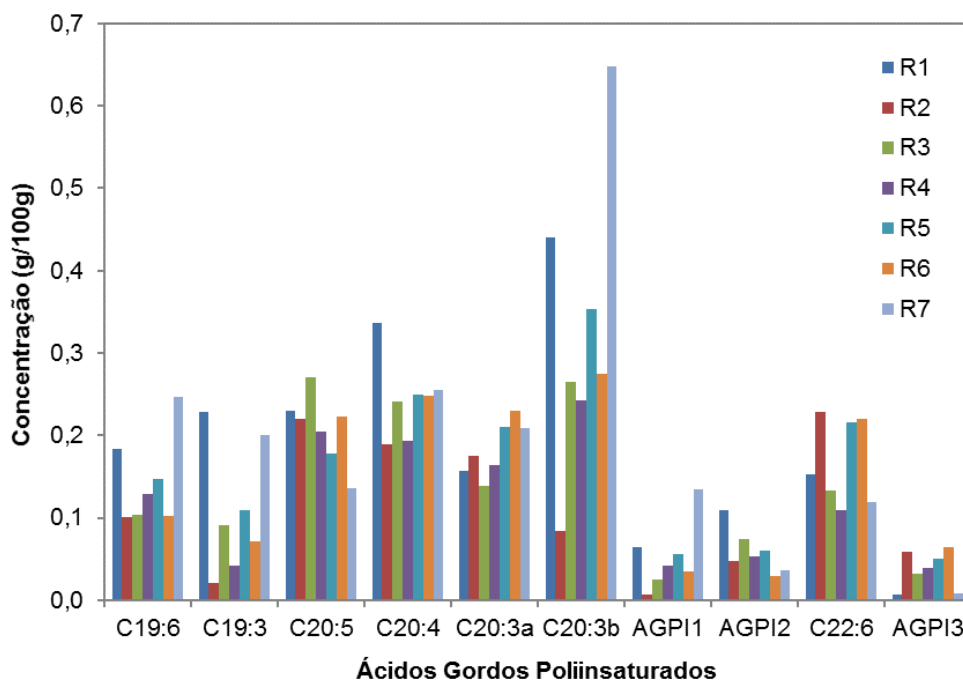


Figura 3.9: Ácidos gordos polinsaturados C19:6, C19:3, C20:5, C20:4, C20:3a, C20:3b, AGPI1, AGPI2, C22:6 e AGPI3 identificados no Queijo de Coalho artesanal produzido nas microrregiões do Sertão da Paraíba.

A região de Catolé do Rocha distingue-se por apresentar concentrações médias para os ácidos gordos C19:3, C20:3, C20:4 e AGPI2 superiores às de outras regiões e concentrações também elevadas dos restantes ácidos gordos polinsaturados.

Embora com menores concentrações relativas de outros ácidos gordos polinsaturados a região de Serra do Teixeira apresentou concentrações relativas médias dos ácidos gordos C19:3, C19:6, C20:3 e AGPI1 superiores às da maior parte das restantes regiões.

3.3.1 Correlações

A covariância das concentrações relativas de ácidos gordos individuais, considerando os principais grupos funcionais, foi avaliada através da determinação dos coeficientes de correlação de Pearson, entre os valores médios para os queijos individuais e os valores médios para o conjunto de queijos da mesma microrregião (Tabela 3.18).

Tabela 3.18: Coeficientes de Correlação de Pearson entre as concentrações médias dos ácidos gordos agrupados por grupo funcional, e avaliadas para os queijos de Coalho individuais ou para os grupos de queijos de cada microregião

Coef. de Correlação de Pearson	Queijos Individuais					Regiões				
	AGS	AGI	AGMI	AGDI	AGPI	AGS	AGI	AGMI	AGDI	AGPI
AGS	1	-0,994**	-0,919**	-0,338**	-0,700**	1	-0,994**	-0,913**	-0,379	-0,893**
AGI		1	0,945**	0,271*	0,732**		1	0,951**	0,282	0,934**
AGMI			1	-0,052	0,676**			1	-0,030	0,993**
AGDI				1	0,108				1	-0,065
AGPI					1					1

Legenda: * - correlação negativa muito forte; ** - correlação negativa forte; *** - correlação positiva muito forte; **** - correlação positiva forte.

Como é natural, dada a forma de cálculo destas variáveis, observaram-se correlações negativas muito fortes ($|\rho| > 0,9$) entre os teores relativos de ácidos gordos saturados (AGS) e de ácidos gordos insaturados (AGI) e em particular os ácidos gordos monoinsaturados (AGMI). As categorias funcionais que mais se correlacionam ($|\rho| = 0,945$ ou $0,951$) com os ácidos gordos insaturados totais (AGI), foram os ácidos gordos monoinsaturados (o que se justifica pela sua concentração maioritária) mas também os ácidos gordos polinsaturados (AGPI), que apresentaram correlações fortes ou muito fortes ($|\rho| = 0,732$ ou $0,934$), considerando os valores individuais ou as médias por região. De realçar que os ácidos gordos di-insaturados não apresentaram correlações fortes ou muito fortes com os outros grupos funcionais, o que pode dever-se a dificuldades na quantificação de alguns dos componentes importantes deste grupo, nomeadamente o ácido linoleico por co-eluição com o ácido oleico de concentração muito superior. Representam-se na Figura 3.10 os coeficientes de correlação de Pearson para os pares de ácidos gordos cujas correlações se revelaram fortes ($\rho > 0,7$) ou muito fortes ($\rho > 0,9$).

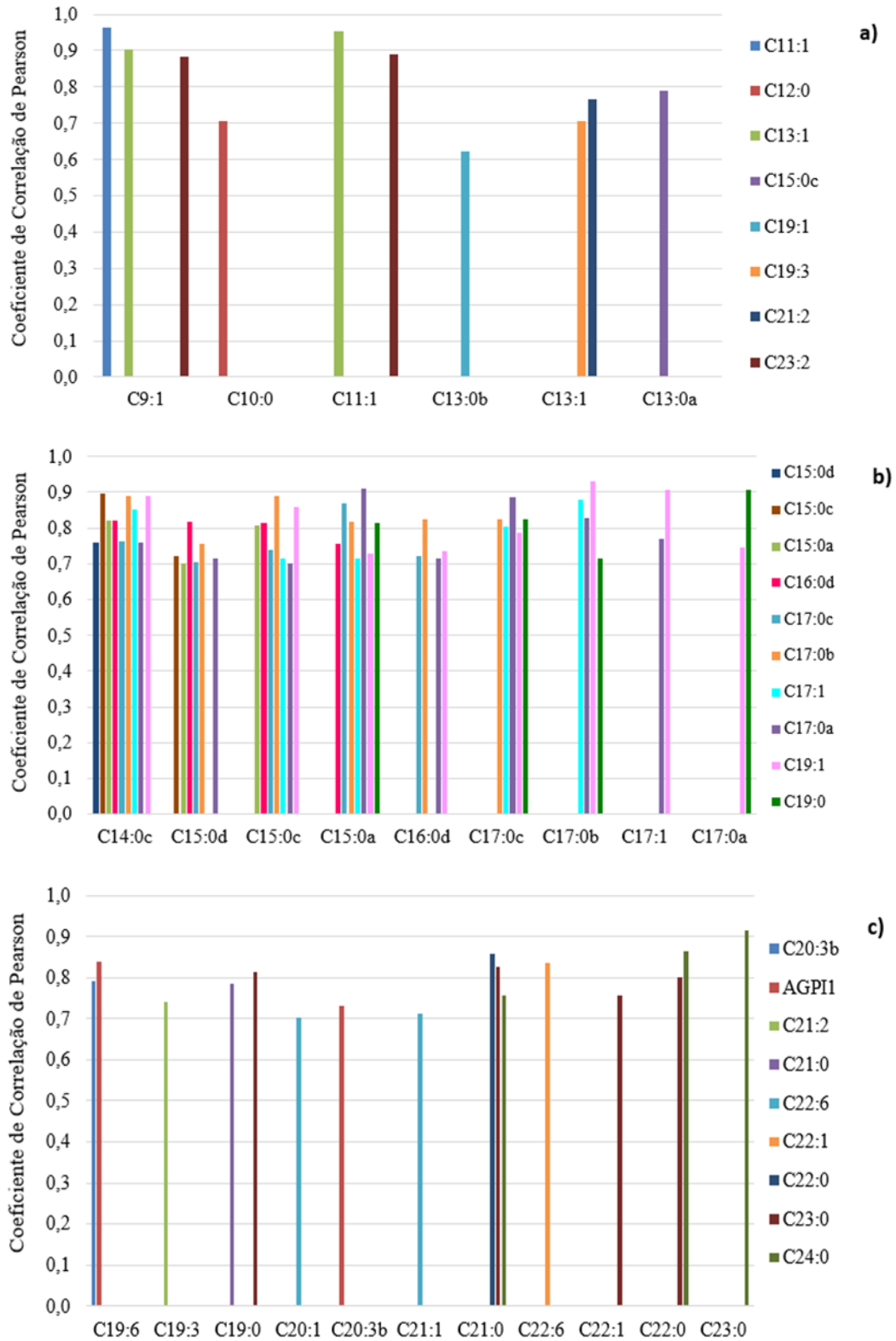


Figura 3.10: Coeficientes de correlação de Pearson para os pares de ácidos gordos cuja concentração relativa apresenta correlações fortes ou muito fortes

Como se pode observar na Figura 3.10, registam-se correlações fortes e muitos fortes entre as concentrações dos ácidos gordos com 14 a 19 carbonos, o que indica que os seus teores nos queijos aumentam ou diminuem de forma idêntica o que poderá ser uma evidência da maior relação destes ácidos gordos com as características específicas de cada queijo e do seu estado de maturação.

3.4 Conclusões

O perfil de ésteres metílicos de ácidos gordos identificados em amostras de Queijo de Coalho da Paraíba caracterizou-se pela presença de 57 ácidos gordos, em concentrações variáveis, mas detetados na maior parte das amostras analisadas;

Os ácidos oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0) foram os predominantes correspondendo às concentrações mais elevadas;

Os perfis de ésteres metílicos dos ácidos gordos dos Queijos de Coalho apresentaram ácidos gordos com número de carbonos que variou entre 6 e 24, com predominância dos ácidos com 18 e 16 carbonos. Os ácidos gordos saturados apresentaram concentrações relativas na gordura total dos Queijos de Coalho típicas das observadas em produtos lácteos;

As amostras de queijos das regiões de Catolé do Rocha (R1A1, R1A2 e R1A4) e da região de Sousa (R3A1) apresentam a média de ácidos gordos saturados menor que a dos insaturados;

As amostras de queijos das regiões de Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) apresentaram média de ácidos gordos saturados superior aos dos ácidos gordos insaturados;

As concentrações de ácidos gordos di-insaturados incluem o ácido linoleico e os seus isómeros e o ácido linoleico conjugado;

Os ácidos gordos polinsaturados foram a classe com menores concentrações totais, como o EPA e o DHA, mas foi a classe que apresentou mais diferenças significativas entre as médias das amostras;

Os queijos da região de Catolé do Rocha (R1), distinguem-se dos restantes por apresentarem a média mais baixa de ácidos gordos saturados, a média mais alta de ácidos gordos monoinsaturados, além de médias elevadas de ácidos gordos di-insaturados e polinsaturados, o que lhes confere características interessantes do ponto de vista nutracêutico.

A região de Itaporanga (R6) apresentou menor média de ácidos gordos insaturados, maior média de ácidos gordos saturados e uma média relativamente baixa de ácidos gordos polinsaturados, o que coloca algumas limitações ao seu valor nutricional e ao seu efeito fisiológico.

As regiões Serra do Teixeira (R7) e Catolé do Rocha (R1) apresentaram médias mais elevadas de ácidos gordos polinsaturados, que de alguma forma compensa o teor elevado de lípidos saturados típicos dos queijos;

Os ácidos gordos C6, C8, C10 e os ácidos gordos com um número ímpar de carbonos como C13, C15, C17, C19, C21 e C23 estão presentes em concentrações reduzidas nas amostras de queijo, no entanto são os ácidos que apresentam maior variabilidade entre queijos.

A região de Sousa (R3) foi a que apresentou amostras com menor concentração de ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0). O queijo de St. Redenção (R3A4), como também a amostra da

localidade de Paulista (R3A1), dessa mesma região, apresentou o menor teor de ácido palmítico (C16:0)

As amostras da região de Catolé do Rocha (R1) apresentaram alguns dos teores mais baixos destes ácidos gordos saturados de cadeia média.

As amostras de queijos das regiões de Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) tiveram concentrações elevadas dos ácidos gordos saturados de cadeia curta, que podem contribuir para o aroma dos queijos, e foi nas amostras de Mãe d'Água (R7A2) que se verificaram os maiores teores dos ácidos láurico e mirístico.

As amostras de St. Cachoeira (R4A4) apresentaram as concentrações mais elevadas do ácido palmítico;

Os ácidos gordos monoinsaturados identificados nas amostras de Queijo de Coalho foram de C9:1 a C22:1, com exceção do C12:1. Os ácidos miristoleico (C14:1), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1a) e eláidico (C18:1b) são os que apresentam valores médios mais expressivos;

Alguns ácidos gordos monoinsaturados minoritários como os ácidos nonadecenoico (C19:1), gondóico (C20:1), heneicosanoico (C21:1) e erúico (C22:1) foram evidenciados nas amostras de Queijo de Coalho;

Os ácidos linolelaídico (C18:2d), linoleico (C18:2a) e linoleico conjugado (C18:2b) são os ácidos gordos di-insaturados que apresentam valores médios mais expressivos identificados nas amostras de Queijo de Coalho;

Concentrações de CLA foram encontradas na fração lipídica em queijos de todas as regiões, em particular da região de Catolé do Rocha (R1A2, R1A3 e R1A4) e na região de Cajazeiras (R2A1, R2A3, R2A4); por outro lado as amostras das regiões de Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) foram as que apresentam menor concentrações de CLA;

Os ácidos nonadecahexanoico (C19:6), eicosapentaenoico (C20:5, EPA), eicosatrienoico (C20:3b) e docosahexaenoico (C22:6) foram alguns dos ácidos gordos polinsaturados identificados em todas as amostras de Queijo de Coalho;

Ácidos gordos polinsaturados não identificados e classificados como AGPI1 (ácido gordo polinsaturado 1), AGPI2 (ácido gordo polinsaturado 2) e AGPI3 (ácido gordo polinsaturado 3) foram contabilizados no perfil de ácidos gordos em algumas amostras de Queijo de Coalho;

Apesar dos Queijos de Coalho analisados apresentarem uma concentração de ácidos gordos saturados predominante, como é comum em produtos lácteos, registaram-se também concentrações elevadas de ácidos mono, di e polinsaturados quando comparados com outros queijos; em particular é relevante a presença de ácidos polinsaturados como o CLA, o EPA, o DHA e outros ácidos polinsaturados que são precursores de metabolitos com ação antioxidante e anti-inflamatória e que de alguma forma compensam os efeitos pro-oxidantes e pro-inflamatórios de ácidos gordos saturados ou do ácido linoleico (precursores de metabolitos com estes efeitos indesejáveis).

Os ácidos gordos insaturados totais (AGI) apresentaram correlações fortes ou muito fortes com os ácidos gordos monoinsaturados e com os ácidos gordos polinsaturados (AGPI), o que decorre das concentrações elevadas dos ácidos monoinsaturados e da covariância das concentrações dos ácidos gordos polinsaturados com os restantes ácidos insaturados.

Referências

- Addis, M., Fiori, M., Riu, G., Pes, M., Salvatore, E. e Pirisi, A. 2015. Physico-chemical characteristics and acidic profile of PDO Pecorino Romano cheese: Seasonal variation. *Small Ruminant Research*, 126, 73–79.
- Atasoy, A. F. e Türkoğlu, H. 2009. Lipolysis in Urfa cheese produced from raw and pasteurized goats' and cows' milk with mesophilic or thermophilic cultures during ripening. *Food Chemistry*, 115, 71–78.
- Ávila, M., Calzada, J., Garde, S. e Nuñez, M. 2007. Effect of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain and high-pressure treatment on the esterase activity and free fatty acids in Hispánico cheese. *International Dairy Journal*, 17, 1415–1423.
- Auldist, M.J., Greenwood, J.S., Wright, M.M., Hannah, M., Williams, R.P., Moate, P.J. e Wales, W.J. 2016. Incorporating mixed rations and formulated grain, mixes into the diet of grazing cows: effects on milk composition and coagulation properties, and the yield and quality of cheddar cheese. *Journal Dairy Science*, 99, 4196-4205.
- Best images of diagram of the GC MS. 2016. Disponível em http://www.gridgit.com/post_diagram-of-the-gc-ms_33834/. Consultado em 15 de agosto de 2016.
- Berard, J., Bianchi, F., Careri, M., Chatel, A., Mangia, A. e Musci, M. 2007. Characterization of the volatile fraction and of free fatty acids of “Fontina Valle d’Aosta”, a protected designation of origin Italian cheese. *Food Chemistry*, 105, 293–300.
- Bezerra, T. K. A. 2015. Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em Queijo de Coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Bontinis, T.G., Mallatou, H., Pappa, E.C., Massouras, T. e Alichanidis, E. 2012. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, 105, 193– 201.
- Buffa, M., Guamis, B., Saldo, J. e Trujillo, A.J. 2004. Changes in organic acids during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or high-pressure-treated goats' milk. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 37, 247-253.
- Califano, A.N. e Bevilacqua, A.E. 2000. Multivariate Analysis of the Organic Acids Content of Gouda type Cheese during Ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 949-960.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H. e Wilkinson, M. G. 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge. *International Dairy Journal*, 13, 841–866, 2003.
- De Jong, C e Bading, H.T. 1990. Determination of Free Fatty Acids in milk and cheese. *Journal of High Resolution Chromatography*, 13, 94-98.
- Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R. e Ramírez, R. 2011. Free Fatty Acids and Oxidative Changes of a Raw Goat Milk Cheese through Maturation. *Journal of Food Science*, 76, 669–673.
- Domagała, J., Sady, M., Grega, T., Pustkowiak, H. e Florkiewicz, A. 2010. The influence of cheese type and fat extraction method on the content of conjugated linoleic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 238–243.
- Esposito, G., Masucci, F., Napolitano, F., Braghieri, A., Romano, R., Manzo, N. e Francia, A.D. 2014. Fatty acid and sensory profiles of Caciocavallo cheese as affected by management system. *Journal of Dairy Science*, 97, 4.

- Fernández-García, E., Carbonel, M., Calzada, J. e Nuñez, M. 2006. Seasonal variation of the free fatty acids contents of Spanish ovine milk cheeses protected by a designation of origin: A comparative study. *International Dairy Journal*, 16, 252–261.
- Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. e McSweeney, P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Springer US, Nova Iorque, p.588.
- Geissler, C. e Powers, H. 2010. *Human Nutrition*, Churchill Livingstone Elsevier, Londres, p.748.
- Gonçalves, L.C., Borges, J. e Ferreira, P.D.S. 2009. *Alimentos para gado de leite*, FEPMZ, Belo Horizonte, p.568.
- Hübschmann, H.J. 2009. *Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications*, Wiley, Nova Iorque, p.880.
- Jelinska, M., Bialek, A., Mojska, H., Gielecinska, I. e Tokarz, A. 2014. Effect of conjugated linoleic acid mixture supplemented daily after carcinogen application on linoleic and arachidonic acid metabolites in rat serum and induced tumours. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1842, 2230-2236.
- Kim, N. S., Lee, J. H., Han, K. M., Kim, J. W., Cho, S. e Kim, J. 2014. Discrimination of commercial cheeses from fatty acid profiles and phytosterol contents obtained by GC and PCA. *Food Chemistry*, 143, 40–47.
- Kramer, J. K. G., Cruz-Hernandez, C., Deng, Z. Y., Zhou, J. Q., Jahreis, G. e Dugan, M. E. R. 2004. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 1137S–1145S.
- Lima, M.H.P., Telles, F.J.S., Macedo, B.A. e Benevides, S.D. 1998. Elaboração de Queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*: aspectos bioquímico e sensorial. *Boletim CEPPA*, 16, 37-44.
- Lin T.Y., Lin C.W. e Wang Y.J. 2003. Production of conjugated linoleic acid by enzyme extract of *Lactobacillus acidophilus*. *Food Chemistry*, 83, 27–31.
- Lucatto, J.N., Mendonça, S.N.T.G. e Drinkler, D.A. 2014. Ácido Linoleico Conjugado: estrutura química, efeitos sobre a saúde humana e análise em lácteos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 69, 199-211.
- Luna, P., Juárez, M. e De La Fuente, M. A. 2007. Conjugated linoleic acid content and isomer distribution during ripening in three varieties of cheeses protected with designation of origin. *Food Chemistry*, 103, 1465-1472.
- Mangia, N. P., Murgia, M. A., Garau, G., Sanna, M. G. e Deiana, P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25, 366–377.
- Marrone, R. Balestrieri, A., Pepe, T., Vollano, L., Murru, N., D'Occhio, M. J. e Anastasio, A. 2014. Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of “Pecorino Carmasciano” cheese, a traditional Italian dairy product. *Journal of Food Composition and Analysis*, 36, 85–89.
- Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer, J. E. L., Matshushita, M., De Souza, N. E. e Visentainer, J. V. 2006. Ácidos gordos polinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19, 761–770.
- McMaster, M.C. 2008. *GC/MS A Practical User's Guide*. Wiley-Interscience, Hoboken, 1-37.
- Medeiros, E. J. L. 2009. Utilização de óleos vegetais na alimentação de cabras leiteiras e seu efeito na qualidade do queijo “Tipo Coalho”. Dissertação (Doutoramento), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

- Mele, M., Contarini, G., Cercaci, L., Serra, A., Buccioni, A., Povolo, M., Conte, G., Funaro, A., Banni, S., Lercker, G. e Secchiari, P. 2011. Enrichment of Pecorino cheese with conjugated linoleic acid by feeding dairy ewes with extruded linseed: Effect on fatty acid and triglycerides composition and on oxidative stability. *International Dairy Journal*, 21,365–372.
- Melo D.S.F. 2014. Caracterização do perfil de ácidos gordos de queijo da Ilha do Pico em função do tempo de maturação. Dissertação (Mestrado), Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica.
- Moraes, F.P. e Colla, L.M. 2006. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 109-122.
- Naughton, S.S., Mathai, M.L., Hryciw, D.H. e McAinch, A.J. 2016. Linoleic acid and the pathogenesis of obesity. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, In Press Corrected Proof, doi:10.1016/j.prostaglandins.2016.06.003.
- Oliveira, R. L., Ladeira, M. M., Barbosa, M., Matsushita, M., Santos, G. T. e Bagaldo, A. 2009. Composição química e perfil de ácidos gordos do leite e mussarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 736–744.
- Park, Y.W. e Lee, J.H. 2006. Effect of freezing on organic acid contents and lipolytic index of plain soft and Monterey Jack goat milk cheeses. *Small Ruminant Research*, 63, 58–65.
- Perini, J. Â. D. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. D. O., Matshushita, M., Souza, N. E. e Visentainer, J. V. 2010. Ácidos gordos polinsaturados n-3 e n-6: Metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de Nutrição*, 23, 1075–1086.
- Prandini, A., Sigolo, S. e Piva, G. 2011. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 55–61.
- Queiroga, R.C.R.E., Matias, S.M.G., Santos, M.M., Barbosa, I.C., Garcia, E.F., Souza, E.L., Oliveira, C.E.V. e Sousa, H. M. H. 2009. Características físico-químicas, microbiológicas e perfil de ácidos gordos de queijos de leite de cabra comercializados. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 68, 411–418.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., Ribbera, A. e Caggia, C. 2010. Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and *flavour* compounds. *Food Microbiology*, 27, 363-374.
- Rodrigues, D., Rocha-Santos, T.P., Gomes, A. M., Goodfellow, B. J. e Freitas, A. C. 2011. Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 131,1414–1421.
- Romano, R., Giordano, A., Chianese, L., Addeo, F. e Musso, S.S. 2011. Triacylglycerols, fatty acids and conjugated linoleic acids in Italian Mozzarella di Bufala Campana cheese. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 244–249.
- Sanders, M.E. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutrition Reviews*, 61, 91-99.
- Santos, K.M.O., Bomfim, M.A.D., Vieira, A.D.S., Benevides, S.D., Saad, S.M.I., Buriti, F.C.A. e Egito, A.S. 2011. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. *International Dairy Journal*, 24, 107-112.
- Tavaria, F. K., Tavares, T. G., Silva-Ferreira, A. C. e Malcata, F. X. 2006. Contribution of coagulant and native microflora to the volatile-free fatty acid profile of an artisanal cheese. *International Dairy Journal*, 16, 886–894.
- Temiz, H., Tarakci, Z., Aykut, U. e Turhan, S. 2008. The fatty acid levels and physicochemical properties of herby brined cheese, a traditional Turkish cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 62, 56–62.

Xu, S., Boylston, T.D. e Glatz, B.A. 2005. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9064–9072.

Zengin, G., Cakmak, Y. S., Guler, G. O., Oguz, E., Aktumsek, A. e Akin, M. 2011. The effect of pasteurization temperature on the CLA content and fatty acid composition of white pickled cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 509–516.

4.1 Introdução

O queijo trata-se de um concentrado lácteo formado por proteínas, lipídios, carboidratos, sais minerais e vitaminas. Em decorrência do seu teor de proteína (23 a 25%) e do seu teor de gordura (cerca de 48%), o queijo é considerado um alimento muito nutritivo (Perry, 2004).

De um modo geral, a tecnologia de fabricação do queijo envolve as etapas de coagulação do leite, corte da coalhada, prensagem da massa, salga e embalagem. A função do coalho é provocar a coagulação das proteínas do leite, em particular das caseínas, as principais componentes da fração proteica do leite. A renina, uma enzima presente no estômago de ruminantes jovens, é considerada a principal proteína responsável por essa ação. Esta enzima é uma fosfoproteína de ação proteolítica que hidrolisa as ligações peptídicas das caseínas, em particular da k-caseína, cuja solubilidade na presença de íons cálcio é responsável pela estabilidade das micelas proteicas (Walstra, 1999). A renina e outras endopeptidases, hidrolisam as ligações peptídicas terminais da k-caseína, para dar origem a um produto hidrofóbico, (para-k-caseínas) que precipita na presença de cálcio, dando origem à coalhada (Ordoñez, 2005).

Existem dois tipos de proteínas no leite, as proteínas do soro, que se mantêm solúveis, e a caseína, que se precipita. A caseína bovina é formada por α_{s1} -caseína, α_{s2} -caseína, β -caseína e k-caseína. As α -caseínas são sensíveis ao cálcio, mas as k-caseínas mantêm-se solúveis na presença de quantidades elevadas de cálcio e contribuem para a estabilidade das estruturas micelares nas quais se encontram organizadas as diferentes caseínas (Sgarbieri, 2005).

O conhecimento das diferenças estruturais e das propriedades físico-químicas entre as várias formas de caseína e as proteínas do soro é indispensável para a compreensão do comportamento tecnológico e funcional, nutritivo e fisiológico dessas proteínas, como constituintes de alimentos (Sgarbieri, 2005).

A coagulação enzimática é dividida em duas fases. A primeira ocorre quando a caseína é quebrada na porção hidrofílica na ligação Phe105-Met106, que corresponde à proteólise em extensão (indicador da proteólise primária), que dá origem aos glicomacropéptidos solúveis em ácido tricloroacético (TCA). A segunda fase tem início quando cerca de 90% das ligações da k-caseína são quebradas, que correspondente à proteólise em profundidade ou proteólise secundária. Complementando a coagulação, a para-k-caseína ligada às α e β -caseínas, não é tão insensível à presença dos íons cálcio o que provoca uma desestabilização com agregação e consequente precipitação da micela.

A proteólise é um evento considerado essencial para o desenvolvimento da textura e do *flavour*, associado a um conjunto de reações mais complexo. O processo de catabolismo das proteínas tem início na conversão das frações da caseína em peptídeos de cadeia longa, que são em seguida

degradadas em peptídeos e aminoácidos livres. Essas reações são realizadas por várias enzimas como cardosinas, proteases presentes no leite naturalmente e polipeptidases de bactérias presentes no leite.

Como produtos resultantes da proteólise, os aminoácidos formados encontram-se na fração não volátil, solúvel em água. Eles são importantes no desenvolvimento do *flavour* e do aroma, como precursores na formação de outros compostos voláteis. Além disso, as bactérias utilizam esses aminoácidos na síntese de proteínas, como fonte de energia, para formar co-sustratos e para biossíntese.

A importância das bactérias lácticas na formação do *flavour* nos queijos depende das enzimas expressas por essas bactérias, da combinação de bactérias existentes no queijo e do catabolismo da metionina, dos aminoácidos aromáticos e dos aminoácidos de cadeia ramificada. As aminotransferases das bactérias lácticas são responsáveis pela via metabólica mais importante para o catabolismo dos aminoácidos, com a remoção do grupo amina dos aminoácidos aromáticos e de cadeia ramificada (Martins, 2006).

O papel da caseína no leite é altamente aceito como sendo fonte de aminoácidos requeridos para recém-nascidos (Silva e Malcata, 2005).

A maturação é um processo que altera a composição química dos queijos, em especial quanto aos seus teores de carboidratos, proteínas e lipídios. Este processo envolve várias transformações físicas, bioquímicas e microbiológicas, que ocorrem em todos os queijos, com exceção dos consumidos frescos. O processo de maturação deve ocorrer em câmaras apropriadas, com condições específicas de temperatura e humidade e por tempo variável, de acordo com o tipo de queijo (Perry, 2004).

O processo de degradação das proteínas, ou proteólise, é considerado o principal processo que ocorre na maturação, contribuindo fortemente para o sabor e consistência dos queijos. Os aminoácidos e peptídeos libertados são também precursores de compostos voláteis, responsáveis pelo aroma característico deste produto (Perry, 2004).

As bactérias ácido lácticas (BAL), que estão presentes em todos os tipos de queijos, são conhecidas por desempenharem um papel importante na geração de pequenos peptídeos e aminoácidos que por ação de outras enzimas são convertidos em compostos mais voláteis tais como aldeídos, ácidos, álcoois, ésteres e tióis. (Gorostiza, 2004).

Além dos aminoácidos também os ácidos gordos e os ácidos orgânicos, estão envolvidos em reações que originam derivados responsáveis pelo sabor e aroma dos queijos.

Os processos que ocorrem nos queijos durante a maturação podem variar de acordo com o tipo de processamento do queijo e com os microrganismos nele presentes. Esses processos podem ocorrer na casca e bem como no interior da massa dos queijos e dão origem a uma diversidade de compostos tais como amónia, aminas, álcoois, aldeídos e ácidos carboxílicos de cadeia curta como o ácido capríco ou o ácido 3-metilbutírico (Perry, 2004).

O esquema geral da degradação dos aminoácidos nos queijos durante o processo de maturação pode ser visto no esquema de Perry (2004), com adaptações (Figura 4.1):

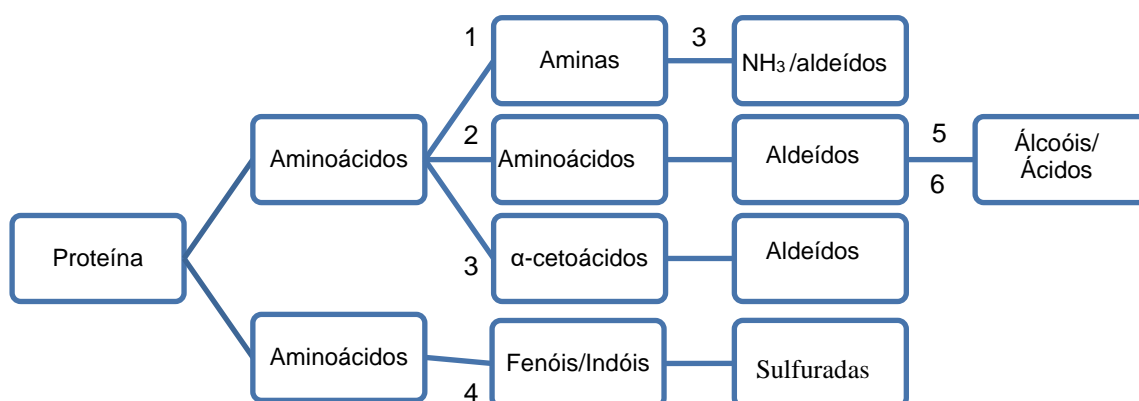


Figura 4.1: Proteólise e degradação dos aminoácidos decorrentes da ação microbiana durante a maturação de queijos: 1-descarboxilação; 2-transaminações; 3-desaminações oxidativas; 4-degradações; 5-reduções; 6-oxidações.

Neste sentido, Subramanian (2011) relacionou os níveis de aminoácidos e também dos ácidos orgânicos com a idade dos queijos, encontrando compostos como ácido lático, leucina, ácido glutâmico, asparagina, fenilalanina, valina em concentrações significativamente elevadas. Este autor ainda destacou que, durante o metabolismo dos queijos, compostos responsáveis pelo sabor como ácidos gordos livres, ácidos orgânicos e aminoácidos são os primeiros a serem metabolizados, originando produtos voláteis e não voláteis.

Mangia (2008), por exemplo, relatou a influência das BAL selecionadas sobre as características microbiológicas e físico-químicas durante o período de maturação do queijo Fiore Sardo, em particular, a evolução de aminoácidos livres (FAAS), ácidos gordos livres (FFAs) e da microflora do queijo.

Helinck (2004), pesquisando sobre BAL termofílicas e compostos aromáticos relatou associação *in vitro* de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus* na produção de compostos que contribuem com o aroma a partir de três aminoácidos, leucina, fenilalanina e metionina.

Alguns alimentos contêm substâncias que apresentam para além de uma função nutricional básica, efeitos positivos na saúde do consumidor como antioxidante, hipotensivo e hipocolesterolemico. De entre estas substâncias encontram-se os aminoácidos livres (Diana, 2014).

A capacidade das BAL e outros microrganismos presentes no queijo em degradar aminoácidos para originar componentes do aroma do queijo é altamente dependente das estirpes que compõem a microbiota de cada queijo. Geralmente, o catabolismo dos aminoácidos ocorre por duas vias diferentes que envolvem reações de eliminação e de transaminação. A primeira, observada em aminoácidos sulfurados como a metionina, envolve a eliminação dos grupos funcionais que contêm o átomo de enxofre e traduz-se num aumento dos níveis de componentes sulfurados do aroma. A segunda via é geralmente iniciada pela reação de transaminação e degradação de todos os aminoácidos pelas BAL. A presença das enzimas iniciadoras de ambas as vias, tem sido bem caracterizada em lactococos e a sua importância tem sido evidenciada na formação dos componentes do aroma (Yvon e Rijnen, 2001).

Smit *et al.* (2000) constataram que o equilíbrio entre a proteólise e a peptidiólise previne a formação de sabor amargo nos queijos. Estes autores também observaram que a produção dos componentes responsáveis pelo sabor é altamente dependente das estirpes envolvidas de entre as bactérias lactocócicas possíveis.

Durante a proteólise as proteínas são degradadas em produtos primários (polipéptidos), produtos secundários (oligopéptidos) e eventualmente aminoácidos livres. Certos FAAs são extremamente importantes no desenvolvimento do sabor: por exemplo, a arginina está relacionada com o sabor a gordura, enquanto a prolina, a serina e a asparagina estão relacionadas com o sabor doce (Tavaria *et al.*, 2003).

Kabelová e colaboradores (2009) avaliaram o conteúdo de aminoácidos livres em 25 amostras de queijos comercializados na República Checa e identificaram um total de dezasseis aminoácidos livres, presentes em concentrações que variaram de 23 a 160 g/Kg. Estes autores observaram diferenças no perfil de aminoácidos totais e aminoácidos livres, que pode ser influenciado pela duração e intensidade da proteólise. Dos aminoácidos livres, sete encontravam-se mais concentrados em todos os queijos: leucina, lisina e fenilalanina (aminoácidos de sabor amargo); prolina e valina (aminoácidos adocicados); e ácidos glutâmico e aspártico (aminoácidos levemente salgados).

Vicente *et al.*, (2001) avaliaram a influência do uso de culturas iniciadoras e do tipo de coalho utilizado sobre o conteúdo em aminoácidos livres do queijo Idiazabal, produzido em Espanha a partir de leite de ovelha cru. Foram identificados 24 aminoácidos livres, dos quais a leucina, o ácido glutâmico, a valina e a fenilalanina foram os que estavam presentes em maior concentração. Os resultados indicaram que o perfil de aminoácidos livres e a sua concentração são fortemente afetados pela adição de cultura iniciadora e pelo uso de coalho comercial, durante a maturação.

Garcia-Palmer *et al.* (1997), analisaram o perfil de aminoácidos livres em queijos Mahón maturados, fabricados com leite de vaca, cru ou pasteurizado. As concentrações dos aminoácidos livres determinadas por HPLC, apresentaram um elevado coeficiente de correlação com o tempo de maturação dos queijos. Os mesmos autores observaram diferenças no perfil de aminoácidos livres: lisina, treonina, valina, metionina, glutamato e fenilalanina foram encontrados nos queijos fabricados com leite pasteurizado enquanto nos queijos fabricados com leite cru predominaram os aminoácidos alanina, valina, leucina, glutamato, isoleucina e lisina.

Gorostiza *et al.* (2004), avaliaram os compostos azotados e os aminoácidos livres de queijo Prato artesanal, fabricado no Brasil. Quanto aos aminoácidos livres, observaram que os aminoácidos asparagina e glutamina apresentaram baixas concentrações nos queijos, o que pode ser devido ao aquecimento do leite ou pasteurização que diminui a atividade das enzimas asparaginase e glutaminase. Esta característica pode constituir um fator de controlo de qualidade, monitorizando o conteúdo da asparagina no leite como um indicador de que ele tenha sido pasteurizado. No mesmo sentido, foi observado que o conteúdo de serina foi maior nos queijos feitos com leite pasteurizado, devido à desnaturação das enzimas responsáveis pela sua degradação. Em contrapartida, o conteúdo de ácido aspártico foi maior nos queijos produzidos com leite cru.

Papa e Sotirakoglou (2008) avaliaram a concentração de aminoácidos livres no queijo Teleme, um queijo fresco, branco, conservado em salmoura, produzido na Grécia, a partir de leite de vaca, de cabra

ou de ovelha, com adição de cultura termofílica, mesofílica ou uma mistura das duas. Estes autores observaram que o conteúdo dos FAAs foi maior nos queijos fabricados com leite de vaca e de ovelha; verificaram também que as concentrações de FAAs foram mais elevadas nos queijos fabricados com cultura termofílica do que nos produzidos com culturas mesofílicas e que os queijos fabricados com a mistura das duas culturas, termofílica-mesofílica, apresentaram níveis intermédios de FAAs. Este estudo também revelou que leucina, glutamato, fenilalanina, valina e lisina foram os aminoácidos encontrados em maior quantidade em todos os estágios de maturação deste queijo, independentemente do tipo do leite e da cultura utilizada.

Sardella *et al.* (2013), identificaram o perfil de aminoácidos livres e a sua razão enantiomérica, como parâmetros de importância prioritária para o controlo de qualidade de géneros alimentícios. Frequentemente a presença dos FAAs é utilizada como um indicador da qualidade alimentar, e podem ser indicadores da contaminação por microrganismos, uma vez que a alanina, o glutamato e o aspartato são encontrados na parede de peptidoglicano das bactérias. Aspectos benéficos do ponto de vista nutricional e nutracêutico foram também descritos para alguns aminoácidos, sugerindo o seu uso potencial como componentes de alimentos funcionais (Friedman e Levin, 2012).

Diana *et al.* (2014) analisaram o perfil de aminoácidos livres de amostras de queijos artesanais de Espanha, através de HPLC, e obtiveram concentrações de aminoácidos livres entre 0,19 e 67,95 g/kg. Todas as amostras analisadas apresentaram um elevado teor de glutamato, o que pode ser devido a uma elevada percentagem destes aminoácidos na caseína; os autores registaram também quantidades relevantes de glutamina, valina, leucina e isoleucina, enquanto a arginina foi o aminoácido menos abundante.

Segundo Lee *et al.* (1990) muitos estudos descreveram a atividade proteolítica das BAL durante a maturação do queijo e os perfis de peptídeos de cadeia curta e FAAs, que resultam desta atividade.

A libertação destes componentes (FAAs e peptídeos) é ainda significativamente influenciada pelo teor de sal do queijo. O sal (NaCl) pode inibir a multiplicação e a atividade enzimática das BAL, sobretudo no início do período de maturação. Uma concentração elevada de sal também afeta a atividade da água, ocorrendo uma redução das moléculas de água disponíveis para interagir com as proteínas, o que limita a hidrólise das ligações peptídicas e consequente libertação dos FAAs. Outros fatores que contribuem para a libertação dos FAAs são o pH e a temperatura de armazenamento. Pinho *et al.* (2001) mostrou que o conteúdo de FAAs, especialmente de valina e leucina, aumentaram quando as temperaturas de armazenamento foram mais elevadas. Neste sentido, a valina e leucina podem servir como indicadores das condições de temperatura utilizadas durante a maturação dos queijos.

Tavaria *et al.* (2003) avaliaram amostras de queijo Serra da Estrela, Portugal, com diferentes tempos de maturação e determinaram o conteúdo de: FAAs, azoto total (TN), azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN) e azoto solúvel em ácido fosfotungsténico (PTASN). O conteúdo de azoto solúvel em água aumentou de 1% para 43% após 180 dias de maturação, refletindo a intensa atividade proteolítica das enzimas presentes nos queijos, representando os aminoácidos glutamina, valina, leucina e lisina, 56 a 70% do total dos FAAs.

Segundo Dias (2010), durante a fabricação do queijo a fermentação realizada pelas bactérias ácido-lácticas presentes como biotipos ou adicionadas como culturas iniciadoras, aumenta a diversidade de compostos relacionados com o aroma e o sabor dos queijos artesanais.

A metionina, os aminoácidos aromáticos e os aminoácidos de cadeia curta são os maiores precursores dos componentes voláteis responsáveis pelo aroma do queijo (Kranenburg *et al.*, 2002). Os componentes do sabor são formados através de vários processos, cujos substratos são a lactose, o citrato, os lípidos e a caseína. A lipólise conduz à formação de ácidos gordos livres que podem ser precursores de componentes de sabor como metilcetonas, álcoois, lactonas e ésteres. A proteólise é o processo bioquímico mais importante na formação do sabor e da textura nos queijos duros e meio-duros. O equilíbrio entre estes diferentes processos é determinante na definição das características organolépticas dos queijos (Kranenburg *et al.*, 2002).

Alguns autores isolaram e quantificaram os aminoácidos presentes em alguns queijos, conforme se encontra registado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Referências e concentração dos aminoácidos livres isolados de queijos de vários países.

AMINOÁCIDOS		Mangia 2008	Körös 2008	Gorostiza 2004	Subramaniam 2011	Eleni <i>et al.</i> , 2008	Tavaria <i>et al.</i> 2003	Buňka 2009	Ordoñez 1999	Bertolino 2011
		mg/100g	10-2g/100g	mg/100g	nmol/g	mg/100g	mg/100g	g/kg	mg/100g	mg/g
Ala	Alanina	5,58	3,13	15,6	4,3	0,2	2,59	5,62	8,7	1,2
Arg	Arginina		16,34	12,7	3,7	14,8		7,73	0,6	0,02
Asn	Asparagina	1	19,16	13,2		3,4	3,08			
Asp	Aspartato	1,85	2,88	22,1	3,2	3	1,09	14,11	3,1	0,74
Cys	Cisteína			21		2,7	6,97		0,6	0,32
Gln	Glutamina	4,62	32,68	14,6	0,6	15	3,18			
Glu	Glutamato	6,14		39,7	14	16,7	14,5	42,75	9,3	3,8
Gly	Glicina	0,58	1,79	5,23	0,5	6,1	2,22	3,61	1,1	0,32
Hys	Histidina	1,47		4,4	1	19,7	3,63	6,21	0,6	1,82
Ile	Isoleucina	3,12	17,59	5,46		4,6	0,29	9,33	3,2	0,7
Leu	Leucina	11,42	2,21	39,1	8,1	32,8	30,82	17,28	26,3	4,6
Lys	Lisina	6,25	9,68	23,9	5,8	14,6	7,04	15,26	5,1	1,66
Met	Metionina	4,2	17,39	4,85	0,3	13,9	1,92		2,8	0,8
Phe	Fenilalanina	5,78	63,64	25,2	4,9	24,4	6,44	9,66	8	3,35
Pro	Prolina	5,21	8,3	13,2	6,5	6,8	5,15	23,87	1,5	1,03
Ser	Serina	0,94	9,65	11,6	0,1	8,8	0,51	11,79	1,5	0,45
Tau	Taurina			80,11		3,3	3,78		0,8	
Thr	Treonina	1,49	2,36	9,98		24,4		8,1	2,1	0,55
Trp	Triptofano	0,31		31,4	0,02	3,7	15,75		0,5	
Tyr	Tirosina	2,25	6,6	7,23	2,1	16,1	14,98	10,78		0,56
Val	Valina	9,64	2,8	14,2	3,7	52,3	17,63	12,78	23,1	1,76
TF A	AAL Totais	76,31	219,4	415			154,56			23,7

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Amostragem

A recolha das vinte e oito amostras do Queijo de Coalho artesanal da Mesorregião do Sertão Paraibano foi efetuada como descrito nos capítulos anteriores.

As amostras destinadas à determinação de aminoácidos foram transportadas, congeladas e acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo para o Laboratório de Química do Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa (DCTB) da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (FCT-UNL), Lisboa, Portugal.

Antes de ser proceder à análise de aminoácidos as amostras foram cortadas finamente e homogeneizadas.

4.2.2 Extração dos aminoácidos livres

A metodologia de extração dos aminoácidos foi adaptada dos métodos descritos no *Laboratory Manual For Chemical Analysis Of Cheese*, publicado pela Comissão Europeia no âmbito do programa COST 95 Improvement of the quality of the production of raw milk cheeses (Ardö e Polychroniadou, 1999).

De cada amostra de queijo previamente homogeneizada foi retirada uma sub-amostra de 10 g que foi homogeneizada com 50 mL de água destilada previamente aquecida a 50 °C. A mistura foi colocada sob agitação à temperatura de 40 °C por um período de 1 h; posteriormente procedeu-se à sua filtração por papel de filtro (Whatman, Grau 1); o resíduo sólido foi descartado e o filtrado foi armazenado a 4°C durante cerca de 12h. . De seguida, o filtrado foi centrifugado a 3000g por 20 min (e o sobrenadante foi filtrado por papel de filtro (Whatman, Grau 1) e o volume foi aferido a 50 mL. Este extrato foi designado como WSN (water soluble nitrogen) e contém os componentes azotados solúveis em água ou seja, aminoácidos,peptídeos e algumas proteínas.

Uma alíquota de 5 mL desta fração (WSN) foi misturada com 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 24% (w/v), homogeneizou-se e deixou-se em repouso à temperatura ambiente durante 2 h, para promover a desnaturação e precipitação de componentes proteicos poliméricos. A mistura foi ainda refrigerada a 4°C durante 1h, após o que se filtrou para eliminar materiais precipitados (Whatman Grau 1). Este extrato foi designado como NS-TCA (nitrogen soluble in trichloroacetic acid), e deverá conter apenas os aminoácidos livres e peptídeos de muito baixo peso molecular. Esta solução foi utilizada na análise cromatográfica por HPLC por eletrodetector (ECD).

4.2.3 Determinação de aminoácidos livres por cromatografia iónica

O perfil de aminoácidos foi determinado por injeção dos extratos NS-TCA, sem diluição, num cromatógrafo líquido de alta eficiência (DIONEX ICS3000) equipado com uma coluna AminopacPA10

4x250 mm e um detector electroquímico. A coluna foi termostatzada a 30°C e o volume de injeção foi de 25µL.

Utilizaram-se como eluentes água ultrapura, hidróxido de sódio (250 mM) e acetato de sódio (100 mM), e otimizou-se o gradiente de forma a maximizar a separação cromatográfica mas mantendo o fluxo total em 1 mL/min. Os extratos de aminoácidos livres foram analisados tal como entregues. Padrões dos aminoácidos individuais foram preparados em 12% TCA e foram injetados nas mesmas condições cromatográficas que as utilizadas para as amostras, para confirmar a identidade de cada aminoácido e a sua ordem de eluição.

Foram construídas rectas de calibração para cada aminoácido, por injeção de um conjunto de seis soluções padrão obtidas por diluição de uma mistura padrão de 18 aminoácidos (AAS18 Sigma-Aldrich), contendo L-alanina, cloreto de amónio, L-arginine, ácido L-aspártico, L-cistina, ácido L-glutâmico, glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-threonina, L-tyrosina e L-valina, numa concentração individual de 2,5 µmoles/ mL.

4.3 Resultados e discussão

A separação cromatográfica dos 15 aminoácidos selecionados não foi completa nesta coluna cromatográfica, tendo-se observado as co-eluições da serina com a prolina e co-eluições parciais da alanina e glicina com a treonina e da isoleucina com a leucina (Figura 4.2).

As tentativas de resolver as co-eluições modificando o gradiente de eluição não tiveram sucesso, pois ainda que melhorassem a resolução de alguns pares de aminoácidos prejudicaram a separação cromatográfica de outros.

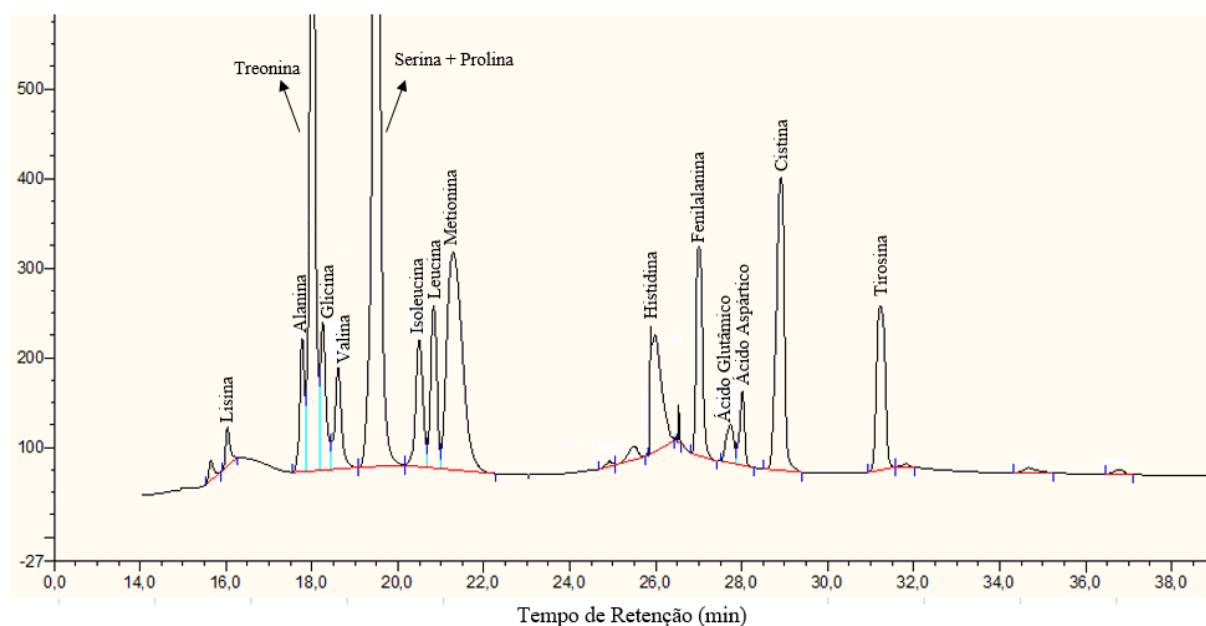


Figura 4.2: Perfil de padrões cromatográficos utilizados na avaliação das concentrações de aminoácidos livres por HPLC com deteção electroquímica

Apesar da separação incompleta, efetuou-se o traçado das retas de calibração de forma a poder realizar uma avaliação quantitativa para os aminoácidos separados na linha de base e semi-quantitativa para os aminoácidos que apresentaram co-eluição parcial.

Os tempos de retenção médios bem como as equações das retas de calibração e os respetivos coeficientes de determinação (R^2), são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Ordem de eluição dos aminoácidos estudados e retas de calibração utilizadas na determinação da sua concentração.

Aminoácido	Janelas de Retenção		Equação da reta	Coeficiente de determinação (R^2)
	Média	Desvio-Padrão		
Lisina	16,04	0,04	$y = 6,6945x - 0,0264$	0,990
Alanina	17,76	0,02	$y = 1,0391x - 2,0219$	0,988
Treonina	17,99	0,02	$y = 0,1875x - 1,0515$	0,999
Glicina	18,24	0,02	$y = 0,8102x - 4,7312$	0,995
Valina	18,59	0,02	$y = 1,3651x - 3,8409$	0,993
Serina+Prolina	20,48	0,02	$y = 0,2388x - 2,8788$	0,997
Isoleucina	20,80	0,03	$y = 1,0359x - 1,0636$	0,994
Leucina	21,24	0,03	$y = 0,9415x - 1,3024$	0,992
Metionina	26,99	0,03	$y = 0,3739x - 1,975$	0,993
Fenilalanina	27,73	0,02	$y = 1,0797x - 8,4916$	0,992
Ác. Glutâmico	28,01	0,02	$y = 4,467x - 1,0041$	0,994
Ác. Aspártico	28,90	0,03	$y = 2,9187x - 1,0371$	0,998
Cistina	31,22	0,03	$y = 0,3144x - 2,3852$	0,993
Tirosina	16,04	0,04	$y = 0,7845x - 5,3659$	0,980

Apesar das limitações da coluna cromatográfica utilizada e que se traduzem em diferenças de tempos de retenção inferiores a 0,5 minutos, o desvio-padrão do tempo de retenção foi inferior às diferenças entre médias, o que permite efetuar a sua integração independente, desde que a sua concentração seja muito elevada. Na gama de concentrações utilizada foi possível obter retas de calibração com coeficientes de determinação elevados, pelo que, no que diz respeito aos padrões, o método permite efetuar uma avaliação quantitativa dos aminoácidos considerados exceto aqueles que apresentam co-eluição total.

Na separação de amostras reais surgiram alguns problemas adicionais devido à presença de alguns interferentes provenientes da matriz e que incluíam pequenos peptídeos, monossacarídeos ou dissacarídeos. Estes componentes não são facilmente elimináveis pois apresentam propriedades físico-químicas e cromatográficas muito semelhantes aos aminoácidos e podem interferir na análise de aminoácidos quando as amostras são muito diluídas (Figura 4.3).

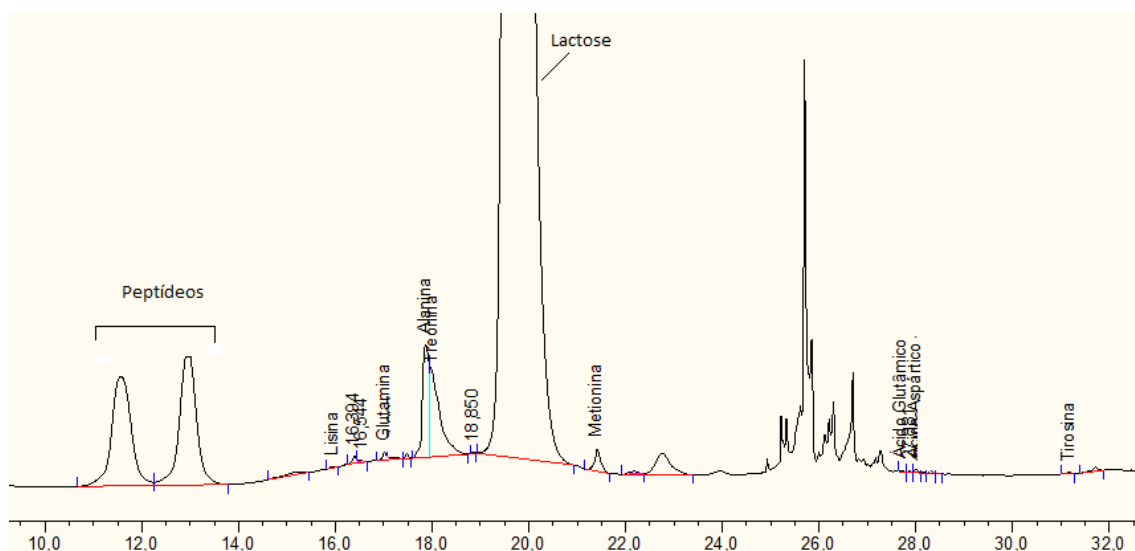


Figura 4.3: Perfil cromatográfico da amostra R2A1, no qual se identificam possíveis interferentes

Como se pode ver na Figura 4.3, a lactose é um interferente indesejável nesta determinação pois co-elui de forma quase total com a leucina e a isoleucina. Uma possibilidade de o eliminar é promover a hidrólise da lactose, mas esse processo pode conduzir à isomerização ou degradação dos aminoácidos componentes do perfil e teria que ser otimizado para prevenir essas reações secundárias. Os aminoácidos mais afetados pela presença da lactose são a leucina e isoleucina.

Estas interferências não foram uniformes entre as várias amostras, mas quando ocorreram não foi possível quantificar o aminoácido afetado. Assim, os resultados apresentados neste capítulo têm um caráter semi-quantitativo, pois não foi possível obter resultados para estes 15 aminoácidos em todas as amostras e, portanto, não será efetuado o tratamento estatístico utilizado nos restantes capítulos.

As concentrações relativamente baixas dos aminoácidos livres encontradas nas amostras de queijo resultam também de se tratarem de queijos frescos ou com um tempo de maturação inferior a 10 dias. Diana e colaboradores (2014) pesquisando o perfil de aminoácidos livres em amostras de queijos comercializados na Espanha, encontraram concentrações baixas para os aminoácidos livres nas amostras de queijos frescos de leite de vaca.

A proteólise, que resulta na liberação de aminoácidos e peptídeos, ocorre por ação de enzimas e agentes coagulantes presentes no leite, bem como por ação de enzimas microbianas, produzidas pelas bactérias ácido lácticas que proliferam durante a maturação do queijo (Bezerra, 2015). Como o Queijo de Coalho é um queijo fresco, com no máximo até 10 dias de fabricação, a proteólise que ocorre neste queijo é a primária, resultante da ação das enzimas endógenas, presentes no leite e no coalho utilizado durante o processamento. A proteólise primária resulta principalmente na degradação da caseína e liberação de polipeptídeos, enquanto a proteólise secundária resulta na liberação de peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos (Bontinis *et al.*, 2012).

Estas características do Queijo de Coalho explicam algumas das dificuldades encontradas nesta análise, pois não só a concentração de aminoácidos livres é baixa como existem no meio diversos peptídeos de baixo peso molecular que pela sua polaridade são solúveis no ácido tricloroacético persistindo no extrato como interferentes.

Dos 15 aminoácidos identificados no padrão cromatográfico só foram encontrados nas amostras 13 aminoácidos, não tendo sido detetadas a serina e a prolina. Em contrapartida, foram detetados 3 aminoácidos adicionais, cuja identidade foi confirmada por comparação com padrões injetados, mas para os quais não foi possível traçar uma reta de calibração com o padrão correspondente. Estes aminoácidos foram a glutamina, a histidina e o triptofano, que foram quantificados recorrendo à reta de calibração da leucina, ou seja, as suas concentrações são apresentadas em equivalentes de leucina.

Dos aminoácidos identificados no perfil de aminoácidos livres, nove são considerados aminoácidos essenciais com destaque para alguns que aparecem em todos os queijos como, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, triptofano e valina. A concentração dos aminoácidos identificados nas amostras de Queijo de Coalho produzido na Paraíba está representada em dois grupos, em função das amostras individuais, conforme as Figuras 4.4 e 4.5.

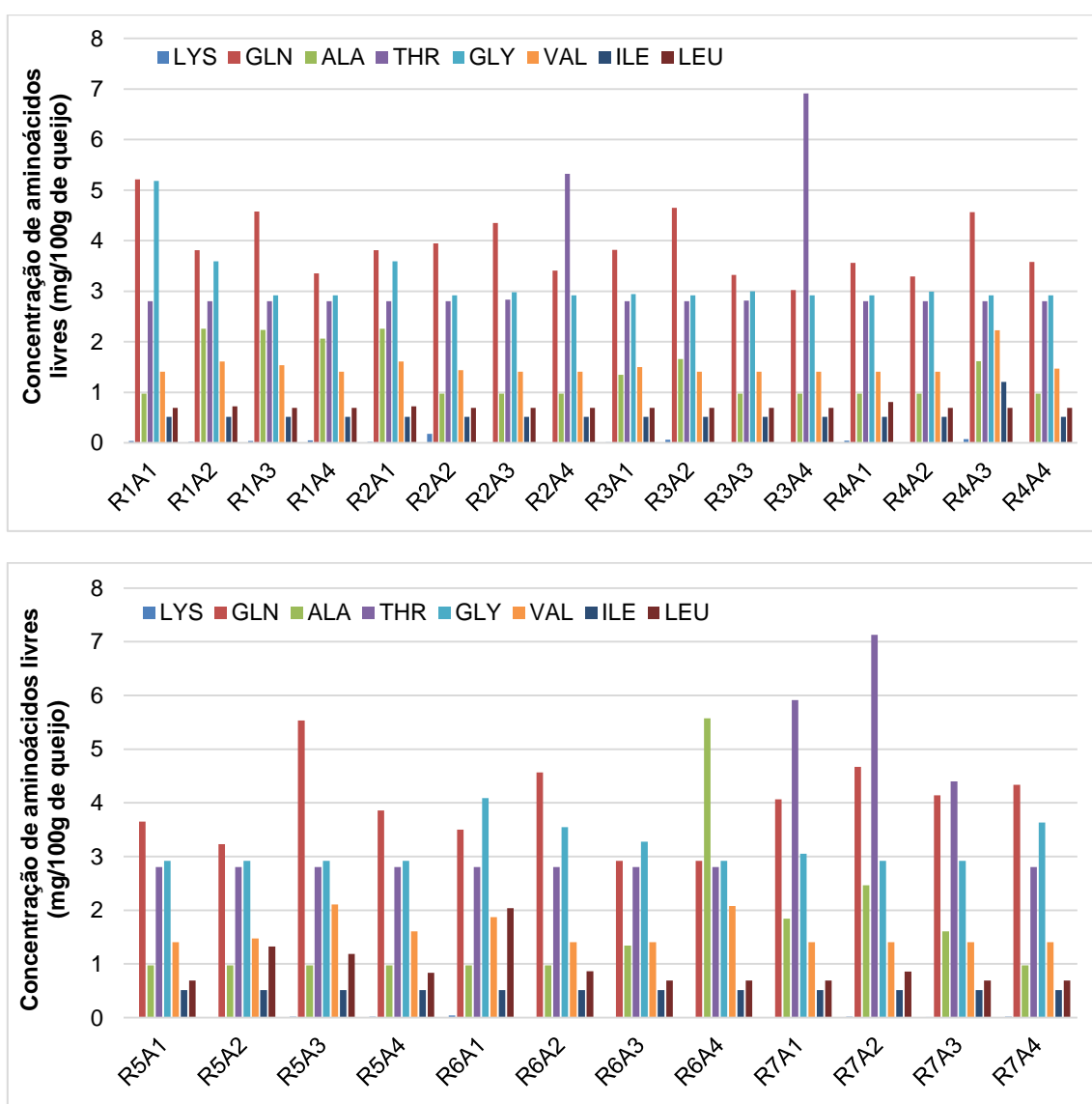


Figura 4 4: Concentrações dos aminoácidos lisina, glutamina, alanina, treonina, glicina, valina, isoleucina e leucina, nas amostras individuais dos Queijos de Coalho produzido na Paraíba, Brasil.

Os aminoácidos detetados em concentrações mais elevadas foram a metionina, a fenilalanina, a glutamina, a cisteína, a tirosina, a treonina e a glicina. Esta observação está de acordo com a predominância da metionina, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) e aminoácidos de cadeia curta (glicina, treonina).

As concentrações de lisina, glutamina, alanina, treonina, glicina, valina, isoleucina e leucina em queijos das diferentes regiões são apresentadas na Figura 4.4. Observam-se concentrações particularmente elevadas de treonina nos queijos R3A4, R7A1, R7A2 e R7A3 e níveis elevados de glutamina e glicina em queijos de diferentes regiões. A alanina foi detetada numa concentração superior a 5 mg/100g de queijo apenas no queijo R6A4.

Deste grupo de aminoácidos, todos foram identificados em todas as amostras de queijo com concentrações variáveis, com exceção da lisina que foi identificada em concentrações vestigiais e apenas nos queijos: R1A4, R2A2, R3A2, R4A1 e R4A3.

A concentração relativamente elevada de glutamina que aparece na maior parte das amostras, com exceção, R3A4, R6A1, R6A4, R7A1, R7A2 e R7A3 pode ser justificada pelo processo de formação da glutamina, que ocorre através da aminação do ácido glutâmico, que pode ser realizado por microrganismos presentes nas amostras de queijo. As bactérias fixadoras de azoto promovem a conversão de ácido aspártico em asparagina em condições anaeróbias e o mesmo poderá ocorrer no queijo obtendo-se glutamina a partir de ácido glutâmico (Hui *et al.*, 2005).

Resultado similar para a lisina foi encontrado por Vicente e colaboradores (2001) pesquisando sobre a influência dos tipos de coalho e culturas iniciadoras no perfil de aminoácidos livres no queijo Idiazabal.

A Figura 4.5 apresenta a concentração dos aminoácidos livres metionina, histidina, fenilalanina, glutamato, aspartato, cisteína, tirosina e triptofano nas amostras de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, Brasil.

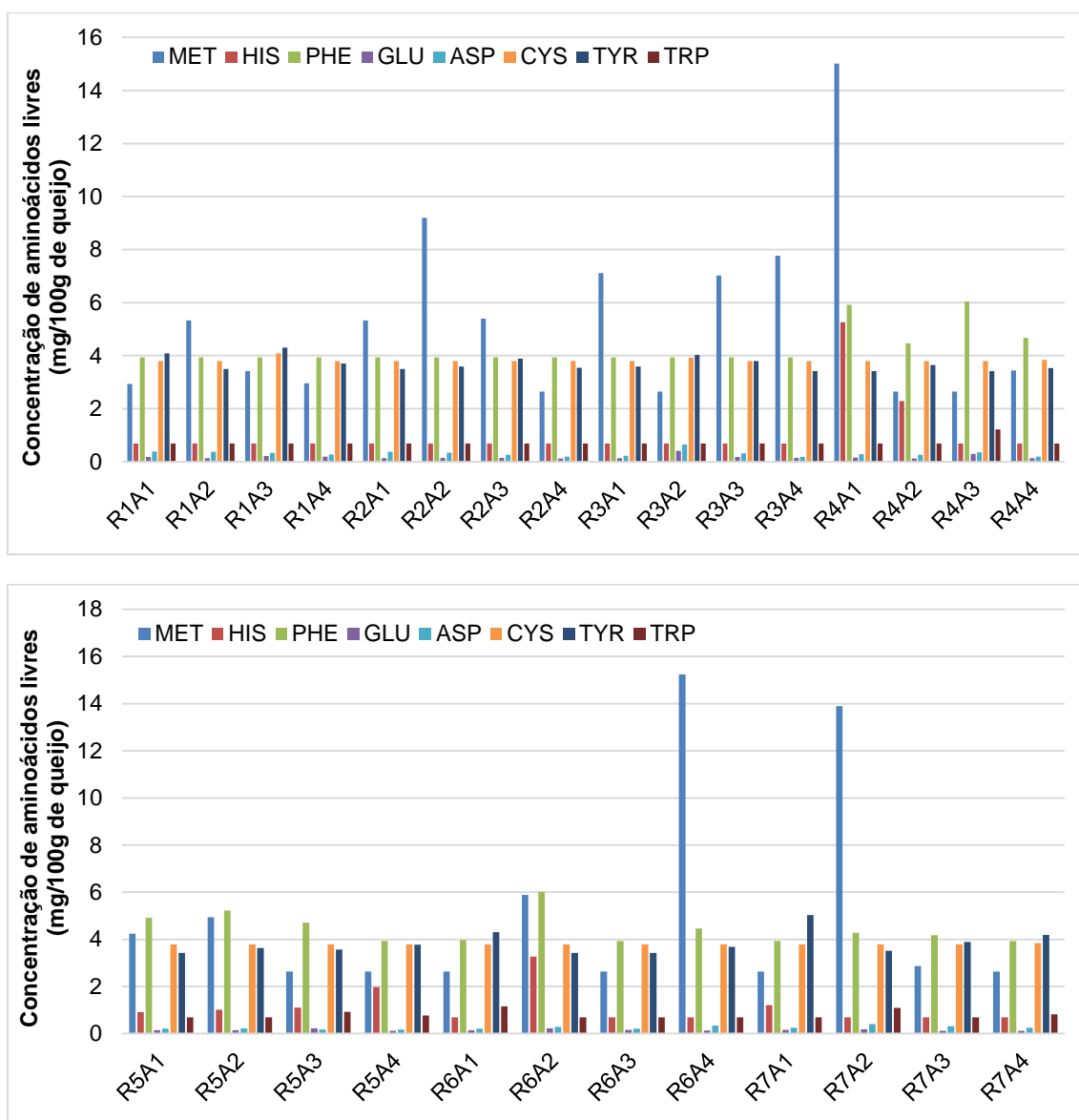


Figura 4.5: Concentrações dos aminoácidos metionina, histidina, fenilalanina, ácido glutâmico, ácido aspártico, cisteína, tirosina e triptofano, nos queijos das diferentes microrregiões.

Deste grupo de aminoácidos o mais predominante é a metionina, que aparece em concentrações elevadas nas amostras de Queijo de Coalho, especialmente nas amostras R4A1, R6A4 e R7A2 (> 13 mg/100g de queijo) e nas amostras R2A2, R3A3 e R3A1 (> 6 mg/100g de queijo) o que poderá estar relacionado com o seu tempo de maturação (entre 02 e 05 dias) ou com a natureza da microbiota nelas existente. Além da metionina, também foram identificadas concentrações elevadas de fenilalanina, cisteína e tirosina.

Vários fatores podem interferir na quantidade de aminoácidos livres em queijo, como tempo de maturação e tipo de cultura iniciadora, especificamente algumas espécies de microrganismos (Bezerra, 2015; Vicente *et al.*, 2001). Além desses parâmetros, outros fatores como pH e o teor de sal também influenciam as reações proteicas, nomeadamente a libertação de aminoácidos, em virtude da redução do teor de água livre (Diana *et al.*, 2014).

A Figura 4.6 apresenta as concentrações dos aminoácidos livres agrupados identificados nas amostras de Queijo de Coalho por região.

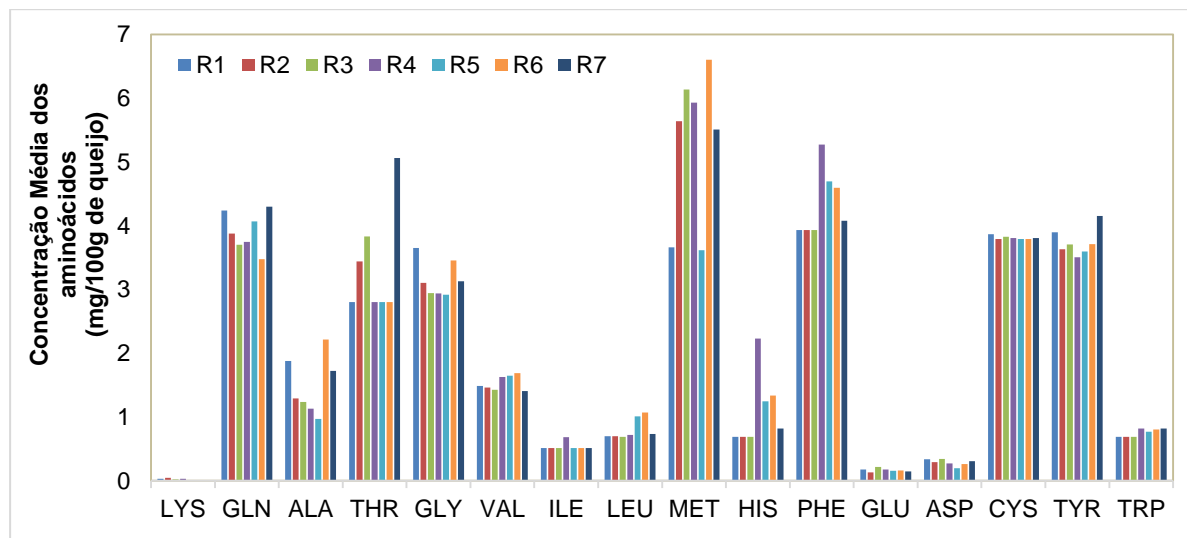


Figura 4.6: Concentrações médias dos aminoácidos livres identificados nos Queijos de Coalho produzidos nas mesmas microrregiões.

O perfil dos aminoácidos livres distribuídos nas sete microrregiões do Sertão da Paraíba apresenta uma predominância dos mesmos aminoácidos livres identificados para os queijos individuais, ou seja, a metionina, a fenilalanina, a glutamina, a cisteína, a tirosina, a treonina e a glicina. A metionina é o aminoácido com concentração média mais alta nos queijos da maior parte das regiões, o que confirma a sua importância, destacada no processo de proteólise e na função de componente importante na definição do aroma e sabor do queijo.

As regiões 6 e 7 destacam-se pelas concentrações médias elevadas de aminoácidos livres o que poderá resultar das características específicas dos microrganismos predominantes nos queijos dessas regiões, das enzimas presentes no leite, do processamento do queijo, da composição físico-química do queijo, que podem interferir no processo de proteólise da caseína e na liberação dos aminoácidos livres.

4.4 Conclusões

Diante dos resultados apresentados para o perfil de aminoácidos livres identificados nas amostras de Queijo de Coalho produzido na Paraíba, pode-se concluir que:

- Foram identificados 15 aminoácidos livres, tendo-se observado as co-eluições da serina com a prolina e co-eluições parciais da alanina e glicina com a treonina e da isoleucina com a leucina;
- Este perfil representa uma avaliação quantitativa para os aminoácidos livres separados na linha de base e semi-quantitativa para os aminoácidos livres que apresentaram co-eluição parcial;

- Sendo o Queijo de Coalho um queijo fresco com maturação inferior a 10 dias, foram identificadas concentrações relativamente baixas dos aminoácidos livres;
- Dos 15 aminoácidos identificados nesta pesquisa, oito, considerados aminoácidos essenciais, como fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, treonina, triptofano e valina foram identificados em todas as amostras;
- Os aminoácidos livres identificados em concentrações mais elevadas foram a metionina, a fenilalanina, a glutamina, a cisteína, a tirosina, a treonina e a glicina, destacando-se a metionina como o aminoácido predominante deste grupo;
- As regiões 6 e 7 (Itaporanga e Serra do Teixeira) destacaram-se pela maior concentração de aminoácidos livres quando comparadas com as restantes, o que indica uma maior taxa de proteólise e, portanto, características distintas nos queijos destas regiões.

Referências

- Ardö, Y. e Polychroniadou, A. 1999. Laboratory manual for chemical analysis of cheese. *Cost 95, European Commission*, p.123.
- Bertolino, M., Dolci, P., Giordano, M., Rolle, L. e Zeppa, G. 2011. Evolution of chemico-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry*, 129, 1001-1011.
- Bezerra, T.K.A. 2015. Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em Queijo de Coalho caprino adicionado de bactérias lácticas probióticas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- Bontinis, T.G., Mallatou, H., Pappa, E.C., Massaouras, T.H. e Auchanidis, E. 2012. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. *Small Ruminant Research*, 105, 193-201.
- Buňka, F., Kríz, O., Velicková, A., Bunková, L. e Krácmár, S. 2009. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 224–232.
- Diana, M., Rafecas, M., Arco, C. e Quílez, J. 2014. Free amino acid profile of Spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35, 94–100.
- Dias, G. M. P. 2010. Avaliação do perfil dos peptídeos bioativos do Queijo de Coalho fresco produzido no município de Cachoeirinha-PE. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Eleni, C., Pappa, E.C. e Sotirakoglou, K. 2008. Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chemistry*, 111, 606–615.
- Friedman, M. e Levin, C.E. 2012f. Nutritional and medicinal aspects of D-aminoacids. *Amino Acids*, 42, 1553-1582.
- García-Palmer, F.J., Serra, N., Palou, A.E. e Gianotti, M. 1997. Free amino acids as índices of Mahón cheese ripening. *Journal Dairy Science*, 80, 1908-1917.

- Gorostiza, A., Cichoski, A.J., Valduga, A.T., Valduga, E., Bernardo, A. e Fresno, J.M. 2004. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. *Food Chemistry*, 85, 407–414.
- Helinck, S., Le Bars, D., Moreau, D. e Yvon M. 2004. Ability of thermophilic lactic acid bacteria to produce aroma compounds from amino acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3855-3861.
- Hui, H.Y., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W.K., Stanfield, P.S. e Toldrá, F. 2005. Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology, Taylor&Francis, ISBN-0-203-91355-8.
- Kabelová, I., Dvůráková, M., Cížková, H., Dostálek, P. e Melzoch, K. 2009. Determination of free amino acids in cheeses from the Czech market. *Czech Journal Food Science*, 27, 143-150.
- Körös, A., Varga, Z. e Molnar-Perl, I. 2008. Simultaneous analysis of amino acids and amines as their α -phthalaldehyde-ethanethiol-9-fluorenylmethyl chloroformate derivatives in cheese by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1203, 146–152.
- Kranenburg, R.V., Kleerebezem, M., Vlieg, J.V.H., Ursing, B.M., Boekhorst, J. e Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Smit, G., Siezen, R.J. 2002. Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis. *International Dairy Journal*, 12, 111–121.
- Lee, B.M., Laleye, L.C., Simard, R.E., Hollay, R.A., Emmons, D.B. e Giroux, R.N. 1990. Influence of homofermentative lactobacilli on physicochemical and sensory properties of Cheddar cheese. *Journal of Food Science*, 55, 386–390.
- Mangia, N.P., Murgia, M.A., Garau, G., Sanna, M.G. e Deiana, P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25, 366–377.
- Martins, Z.E.S.V. 2006. Avaliação da actividade proteolítica de bactérias lácticas isoladas de queijo Serra da Estrela. Trabalho de investigação, Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Ordoñez, J. A. 2005. *Tecnologia de alimentos: Componentes dos alimentos e processos*. Artmed, Porto Alegre, p.294.
- Pappa, E.C. e Sotirakoglou, K. 2008. Changes of free amino acid content of Teleme cheese made with different types of milk and culture. *Food Chemistry*, 111, 606–615.
- Perry, K.S.P. 2004. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. *Química Nova*, 27, 293-300.
- Pinho, O., Ferreira, L.M.P.L.V.O., Mendes, E., Oliveira, B.M. e Ferreira, M. 2001. Effect of temperature on evolution of free amino acid and biogenic amine contents during storage of Azeitão cheese. *Food Chemistry*, 75, 287-291.
- Sardella, R., Lisanti, A., Marinozzi, M., Ianni, F., Natalini, B., Blanch, G.P. e Castillo, M.L.R. 2014. Combined monodimensional chromatographic approaches to monitor the presence of D-amino acids in cheese. *Food Control*, 34, 478-487.
- Sgarbieri, V.C. 2005. Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal Food Technology*, 8, 43-56.
- Silva S.V. e Malcata, F.X. 2005. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal*, 15, 1-15.
- Smit, G., Verheul, A., Kranenburg, R.V., Ayad, E., Siezen, R. e Engels, W. 2000. Cheese flavour development by enzymatic conversions of peptides and amino acids. *Food Research International*, 33, 153-160.

Subramanian, A., Alvarez, V.B., Harper, W.J. e Rodriguez-Saona, L.E. 2011. Monitoring amino acids, organic acids, and ripening changes in Cheddar cheese using Fourier-transform infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, 21, 434-440.

Tavaria, F.K., Franco, I., C, F.J., Malcata e F.X. 2003. Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 13, 537-545.

Vicente, M.S., Ibáñez, F.C., Barcina, Y. e Barron, L.J.R. 2001. Changes in the free amino acid content during ripening of Idiazabal cheese: influence of starter and rennet type. *Food Chemistry*, 72, 309-317.

Walstra, P. 1999. Casein sub-micelles: do they exist? *International Dairy Journal*, 9, 189-192.

Yvon, M. e Rijnen, L. 2001. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal*, 11, 185-201.

Caracterização microbiológica do Queijo de Coalho**5.1 Introdução****5.1.1 Microbiologia do queijo**

As características microbiológicas do leite cru produzido no Brasil são reflexo das condições precárias de higiene ainda existentes em algumas regiões da produção nacional. Associado a este facto, o comércio informal deste produto e dos seus derivados é uma realidade em diversas regiões do país. Trata-se de uma fonte de rendimento importante para as populações locais, mas pode representar um risco microbiológico para os consumidores devido à possibilidade destes produtos lácteos conterem microrganismos patogénicos (Ortoloni, 2009).

Os microrganismos que compõem a microbiota dos derivados do leite são oriundos do leite e a sua composição qualitativa e quantitativa é influenciada pelas características genéticas do animal, pelo seu estado nutricional e de saúde, pela sua alimentação e manejo. Estes microrganismos podem também ser adquiridos a partir de diversas fontes como a ordenha, manipuladores, utensílios ou o ambiente em geral.

O leite cru e os seus derivados, como os queijos artesanais, são amplamente consumidos pela população, mas são frequentemente produzidos em condições insatisfatórias de higiene e geralmente não apresentam os padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Moraes *et al.*, 2005; Feitosa *et al.*, 2003).

O Queijo Coalho é um dos queijos mais tradicionais do Brasil, sendo maioritariamente produzido na região Nordeste. Apesar da sua grande popularidade no território brasileiro, a produção concentra-se ainda no Nordeste, com recurso a processos artesanais, nos quais a matéria prima é o leite cru com a correspondente microbiota láctica, podendo também conter bactérias não lácticas, com potencial patogénico.

A fonte regional destes organismos contaminantes pressupõe um risco microbiológico acrescido para os consumidores provenientes de outras regiões do Brasil e de outros países, que terão provavelmente menos defesas em relação a estes organismos patogénicos do que as populações das regiões de onde eles provêm.

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão naturalmente presentes no leite cru ou são adicionadas intencionalmente durante o processo de fabricação de queijos, por estarem associadas a propriedades como sabor, textura e aroma aos produtos lácteos, sendo amplamente empregues como culturas iniciadoras em diversos produtos dessa indústria (Carr *et al.*, 2002).

As BAL representam um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrado em alimentos, inclusivamente leite e derivados, como os géneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Microbacterium*, *Bifidobacterium* e *Propionibacterium* (Holzapfel *et al.*, 2001).

Ferreira (2003) e Jay (2005) expõem 16 géneros no grupo das BAL, das quais, as comumente encontradas em queijos são cinco: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Fox *et al.*, 2000).

O interesse na microbiota de queijo de leite cru e outros produtos lácteos tradicionais são mantidos também por uma reconhecida necessidade de identificação de novas estirpes de BAL (Wouters *et al.*, 2002). Tradicionalmente, produtos lácteos abrigam um enorme reservatório de diversidade genética microbiana, a qual pode ter muito potencial biotecnológico que pode ser aplicado à indústria alimentar (Alegria *et al.*, 2009). As BAL especificamente, compõem essa microbiota de forma significativa e são apontadas como as principais responsáveis pela inibição e destruição de outros microrganismos, incluindo os patogénicos. Estas bactérias são utilizadas como culturas iniciadoras em alimentos fermentados, possuem ação probiótica e também são conhecidas pela produção de várias substâncias antimicrobianas, que contribuem para a bioconservação dos alimentos (Ortoloni, 2009).

Investigadores em vários países trabalharam na identificação da microbiota láctica de leite e de queijos e estudaram a ação desses microrganismos contra bactérias patogénicas e a produção de compostos antimicrobianos por estirpes de BAL, na procura de alternativas de controlo natural de microrganismos patogénicos. Golić e colaboradores (2013) caracterizaram as bactérias ácido lácticas de queijos frescos e em conserva, todos artesanais, da Sérvia e da Croácia, nos quais as espécies lácticas mais dominantes foram *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Dessas BAL isoladas, 53% produziram substâncias com atividade antimicrobiana.

Litopoulou-Tzanetaki e Tzanetakis (2011) avaliaram as características microbiológicas de queijos tradicionais da Grécia e identificaram como microflora predominante as NSLAB (*non starter lactic acid bacteria*).

Terzic-Vidojevic e colaboradores (2014) investigaram a composição das bactérias ácido lácticas no queijo artesanal Travnik e outros produtos lácteos produzido numa região montanhosa da Bósnia e Herzegovina. Estes produtos são produzidos com leite de vaca sem adição de fermentos. Em 460 isolados desses queijos foram identificadas as espécies *Lactococcus lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garvieae*, *Lactobacillus plantarum*, *L. helveticus*, *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. italicus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *S. mitis*.

Riquelme e colaboradores (2015) realizaram o primeiro trabalho de caracterização microbiana do queijo do Pico, um queijo artesanal dos Açores, Portugal. Quatro filos e 54 géneros foram identificados, sendo o género *Lactococcus* o mais abundante. Concluiu-se, portanto, que a comunidade bacteriana do queijo do Pico apresentava poucas taxa dominantes, baixa abundância de BAL, mas altamente diversificada.

As características microbiológicas do queijo de cabra produzido no Algarve, Portugal, foram analisadas encontrando-se como abundantes os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Alguns destes microrganismos do género *Lactobacillus* produziram bacteriocina (Ratão, 2010).

Da mesma forma, a microbiota láctica do Queijo de Coalho produzido em vários estados do Nordeste do Brasil e do leite utilizado na sua produção tem vindo a ser estudada em várias partes do Brasil, com a finalidade de identificar as espécies de BAL dominantes. A microbiota láctica do Queijo de Coalho artesanal produzido no Agreste de Pernambuco, foi avaliada em épocas do ano com diferentes índices pluviométricos e foram identificados microrganismos dos géneros *Enterococcus* (36,27%), *Streptococcus* (25,12%), *Lactococcus* (23,03%), *Lactobacillus* (13,55%) e *Leuconostoc* (2,3%). Não se encontraram correlações entre a presença e a frequência dessas bactérias e as diferentes épocas do ano nas quais foram efetuadas as colheitas (Albuquerque, 2010).

Ramos (2009) avaliou as características microbiológicas do Queijo de Coalho de leite cru produzido no sertão de Alagoas, Brasil. Os géneros de bactérias lácticas isoladas foram *Streptococcus* (41,9%), *Enterococcus* (16,3%), *Pediococcus* (9,3%), *Leuconostoc* (9,3%), *Lactobacillus* (4,6%) e *Lactococcus* (2,3%). As principais espécies isoladas foram *Streptococcus uberis*, *S. bovis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lb. Paracasei paracasei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis*.

Guedes Neto (2008) identificou a microbiota láctica em Queijos de Coalho artesanais e industriais produzidos em Pernambuco, Brasil, e encontrou os géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Escherichia* e *Erwinia*.

Freitas (2011) analisou a microbiota láctica do Queijo de Coalho e do soro do queijo de três propriedades situadas no Agreste, Borborema e Sertão paraibano no Brasil e encontrou como géneros predominantes das bactérias lácticas *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*.

Investigadores que estudaram os prós e os contras dos queijos tradicionais destacaram a importância da microbiota do leite cru para a qualidade do queijo, e referiram que a sua biodiversidade diminui no queijo quando comparado com o leite utilizado na sua produção (Montel *et al.*, 2014).

Nóbrega (2012) estudou a microbiota láctica dos queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais, Brasil. Os resultados apontaram para uma maior diversidade de espécies de BAL no queijo Canastra, com as seguintes espécies *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus gallotycus*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Enterococcus faecalis* e *Leuconostoc fallax*. No queijo Serro as espécies mais frequentes foram *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Enterococcus faecalis*.

Ferreira *et al.* (2015) identificaram as bactérias ácido lácticas no queijo Marajó, um queijo artesanal produzido com leite de búfala na Ilha do Marajó, Maranhão, Brasil, onde a espécie *Weissella confuse* foi identificada em todos os queijos. Além dela, outras espécies foram encontradas como *S. infantarius* subsp. *infantarius*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *W. paramesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus brevis* e *E. genus*.

Sobre a importância das bactérias ácido lácticas nos produtos lácteos, Montel *et al.*, (2014) afirmam que o sabor é muito mais intenso em queijos de leite cru do que em queijos de leite pasteurizado. Isto pode justificar a tradição destes queijos e o interesse da população. Outro aspeto relevante destas

bactérias é a capacidade da microbiota nativa dos queijos de leite cru de produzirem compostos antimicrobianos para combater agentes patogênicos. Essa inibição parece estar mais associada à qualidade e quantidade que à biodiversidade microbiana (Montel *et al.*, 2014). Sendo alvo de pesquisa, as BAL são estudadas quanto ao seu potencial tecnológico e ação antimicrobiana por vários autores.

Os queijos artesanais são tradicionalmente produzidos com leite cru, que apresenta um elevado número de microrganismos potencialmente patogênicos. Além dos microrganismos patogênicos que podem já estar presentes no próprio leite, outros podem ser transmitidos a partir dos vários componentes do ambiente de produção do leite. *Listeria monocytogenes* e outros microrganismos patogênicos podem estar presentes na superfície de utensílios utilizados na ordenha. Mastites também são consideradas importantes fontes de contaminação do leite, principalmente por *Staphylococcus aureus*. Além disso, fezes dos animais e água podem contaminar o ambiente da ordenha e o leite com microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (Oliver *et al.*, 2005).

André *et al.* (2008) pesquisaram a presença de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal, em amostras de leite cru usado na sua produção e nas mãos dos empregados envolvidos na manipulação dos queijos e das matérias-primas, numa indústria de produção de produtos lácteos. Estes autores identificaram a matéria-prima como a mais provável fonte de contaminação de *S. aureus* nos queijos.

Muitas pesquisas são encontradas na literatura sobre as condições higiênicas e sanitárias de produção de leite e dos seus derivados, especialmente de queijos artesanais.

Ramos (2009) avaliou as características microbiológicas do Queijo de Coalho de leite cru produzido no sertão de Alagoas, Brasil, e concluiu que as condições sanitárias foram insatisfatórias devido à presença de *E. coli* e *S. aureus*.

Santana e colaboradores (2008) avaliando a qualidade microbiológica do Queijo de Coalho comercializado em Aracaju, Sergipe, encontraram estafilococos coagulase positiva em 46% das amostras, *Salmonella* spp. em 26% e coliformes termotolerantes, podendo ser classificado como impróprio para consumo.

Oliveira e colaboradores (2010) avaliaram a qualidade microbiológica de Queijo de Coalho comercializado em Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil, no período de janeiro a dezembro do mesmo ano, incluindo queijo com e sem registro no Serviço de Inspeção Estadual e no Serviço de Inspeção Federal. Mais de 80% e 76% das amostras, apresentavam contaminações apreciáveis com, respectivamente, coliformes termotolerantes e estafilococos. *Salmonella* spp foi detetada em 9,5% das amostras analisadas.

Viana e colaboradores (2009) pesquisaram a presença de *Staphylococcus* e outros microrganismos indicadores de qualidade no Requeijão do Norte, um queijo tradicional do Nordeste do Brasil. As amostras recolhidas em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, isolaram *Staphylococcus coagulase* positiva e o gene coagulase foi isolado também de amostras fisiologicamente coagulase negativas, além de um elevado nível de coliformes fecais e fungos.

Dantas (2012) avaliou a qualidade microbiológica do Queijo de Coalho comercializado em Patos, Paraíba, Brasil, a fim de contribuir para a melhoria das condições sanitárias da sua produção. Todas as amostras avaliadas encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação, tendo sido encontrada *E. coli* em todas as amostras e *Salmonella* spp. numa amostra.

Borges (2006) pesquisou a presença de microrganismos contaminantes, coliformes fecais, *E. coli*, *Listeria monocitogenes*, *S. aureus* e *Salmonella* spp na linha de produção do queijo de uma indústria de laticínios em Fortaleza, Ceará. Coliformes totais e fecais e *E. coli* foram identificados, em níveis elevados, no leite cru. No queijo não foi encontrada *E. coli*, o que pode ser um resultado da competição exercida pelas BAL e do efeito antimicrobiano de alguns metabolitos produzidos pelas bactérias lácticas. *Staphylococcus coagulase* positiva foi identificada no leite cru, mas foi reduzida a zero no leite pasteurizado, no entanto a enterotoxina estafilocócica foi identificada em todas as amostras de um mesmo lote processado, desde a matéria-prima até ao queijo.

Luz (2009) isolou *Staphylococcus aureus* do leite e Queijo de Coalho produzidos na região Agreste do Pernambuco e identificou através de PCR vários genes produtores de toxinas. Além disto, foram realizados testes de resistência destas estirpes de *S. aureus* a compostos com atividade antimicrobiana, tendo-se identificado estirpes com resistência a vários tipos de antibióticos, como vancomicina, enrofloxacina, e sulfamida e trimetoprim.

Torquato Neto e colaboradores (2008) identificaram a microbiota presente no Queijo de Coalho de várias localidades de Pernambuco, produzido com leite pasteurizado em micro indústrias e também na zona rural. Espécies dos géneros *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* foram encontradas, demonstrando uma contaminação das amostras.

Guedes Neto (2008) pesquisou sobre as propriedades probióticas das BAL em Queijos de Coalho artesanais e industriais produzidos em Pernambuco, Brasil e verificou a presença de *Staphylococcus coagulase* positiva e negativa produtoras de enterotoxinas. O mesmo autor também avaliou a atividade antagonista das bactérias lácticas isoladas dessas amostras tendo verificado que o género *Lactobacillus* apresentou atividade a antagonista mais potente de entre as bactérias lácticas (Guedes Neto *et al.*, 2005).

Freitas (2011) identificou a microbiota láctica isolada do leite, do Queijo de Coalho e do soro do queijo de três propriedades situadas no Agreste, Borborema e Sertão paraíbano no Brasil e estudou as condições higiênicas e sanitárias de produção. Todas as amostras de todas as propriedades apresentaram resultado acima do recomendado para coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus*.

Alves e colaboradores (2009), avaliando a qualidade microbiológica de leite cru e Queijo de Coalho artesanal comercializado em São Luiz, Maranhão, Brasil, verificaram que as amostras de leite cru se encontravam em desacordo com o padrão microbiológico e que as amostras de Queijo de Coalho apresentaram coliformes termotolerantes (66%) e *Staphylococcus coagulase* positiva (23%) além da presença de fungos, sugerindo condições higiênicas e sanitárias insatisfatórias.

A qualidade microbiológica das amostras de Queijo de Coalho e de manteiga produzidos no Rio Grande do Norte, Brasil, foi avaliada por Feitosa e colaboradores (2003). As condições precárias de higiene e saneamento das amostras foram atribuídas à presença de *E. coli* (36%), *Staphylococcus coagulase* positiva (72%) e *Listeria* (9%). Além disto, algumas amostras foram consideradas impróprias para consumo devido à presença de *Salmonella*.

Zaffari (2005) verificou a presença de organismos patogênicos, *E. coli*, *Listeria monocitogenes* e *Brucella* sp. em queijos artesanais no Rio Grande do Sul, Brasil. *E. coli* foi isolada em 32% das

amostras de queijos e *Listeria sp.* em 15% das amostras analisadas. *Brucella sp.* não foi encontrada em nenhuma das amostras estudadas.

A atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas do queijo do Pico, Açores, Portugal, relativamente à *Listeria monocytogenes* foi estudada por Coelho e colaboradores (2014). As estirpes *Lactococcus lactis* e *Enterococcus faecalis*, produtoras de bacteriocinas, foram testadas no controlo do crescimento da *L. monocytogenes* em queijos frescos. Todas as estirpes controlaram o crescimento desta bactéria nos queijos frescos, mas algumas estirpes de *Enterococcus* apresentaram-se particularmente eficientes no controlo deste microrganismo patogénico, demonstrando desta forma o papel protetor de estirpes produtoras de bacteriocinas no controlo da proliferação de alguns agentes patogénicos em queijos frescos.

As características microbiológicas do queijo de cabra produzido no Algarve, Portugal, foram analisadas, tendo-se encontrado como prevaletentes os géneros *Lactobacillus* e *Lactococcus*. Verificou-se que algumas das estirpes de *Lactobacillus* identificadas produziram bacteriocinas (Ratão, 2010).

Assis (2010) avaliou a viabilidade de estirpes de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactococcus lactis* para atuarem como antagonistas frente ao *Staphylococcus aureus* e diminuir a produção de enterotoxinas em queijos frescos. As estirpes não expressaram atividade antagonista frente ao agente patogénico, no entanto, apresentaram efeito inibitório, com destaque para *L. lactis*.

Na tentativa de encontrar alternativas para melhorar a qualidade microbiológica dos produtos lácteos e garantir ao consumidor a segurança alimentar dos mesmos sem perda da sua qualidade, tem sido sugerido o uso de culturas selecionadas e endógenas de BAL com a finalidade de conservar características organolépticas do Queijo de Coalho. Esta preocupação é demonstrada desde o final da década de 90 quando Lima e colaboradores (1998) avaliaram os aspetos bioquímicos e sensoriais do Queijo de Coalho produzido com leite pasteurizado e cultura láctica termofílica (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*). Os resultados demonstraram boa aceitação dos queijos produzidos com leite pasteurizado acrescido da cultura láctica, apesar de apresentar baixa atividade proteolítica.

Neste sentido, Viana (2009) testou culturas lácticas endógenas selecionadas de amostras de Queijo de Coalho artesanais que foram testados em leite pasteurizado. Cavalcante e colaboradores (2007) avaliaram a qualidade microbiológica, físico-química e sensorial de Queijo de Coalho produzido com leite pasteurizado e culturas lácteas endógenas, obtidas a partir de leite de vaca cru e Queijo de Coalho artesanal, produzidos no Ceará. Os resultados de ambos os autores demonstraram a viabilidade da padronização do produto regional, reduzindo custos, melhorando a qualidade microbiológica e mantendo as características sensoriais do produto com o uso de culturas lácteas nacionais, que conferiram ao produto final as características sensoriais de aceitabilidade em relação à aparência, sabor e textura dos queijos.

5.1.2 Identificação molecular dos microrganismos

A microbiologia dos alimentos fundamentou-se, durante vários anos, na utilização de técnicas tradicionais, começando pelo uso de meios de cultura não-seletivos, testes bioquímicos diferenciais, até à produção enzimática e testes sorológicos. Estes testes podem apresentar variabilidade de resultados decorrentes da interferência de fatores ambientais sobre a expressão génica, baixo poder discriminatório, erros de interpretação e custo muito elevado. Apesar de serem confiáveis e eficientes, a deteção de microrganismos utilizando métodos tradicionais requerem, na sua maioria, tempos longos, podendo variar de dias e semanas (Gandra *et al.*, 2008).

As técnicas moleculares começaram a ser utilizadas como uma alternativa na identificação na microbiologia dos alimentos a partir da década de 80 (Gandra *et al.*, 2008). A descoberta da reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi o grande avanço na aplicação das técnicas moleculares na identificação genotípica de microrganismos.

A PCR é uma técnica altamente sensível, onde pequenas quantidades de ADN ou ARN podem ser enzimaticamente amplificadas, obtendo-se milhões de sequências alvo. A reação é realizada num termociclador, equipamento automatizado e computadorizado, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do ADN (Winn *et al.*, 2008).

Várias técnicas moleculares estão disponíveis e podem ser aplicadas na identificação dos microrganismos. Dentre elas, as mais utilizadas na microbiologia de alimentos são: PCR multiplex, que amplifica sequências de diferentes microrganismos patogénicos simultaneamente; REP-PCR/ERIC-PCR/BOX-PCR, que amplificam e identificam várias regiões diferentes do genoma bacteriano; RFLP-PCR, que realiza a análise de polimorfismo microbiano; PCR-ribotipagem, que amplifica regiões conservadas como 5S, 16S e 23S do rARN diferente entre espécies microbianas; e qPCR (PCR em tempo real) que amplifica, quantifica e identifica as bandas ao mesmo tempo em que ocorre a reação de amplificação (Gandra *et al.*, 2008).

O uso de metodologias convencionais associado a técnicas moleculares para identificação de isolados, é fundamental na caracterização segura e precisa das BAL.

Nóbrega (2012), analisando a microbiota láctica dos queijos artesanais produzidos na Serra da Canastra e do Serro, Minas Gerais, Brasil, identificou espécies através das técnicas moleculares, PFGE e TTGE.

Diversos autores utilizaram ainda técnicas moleculares para confirmação das espécies identificadas através de provas bioquímicas. Queiroz (2008) identificou através de técnicas moleculares (PCR) bactérias lácticas do género *Lactococcus* e *Lactobacillus*, previamente identificadas através de provas bioquímicas, isoladas do leite, da massa do leite e do Queijo de Coalho artesanal produzido no estado do Ceará, Brasil. A identidade de quarenta e sete dos microrganismos isolados foi confirmada através do PCR, destacando a importância da técnica na eficiência e qualidade da identificação dos microrganismos.

O uso de técnicas moleculares na identificação de microrganismos tem vindo a ser cada vez mais adotada como uma técnica de identificação de microrganismos na área da microbiologia de alimentos. A comparação das sequências da região 16S do ARN ribossómico (rARN) é uma das mais poderosas e eficazes técnicas para determinação do grau de parentesco filogenético entre os microrganismos

(Woese, 1987). Para tal, o uso do sequenciamento do gene que codifica o rARN 16S e o sequenciamento da região intergênica, é uma técnica que tem sido cada vez mais utilizada para caracterizar a diversidade microbiana de alimentos, incluindo os produtos lácteos (Tilsala-Timisjarvi, 1997; Guedes Neto, 2008).

Atualmente, após mais de 30 anos do início do uso das técnicas moleculares em microbiologia alimentar, vários autores fazem uso dessas ferramentas na identificação de microrganismos nos mais variados alimentos. A Tabela 5.1 apresenta alguns autores, os métodos aplicados, alguns resultados e os tipos de derivados lácteos.

Tabela 5.1: Referências sobre as técnicas moleculares aplicadas na identificação de microrganismos em leite e seus derivados.

REFERÊNCIA	MÉTODO	PRIMERS	MICRORGANISMOS	AMOSTRAS
Achilleos e Berthier, 2013	qPCR	Específicos	<i>Lc. lactis</i> e <i>Lb. paracasei</i>	Queijos
Albesharat <i>et al.</i> , 2011	RAPD-PCR	M13; 616F e 609R	<i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. hirae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>L. mesenteroides</i> .	Leite materno; alimentos fermentados
Alegría <i>et al.</i> , 2009	PCR	27FYM e 1492R	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>L. plantarum</i> , <i>E. coli</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Corynebacterium variabilis</i> , <i>Flavobacterium</i> spp., <i>L. mesenteroides</i> , <i>Microbacterium oxydans</i> , <i>Musa acuminata</i> , <i>S. pasteurii</i> ,	Queijo Casín
Almeira Júnior <i>et al.</i> , 2015	PCR	27F e 1512R	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>E. faecium</i> ,	Leite de cabra cru
Bassi <i>et al.</i> , 2015	DGGE, PCR	Cl2F e P4R	<i>B. cereus</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>C. butyricum</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. equorum</i> , <i>S. saprophyticus</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. thermophilus</i>	Queijo Padano

(Tabela 5.1 continuação)

REFERÊNCIA	MÉTODO	PRIMERS	MICRORGANISMOS	AMOSTRAS
Bozoudi <i>et al.</i> , 2015	SDS-PAGE e PCR	27F e 1492R; Lab159aF e Lab677R	<i>E. coli</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>C. tyrobutyricum</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>L.</i>	Queijo Feta fresco e maturado

			<i>innocua</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. thermophilus</i>	
Garnica <i>et al.</i> , 2014	PCR	E8f e rP2-R; E786F e U1115R	<i>E. faecalis</i> , <i>E. italicus</i> , <i>E. saccharominimus</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. gallinarum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. pseudoavium</i> , <i>E. viikkiensis</i> , <i>E. díspar</i> , <i>E. malodoratus</i> , <i>T. pasteurii</i> , <i>A. viridans</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>S. parauberis</i> , <i>S. uberis</i> , <i>S. agalactatae</i> , <i>S. bovis/S. equinus</i> , <i>S. macedonicus</i> , <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i> , <i>S. Lutetiensis</i>	Tanque de leite de ovelha
Georgalaki <i>et al.</i> , 2009	PCR	-	<i>L. macedonicus</i>	Queijo da Grecia
Golić <i>et al.</i> , 2013	REP-PCR	UNI16SF e UNI16SR	<i>L. lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. sucicola</i> , <i>Lb. Helveticus</i> , <i>S. equinus</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. warneri</i> , <i>Ln. mesenteroides/pseudomesenteroides</i> , <i>L. garvieae</i>	Queijos artesanais da Servia e Croacia
Mehmeti <i>et al.</i> , 2015	PCR; REP-PCR	11F e 5F; GTG ₅	<i>L. garvieae</i>	Leite cru
Santarelli <i>et al.</i> , 2013	LH-PCR	-	<i>L. delbrueckii</i> , <i>S. thermophilus</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>S. uberis</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>L. raffinolactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis/bulgaricus</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei/paracasei</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>	Queijo Grana Padano
Terzic-Vidojevic <i>et al.</i> , 2014	REP-PCR; PCR	GTG ₅ ; UNI16SF e UNI16SR	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. durans</i> , <i>Ln. mesenteroides</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Ln. pseudomesenteroides</i> , <i>Streptococcus</i> sp., <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>St. mitis</i> , <i>Lc. raffinolactis</i>	Queijos artesanais da Bosnia e Herzegovina
Tormo <i>et al.</i> , 2015	REP-PCR; PCR	His1 e His2; Conrev23; Genter; REP1R-Dt; REP2-D; E8F e E807R	<i>Lc. lactis diacetyl</i> , <i>Lc. lactis cremoris</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. mesenteroides</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. salivarius</i> , <i>Lb. johnsoni</i> , <i>Lb. bulgaricus</i> , <i>A. viridians</i> , <i>A. christensenii</i> , <i>A. urinae</i>	Leite de cabra cru

(Tabela 5.1 continuação)

REFERÊNCIA	MÉTODO	PRIMERS	MICROORGANISMOS	AMOSTRAS
Yu <i>et al.</i> , 2015	PCR multiplex	16S-FA e 16S-RA; murE-F e murE-R; paraF,	<i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. italicus</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb.</i>	Alimentos fermentados da Rússia

		penF; planF; pREV	<i>diolivorans</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. graminis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. kefiranofaciens</i> , <i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. parabuchneri</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. rafi</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lc. garvieae</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lc. Lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> , <i>Leu. Citreum</i> , <i>Leu. lactis</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. pseudomesenteroides</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Streptococcus parauberis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Vagococcus teuberi</i>	
Riquelme <i>et al.</i> , 2015	PCR	-	<i>Lactococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Marinomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Macroccoccus</i> , <i>Exiguobacterium</i> , <i>Rpthia</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia-Shigella</i> , <i>Chryseobacterium</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Elizabethkingia</i> , <i>Serratia</i>	Queijo do Pico-Açores-PT
Nóbrega, 2012	TTGE	V3G3-GC-Clamp	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb.gasseri</i> , <i>Lb johnsonni</i> , <i>St. gallatycus</i> , <i>Lc. lactis</i> , <i>Corynebacterium variabile</i> , <i>Lc. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Lb. Fermentum</i>	Queijo da Canasta e Serro - Brasil
Nóbrega, 2012	PCR; PFGE	-	<i>E. faecalis</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Leu. fallax</i> , <i>E. italicus</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> , <i>S. infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. italicus</i> , <i>St. salivarius</i> ,	Queijo da Canasta e Serro - Brasil
Santos <i>et al.</i> , 2015	RAPD-PCR;	OPL-1 e OPL-2; 8F e 1512R; 16-1 ^a e 23-1B; Lu-5 e Lac-2	<i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> e <i>Lb. fermentum</i>	Queijo de Coalho artesanal
Acúrcio <i>et al.</i> , 2014	PCR	57F e 1492R; 16-1A e 23-1B	<i>E. faecium</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. casseliflavus</i>	Leite de ovelha
Ortolani, 2009	PCR	P1b16 e mlb16	<i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lc lactis</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Queijo minas
Almeida, 2007	TAP-PCR	5' CAGCAGCCGC GGTAAT(W)C3'	<i>Lb plantarum</i> , <i>Lb paracasei</i> , <i>Lb brevis</i> , <i>Lb delbrueckii</i> ,	Queijo Serrano
Silva, 2010	RAPD-PCR	M13; 1646F e16536R	<i>Lb casei</i> , <i>Lb fermentum</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i>	Queijo Mussarela
Santos Neto, 2007	PCR	-	<i>Lc lactis</i> subsp <i>cremoris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Leu. citreum</i> , <i>E. italicus</i> , <i>Leu lactis</i> , <i>S; aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. salivaryus</i> , <i>S. bovis</i> , <i>Klebsiella oxytoxa</i> , <i>E. Coli</i>	Queijo de Coalho-PE, Brasil
Queiroz 2008	PCR	LU-5 e Lpar4; Lhis3F e Lhis4R; Lpla2 e IPla3	<i>Lc lactis</i> subsp <i>lactis</i> , <i>Lb plantarum</i> , <i>Lb paracasei</i> ,	Queijo de Coalho – CE-Brasil

(Tabela 5.1 continuação)

REFERÊNCIA	MÉTODO	PRIMERS	MICROORGANISMOS	AMOSTRAS
Guedes Neto 2008	PCR	-	<i>S. thermophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>W. confusa</i> , <i>Lb.</i>	Queijo de Coalho do PE-Brasil

*acidophilus, Lc., raffinolactis, Lc
lactis, E. coli, E. amylovora,*

O presente trabalho teve como objetivo identificar a diversidade microbiana presente no Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.

5.2. Materiais e métodos

5.2.1 Amostragem

As 28 amostras do Queijo de Coalho produzidas com leite sem pasteurização foram coletadas em queijeiras e comércio local no período de junho de 2013 a agosto de 2014, em sete microrregiões que compõem a mesorregião do Sertão Paraibano: Catolé do Rocha, Cajazeiras, Souza, Patos, Itaporanga, Piancó e Serra do Teixeira. As amostras que estavam originalmente expostas em balcões ou sob refrigeração, foram transportadas em caixas isotérmicas acondicionadas em gelo para o Laboratório de Microbiologia que pertence ao Laboratório de Análises de Matérias Primas Agropecuárias, da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Patos, Paraíba, Brasil.

5.2.2 Preparação das amostras e isolamento das bactérias ácido-lácticas (BAL)

Numa balança semi-analítica (Shimadzu) pesaram-se 25 g de cada amostra e posteriormente, adicionaram-se 225 mL de solução estéril de citrato de sódio 2% (Vetec) e homogeneizou-se a mistura num aparelho tipo Stomacher (Seward, 400), durante 3 minutos. Em seguida, foram realizadas diluições decimais das amostras de 10^{-1} a 10^{-10} em solução peptonada a 0,1% (Merck) estéril (Harrigan, 1998). De cada diluição, semeou-se 1,0 mL em placas de Petri, com adição de aproximadamente 20 mL dos meios de cultura seletivos estéreis De Man, Rogosa e Sharpe (MRS) e M17 (Himedia), em duplicado. Nas placas contendo o ágar MRS, adicionou-se uma sobrecamada. Os meios de cultura foram preparados de acordo com a recomendação do fabricante com as seguintes modificações: M17 – acrescentou-se púrpura de bromocresol (0,04 g/L) e MRS – adicionou-se púrpura de bromocresol (0,04 g/L) e carbonato de cálcio (5,0 g/L), ambos para facilitar a visualização de halos amarelos em torno das colônias, indicadores da produção de ácidos (APHA 2001). As placas de Petri contendo o meio MRS foram incubadas à temperatura de 30°C/48 h (BAL mesófilas) e as que continham o ágar M17 foram incubadas a 30 °C (BAL mesófilas) e 42 °C (BAL termófilas) por 48 h em condições de anaerobiose (Carvalho, 2007).

Decorrido o período de incubação, as placas que apresentavam entre 25 a 250 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por placa, foram selecionadas para isolamento e purificação. De cada meio de cultura (MRS e M17) e temperatura foram selecionadas 10 colônias. As colônias foram retiradas das placas com o auxílio da alça de platina estéril e transferidas para 10 mL de meios de cultura MRS e M17, respetivamente, e incubadas a 30 °C e 42 °C, por 24 h, para crescimento de BAL mesófilas e termófilas (Silva *et al.*, 2007).

Após a incubação em meio de cultura, foi transferido para placas contendo Ágar MRS e M17, por esgotamento, pelo método de estrias, e incubadas a 30 °C e 42 °C, respectivamente, por um período de 48 horas em condições de anaerobiose. Em seguida, as colónias foram submetidas ao teste de catalase e a coloração de *gram*, e visualizadas em microscópio ótico com lente objetiva 100x e óleo de imersão. Foram consideradas como características lácticas as colónias que reagissem ao teste de *gram* (*gram* positivo) na forma de cocos, bacilos ou bacilos cocóides e catalase negativa.

Com a finalidade de promover uma criopreservação das bactérias, dez colónias de cada meio foram transferidas para meios de cultura M17 e MRS, respectivamente, e novamente incubadas a 30 °C e 42 °C por 24 horas. Decorrido esse período, 800 µL de cada meio de cultura foram transferidos para tubos de *ependorf* de 1,5 mL e adicionados 200 µL de glicerol e congelados a -20 °C (Silva, 2011; Acúrcio *et al.*, 2014). Em paralelo, 1,0 mL dos meios de cultura foi transferido para tubos de *ependorf* de 2,0 mL e encaminhados para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, no Hospital Veterinário da UFCG, Patos, Paraíba, Brasil.

5.2.3 Análise molecular

De um total de 28 amostras de Queijo de Coalho recolhidas no Sertão da Paraíba, foram obtidas 609 colónias com características de BAL. Essas colónias foram submetidas à extração de ADN, amplificação do gene 16S rARN pela reação em cadeia pela polimerase (PCR), purificação e sequenciamento do produto da PCR.

5.2.3.1 Extração de ADN

Os microtubos de *ependorf* de 2,0 mL contendo 1,0 mL dos meios de cultura de MRS e M17 foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos em centrífuga (Centrífuga, HT) obtendo-se o precipitado. A partir do precipitado e após desprezar o sobrenadante, o ADN foi extraído com QIAzol® (Qiagen), adicionando 1,0 mL do Qiazol diretamente sobre o precipitado seguido de agitação em vórtex por 2 minutos. Em seguida adicionaram-se 250 µL de clorofórmio e agitou-se suavemente com inversões manuais. Após centrifugação a 12.000 rpm/15 minutos, transferiu-se o sobrenadante para novos tubos de *ependorf*, com cuidado para não recolher a linha esbranquiçada que separa as duas fases, e descartaram-se os tubos com o precipitado. Aos novos tubos de *ependorf* adicionaram-se 500 µL de etanol puro gelado, agitaram-se rapidamente em vórtex e guardaram-se por 30 minutos a -20 °C. Decorrido este período os tubos foram centrifugados a 12.000rpm/15 minutos. De seguida iniciou-se a etapa de lavagem do ADN, desprezando o sobrenadante e adicionando 1 mL de etanol 70% gelado e centrifugando a 10.000 rpm/5 minutos, por três vezes. Após a última lavagem descartou-se o sobrenadante e deixou-se o precipitado secar à temperatura ambiente durante 12 horas. Os precipitados foram solubilizados em 100 µL de água ultra-pura e mantidos em repouso durante 1 hora, para posterior avaliação da quantidade e grau de pureza do ADN bacteriano por espectrofotometria (BioPhotometer plus, Eppendorf).

5.2.3.2 PCR e purificação do produto da PCR

A técnica utilizada na identificação dos microrganismos presentes nas amostras de Queijo de Coalho do Sertão paraibano foi a PCR-ribotipagem. Esta técnica baseia-se na amplificação e sequenciamento da região entre as sequências conservadas 16S e 23S do operão do ARN ribossômico (rARN) através da PCR, utilizado na diferenciação entre espécies microbianas.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) foi realizada em termociclador (BIOCYCLER) utilizando o par de *primers* plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') (Ortoloni, 2009). A PCR foi preparada para um volume final de 20 µL constituída por 5UI One Taq ADN Polimerase (BioLabs), tampão 10X, cloreto de magnésio 1,5mM, 10mM de dNTP, 10 µmol de cada *primer*, ADN e água ultra-pura (Himedia). A reação de amplificação ocorreu sob as seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos seguidos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos; hibridização a 55 °C por 45 segundos; extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 7 minutos e 4 °C para manutenção (Ortoloni, 2009; Kullen *et al.*, 2000). Para visualização da reação de PCR, o material amplificado foi corado (Safer-dye non-mutagenic fluorescent reagente, KASVI), aplicado em gel de agarose a 1,2% e submetido à eletroforese por 40 minutos à U=080V (80), I = 400mA (47) e P = 065W (3). O gel foi observado sob luz ultravioleta e fotografado.

O material amplificado das amostras, resultante da PCR foi purificado com o kit Invisorb Clean-Up (INVITROGEN) de acordo com as recomendações do fabricante e congeladas a -20 °C para posterior sequenciamento.

5.2.3.3 Sequenciamento

Para o sequenciamento, o material amplificado e purificado foi encaminhado para a Plataforma de Sequenciamento do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil. A leitura foi realizada no sequenciador ABI 31001 (AB Applied Biosystems/HITACHI), composto de 16 capilares com comprimento de 50 cm. As sequências obtidas foram analisadas e alinhadas no programa Mega 6.0 e comparadas com dados depositados no GenBank (*National Center for Biotechnology Information – NCBI*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

5.3. Resultados e discussão

5.3.1 População das bactérias ácido-lácticas

A população microbiana das BAL cultivadas nos meios específicos e nas temperaturas de incubação a 30 °C (mesófilas) e 42 °C (termófilas) apresentaram uma população elevada (Tabela 5.2), variando de 10⁸ a 10¹¹. A microrregião de Itaporanga foi a que apresentou maior número, 2,3x10¹¹ de UFC/g de

Queijo de Coalho, com destaque para as colónias mesófilas que cresceram no meio M17. A microrregião de Cajazeiras foi a que apresentou o menor número, $2,8 \times 10^8$ UFC/g de Queijo de Coalho.

Tabela 5.2: Média e desvio padrão de BAL (UFC/g) de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.

Microrregiões	Meio de cultura e temperatura		
	MRS (30 °C)	M17 (30 °C)	M17 (42 °C)
Catolé do Rocha-R1	$2,7 \times 10^{10}$	$3,3 \times 10^9$	$1,9 \times 10^{10}$
Cajazeiras-R2	$5,5 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
Sousa-R3	$4,5 \times 10^8$	$4,9 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^8$
Patos-R4	$4,2 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	$3,4 \times 10^8$
Piancó-R5	$4,8 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$
Itaporanga-R6	$4,6 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^{10}$
Serra do Teixeira-R7	$2,8 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^{10}$

As características morfológicas das colónias de BAL foram observadas antes da extração de ADN. Os testes de *gram* e da catalase foram realizados e as colónias *gram* positivas com formato de cocos, bacilos ou cocobacilos e catalase negativo foram selecionadas. O meio de cultura M17 apresentou uma seletividade elevada para as colónias com formato de cocos, que corresponderam a 91,87% dos isolados enquanto 7,18% foram bacilos e 0,93% foram cocobacilos. No meio de cultura MRS foi observado o crescimento de colónias das quais 81,87% com forma de bacilos e 18,12% com forma de cocobacilo. Guedes Neto (2008) encontrou um resultado similar no Queijo de Coalho artesanal e industrial produzido em Pernambuco, onde observou que no meio M17 houve uma predominância de cocos, enquanto no meio MRS houve uma predominância de bacilos ou bastonetes.

Os resultados encontrados neste trabalho revelam uma população elevada de BAL identificadas nas amostras de Queijo de Coalho produzidas no Estado da Paraíba. Isto pode dever-se ao facto de as amostras serem queijos artesanais, isto é, produzidos com leite não-pasteurizado, e preservando, portanto, a população de BAL originalmente presentes na matéria-prima. A presença de bactérias lácticas e não lácticas no leite cru, resulta da sua transmissão a partir da glândula mamária, ambiente, água ou da própria manipulação, e pode justificar o elevado número de UFC/g encontrado nestes queijos. O número de colónias mesófilas foi maior do que o número de colónias termófilas pode ser atribuído a uma possível padronização no processo de fabricação do queijo, sugestivo do não-cozimento da massa.

A Figura 5.1 mostra a distribuição dos diferentes tipos morfológicos que compõem a população microbiana, após análise morfológica e sequenciamento.

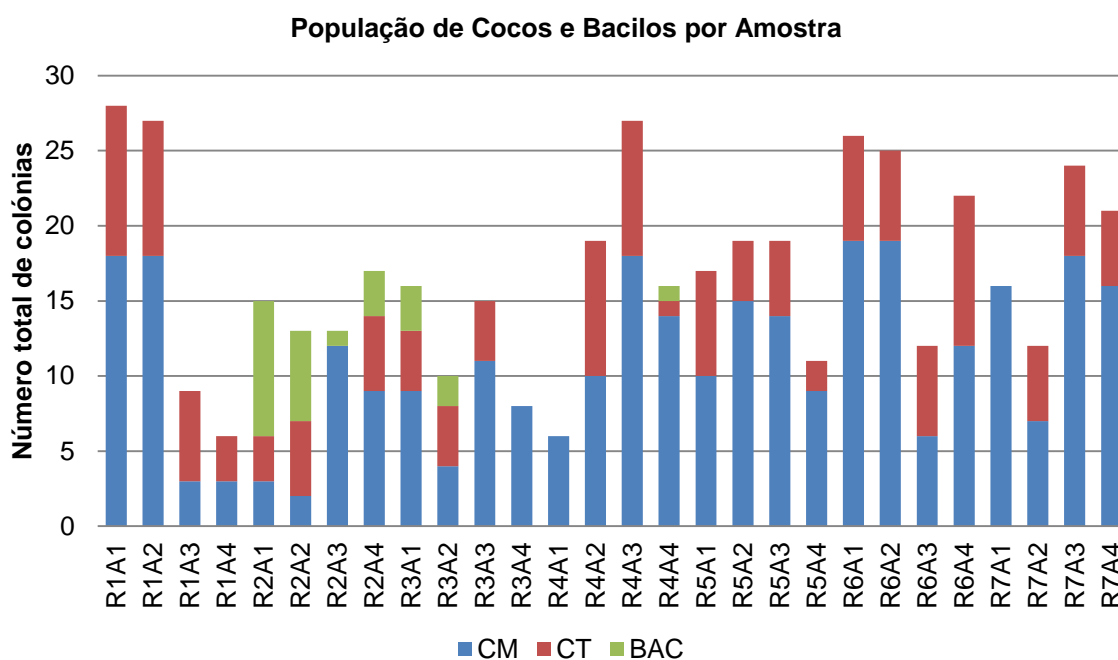


Figura 5.1: População de cocos mesofílicos, cocos termofílicos e bastonetes isolados de Queijo de Coalho da Paraíba expresso em número de colônias por amostra (Fonte: Dados do autor, 2015).
Legenda: R1- Microrregião de Catolé do Rocha; R2- Microrregião de Cajazeiras; R3- Microrregião de Sousa; R4- Microrregião de Patos; R5- Microrregião de Piancó; R6- Microrregião de Itaporanga; R7- Microrregião de Serra do Teixeira.

O número elevado de colônias com aspecto cocóide que cresceram no meio M17 em ambas as temperaturas correspondeu a 91,9% das colônias isoladas. Um resultado semelhante foi verificado por Albuquerque (2010) na sua pesquisa com Queijo de Coalho de Pernambuco, onde encontrou também uma percentagem de aproximadamente 86% de cocos entre as BAL. Noutros queijos produzidos com leite não pasteurizado na Europa obtiveram-se resultados semelhantes. Pangallo *et al.* (2014), realizou estudos com queijo Bryndza e observou que a maioria das BAL isoladas no ágar M17 eram cocos.

5.3.2 Identificação das espécies através de PCR-ribotipagem

De 28 amostras de Queijo de Coalho foram selecionadas 609 colônias com características morfológicas sugestivas de bactérias ácido lácticas (BAL), isto é, bactérias *gram*-positivas em forma de bastonete, cocos ou cocobacilos *gram*-positivos e catalase negativa, foram selecionadas. Quatrocentas e sessenta destas colônias (75,5%) foram identificadas pelo sequenciamento como sendo BAL, dos quais 93,3% foram classificadas como cocos e 6,7% como bacilos. Cento e quatro colônias amplificadas foram identificadas como bactérias não lácticas (17,1%) e quarenta e cinco colônias não amplificaram.

Após a realização da extração do ADN das bactérias, a PCR foi realizada utilizando os *primers* plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') com a finalidade de amplificar o gene da região 16S rARN. Os *primers* amplificaram uma sequência de aproximadamente 500pb, conforme mostra a Figura 5.2.

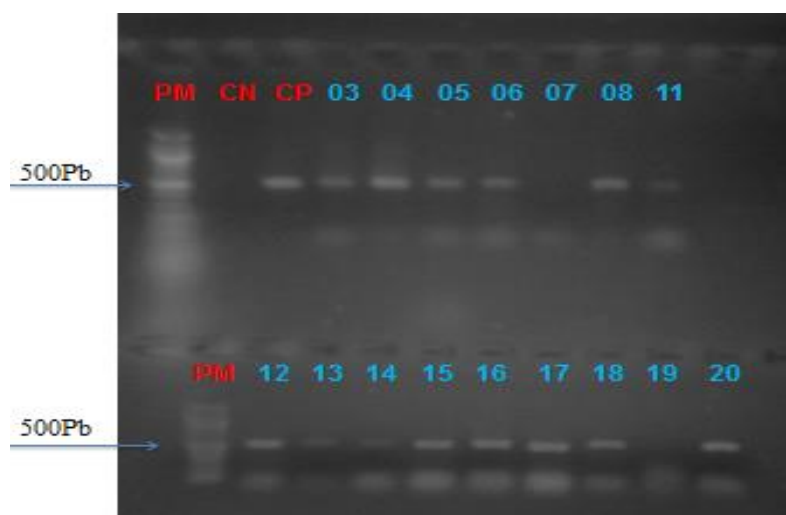


Figura 5.2: Produto da PCR em gel de agarose à 1,2% separado através de eletroforese (PM: peso molecular 500pb; CN: controlo negativo; CP: controlo positivo; Amostras: 03 a 20). (Fonte: Dados do Autor, 2015).

Após a PCR, os produtos amplificados foram purificados e enviados para sequenciamento. As sequências que apresentavam eletroferogramas de qualidade e com Phred acima de 30 (Figura 5.3) foram alinhadas no programa *Mega 6.0* e comparadas com as sequências depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando a ferramenta BLAST. Estas espécies foram identificadas com base na identidade do *score* do gene da região 16S do rARN. Após a identificação, as sequências foram submetidas e inseridas no GenBank, onde se encontram registradas com um número de acesso e disponíveis para consultas e pesquisa.

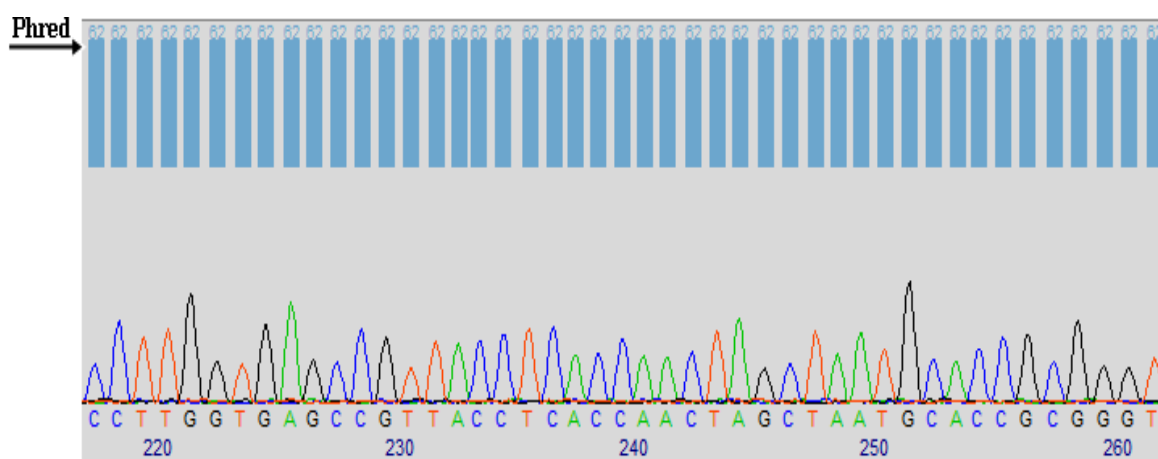


Figura 5.3: Eletroferograma de uma das amostras sequenciadas, indicando o valor de Phred. (Fonte: Dados do Autor, 2015).

As espécies de BAL presentes no Queijo de Coalho artesanal da Paraíba identificadas através de PCR-ribotipagem e sequenciamento apresentam-se na Tabela 5.2. As 456 colónias de BAL sequenciadas identificaram seis géneros, distribuídos na seguinte ordem decrescente: *Lactococcus* (40,13%), *Enterococcus* (35,30%), *Streptococcus* (18,64%), *Lactobacillus* (5,48%), *Leuconostoc* (0,43%) e *Weissella* (0,22%). O grau de identidade das sequências variou de 96% a 100% quando comparado com a base de dados NCBI GenBank.

A microbiota láctica de leite cru e de produtos lácteos tradicionais ainda estimula o interesse pela necessidade de identificar novas estirpes de BAL, para complementar ou substituir as atuais ou identificar microrganismos responsáveis pelas características organolépticas de produtos regionais. A diversidade da microbiota láctica isolada do Queijo de Coalho da Paraíba foi bastante elevada e a sua identificação com recurso a técnicas moleculares permitiu conhecer com mais detalhe o perfil das BAL responsáveis pelas características do Queijo de Coalho da Paraíba.

Tabela 5.3: Espécies de BAL isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil.

Espécies identificadas com base na elevada identidade no score da região 16S	Número de acesso ao Gen Bank	Número de colônias por microrregião							Subtotal
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
<i>Enterococcus casseliflavus</i> 99%	KT989994/ KT989995/KT989996	1	0	0	0	0	0	2	03
	-	0	0	0	0	0	2	3	05
<i>Enterococcus durans</i> 99-96%	KT989997/KT989998/KT989999/KT990000	0	0	0	1	3	0	0	04
	-	1	0	3	0	0	0	0	04
<i>Enterococcus faecalis</i> 100 -99%	KT990001/KT990002/KT990003/KT990004/KT990005/KT990006/KT990007/KT990008	0	1	3	0	0	1	3	08
	-	2	0	0	2	0	1	0	05
<i>Enterococcus faecium</i> 100 -96%	KT990009/KT990010/KT990011/KT990012/KT990013/KT990014/990015/KT990016/KT990017/KT990018/KT990019/KT990020/KT990021/KT990022/KT990023/KT990024/KT990025/KT990026/KT990027/KT990028/KT990029/KT990030	11	0	04	01	03	01	02	22
	-	06	25	07	31	07	19	09	104
<i>Enterococcus gallinarum</i> 100-99%	KT990031/KT990032	0	0	0	0	0	2	0	02
<i>Enterococcus italicus</i> 100%	KT990033/KT990034	0	0	0	1	0	0	1	02
	-	0	0	0	1	0	0	1	02

(Tabela 5.3 continuação)

Espécies identificadas com base na elevada identidade no score da região 16S	Número de acesso ao Gen Bank	Número de colônias por microrregião							Subtotal
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
<i>Lactobacillus fermentum</i> 99%	KT990035/KT990036/KT990037	0	2	1	0	0	0	0	03
	-	0	3	1	0	0	0	0	04
<i>Lactobacillus plantarum</i> 99 - 98%	KT990038/KT990039/KT990040/KT990041/KT990042	0	4	1	0	0	0	0	05
	-	0	4	0	0	0	0	0	04
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> 100 - 99%	KT990043/KT990044/KT990045/KT990046/KT990047/KT990048	0	6	0	0	0	0	0	06
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 99%	KT990049/KT990050/KT990051/KT990052	0	0	3	1	0	0	0	04
<i>Lactococcus garvieae</i> 100 - 99%	KT990053/KT990054/KT990055/KT990056/KT990057/KT990058/KT990059/KT990060/KT990061	0	1	1	0	3	0	4	09
	-	0	15	4	9	9	5	20	62
<i>Lactococcus lactis</i> 100 - 99%	KT990062/KT990063/KT990064/KT990065	0	2	1	0	1	0	1	5
	-	0	0	0	2	1	9	2	14
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 100 - 99%	KT990066	0	0	0	0	0	0	1	01
	-	10	3	2	12	20	28	19	94

(Tabela 5.3 continuação)

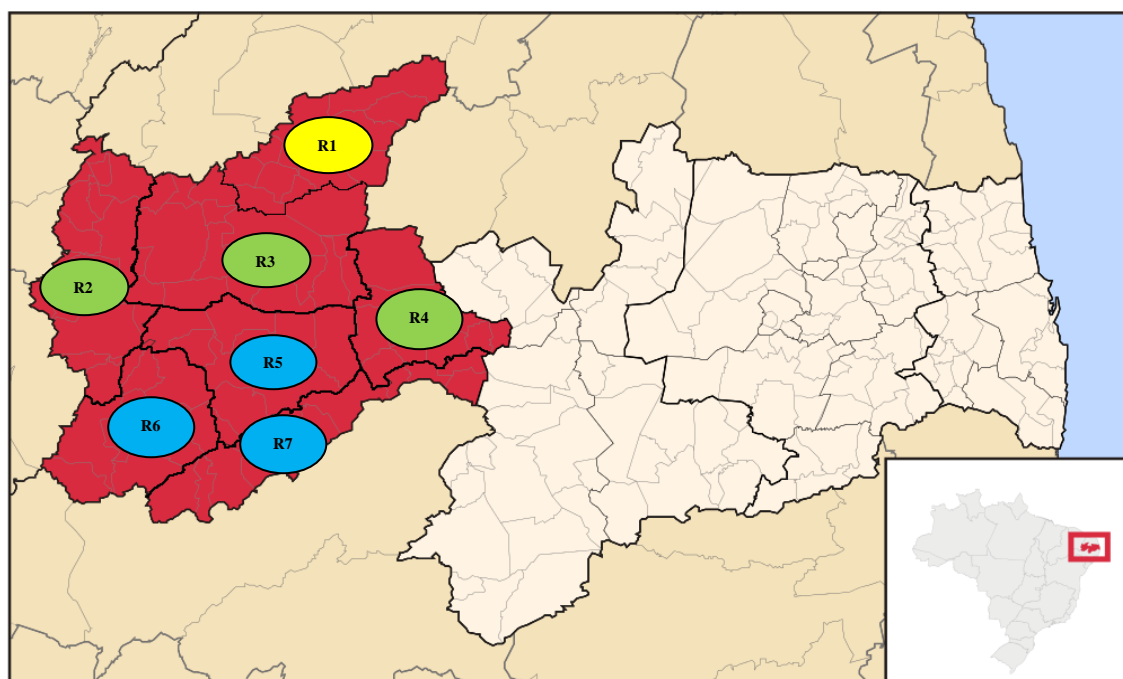
Espécies identificadas com base na elevada identidade no score da região 16S	Número de acesso ao Gen Bank	Número de colónias por microrregião							Subtotal
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> 99%	KT990092/KT990093	1	0	0	1	0	0	0	02
<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i> 100% - 99%	KT990067/KT990068/KT990069/KT990070/KT990071/KT990072/KT990073/KT990074/KT990075/KT990076/KT990077	6	0	1	0	4	0	0	11
	-	14	0	9	0	10	0	0	33
<i>Streptococcus iniae</i> 100% - 99%	KT990078	0	0	0	0	0	1	0	01
<i>Streptococcus lutetiensis</i> 99%	KT990079/KT990080/KT990081/KT990082/KT990083/KT990084/KT990085/KT990086/KT990087/KT990088/KT990089	2	0	7	0	1	1	0	11
	-	1	0	3	4	1	18	0	27
<i>Streptococcus macedonicus</i> 99%	KT990090/ KT990091	0	0	0	0	0	0	2	02
<i>Weissella paramesenteroides</i> 99%	KT990094	0	0	0	1	0	0	0	01
Total		55	66	51	67	63	88	70	460

Legenda: R1-Catolé do Rocha; R2-Cajazeiras; R3-Sousa; R4-Patos; R5-Piancó; R6-Itaporanga; R7-Serra do Teixeira. (Fonte: Dados do Autor, 2015).

Algumas diferenças foram observadas quanto à prevalência dos gêneros entre as várias microrregiões. Na microrregião de Catolé do Rocha (R1), a prevalência foi do gênero *Streptococcus*, enquanto nas microrregiões de Cajazeiras (R2), Sousa (R3) e Patos (R4) o gênero *Enterococcus* foi o mais abundante. O gênero *Lactococcus* foi o mais abundante nas microrregiões de Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7). Esta distribuição é demonstrada na Figura 5.4, onde se observa uma organização dos gêneros de BAL por microrregião, seguindo um alinhamento geográfico. Jans e colaboradores (2013) obtiveram resultados semelhantes para a microbiota de leite fermentado em África, tendo estes autores encontrado diferenças regionais na prevalência de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*. Vários fatores como tipo predominante de vegetação nas regiões estudadas, temperatura, pluviosidade e composição das amostras de Queijos de Coalho foram avaliados, na tentativa de encontrar alguma razão para justificar esta distribuição, mas nenhum desses fatores se apresentou fortemente associado. No entanto, as características genéticas e fisiológicas dos rebanhos que produziram o leite podem ser fatores cruciais para este resultado, dado que como já foi referido, diversos autores encontram fortes correlações entre a microbiota do leite e dos queijos produzidos a partir deste.

Quanto às espécies de BAL, considerando todas as amostras analisadas, a mais abundante foi o *E. faecium* com 27,4%, seguido pelo *L. lactis* subsp *lactis* com 20,6%, *L. garvieae* com 15,4% e *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* com 9,6%. No entanto, diferenças na composição qualitativa das espécies de BAL foram observadas por microrregião.

Foi na microrregião de Patos (R4) que se observou a maior diversidade de espécies de BAL. Seis gêneros foram encontrados e apresentam-se a seguir por ordem decrescente: *Enterococcus* (55,2%), *Lactococcus* (34,3%), *Streptococcus* (6,0%), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (1,5%), cada. O gênero *Enterococcus* apresentou a maior diversidade, incluindo espécies como *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. italicus*. Na microrregião de Patos a espécie *E. faecium* apresentou a maior prevalência (47,7%).



Legenda: Microrregiões R1 – Catolé do Rocha; R2 – Cajazeiras; R3 – Sousa; R4 – Patos; R5 – Piancó; R6 – Itaporanga; R7 – Serra do Teixeira. (Fonte: Dados do Autor, 2015).



Figura 5.4: Distribuição por microrregião das BAL isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba.

Diversos autores associam o género *Enterococcus* com as características organolépticas dos produtos artesanais e realçam a sua participação no processo de maturação do queijo, como o queijo de São Jorge, produzido em Portugal (Kongo *et al.*, 2007), o queijo Raschera (Dolci *et al.*, 2008) e o queijo Fontina (Giannino *et al.*, 2009) produzidos na Itália, queijo artesanal feito a partir de leite de cabra produzido em Espanha (Martín-Platero *et al.*, 2009) e queijo Istriano, da Croácia (Fuka *et al.*, 2010). Albuquerque (2010) também encontrou o género *Enterococcus* como sendo o mais abundante entre as BAL isoladas do Queijo de Coalho produzidos no Estado de Pernambuco, Brasil.

Várias espécies do género *Enterococcus*, tais como o *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. italicus* e *E. durans* já foram isolados a partir de queijos. A espécie mais abundante encontrada neste trabalho foi o *Enterococcus faecium*, resultado semelhante ao encontrado por Carvalho (2007) em Queijo de Coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. Acúrcio *et al.* (2014) também isolaram 56,25% de *Enterococcus faecium* das bactérias ácido lácticas de leite de ovelha. Além desta espécie, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. italicus*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* também foram identificadas. O *Enterococcus italicus* foi isolado na Tunísia (Gaaloul *et al.*, 2014) a partir do leite cru, tendo a identificação sido feita através do sequenciamento do gene 16S rARN. No Brasil, este é o primeiro registro de *E. gallinarum* e do *E. casseliflavus* isolados em Queijo de Coalho artesanal.

Nas microrregiões do Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra de Teixeira (R7) o género *Lactococcus* foi o mais abundante, seguido por *Enterococcus* e *Streptococcus*. A espécie *L. lactis* subsp. *lactis* foi a mais prevalente nas microrregiões de Piancó (R5) e Itaporanga (R6), com 31,7% e 31,8%,

respetivamente. De acordo com Casalta e Montel (2008), esta espécie é uma das mais comuns em leite cru e derivados.

O género *Lactococcus* apresentou a maior prevalência neste trabalho, correspondendo a 40,2% das colónias isoladas. Guedes Neto *et al.* (2005), Carvalho (2007) e Silva *et al.* (2012) relataram o isolamento de *Lactococcus* em Queijo de Coalho artesanal na região Nordeste. As espécies *L. garvieae*, *L. lactis* e *L. lactis* subsp. *lactis* foram as espécies isoladas nesta pesquisa. *Lactococcus* são geralmente encontrados no ambiente, plantas e pele dos animais e a sua presença no leite cru e derivados pode ser atribuída à contaminação durante a ordenha do leite com a forragem (Casalta e Montel, 2008)

Não há relatos na literatura sobre o isolamento e identificação do *Lactococcus garvieae* em queijos brasileiros industriais ou artesanais. No entanto, esta espécie foi encontrada em queijos e leite de vaca noutros países (Alegría *et al.*, 2009; Alomar *et al.*, 2008; Fortina 2009). O *L. garvieae* foi identificado nas amostras de quase todas as microrregiões pesquisadas neste trabalho, com exceção da microrregião de Catolé do Rocha (R1). A microrregião da Serra do Teixeira (R7) apresentou o *L. garvieae* com 34,2%, sendo a espécie mais abundante.

A diversidade microbiana das BAL encontradas na microrregião de Itaporanga (R6) compreende os seguintes géneros: *Lactococcus* com 47,7%, *Enterococcus* com 29,5% e *Streptococcus* com 22,7%. A maior prevalência verificada foi da espécie *L. lactis* subsp. *lactis* com 31,8%, seguida pelo *E. faecium* com 22,7% e o *S. lutetiensis* com 21,6%. Segundo Casalta e Montel (2008), o *L. lactis* subsp. *lactis* pode ser encontrado em quantidades elevadas nos primeiros dias após processamento do queijo. A presença predominante de cocos identificadas nesta microrregião justifica o número elevado de colónias mesofílicas isoladas, $2,3 \times 10^{11}$ de UFC/g de Queijo de Coalho, nesta microrregião.

A microrregião de Sousa (R3) apresentou uma prevalência elevada do género *Streptococcus* com 39,2%, seguido do *Enterococcus* com 33,3%, *Lactococcus* com 15,7% e *Lactobacillus* com apenas 11,8%. A espécie *E. faecium* (21,6%) aparece como a mais prevalente, seguidas de *S. lutetiensis* e *S. infantarius* subsp. *infantarius*, com 19,6%.

A microrregião de Catolé do Rocha (R1) apresentou maior prevalência do género *Streptococcus*, seguido por *Enterococcus* e *Lactococcus*. A espécie *S. Infantarius* subsp. *infantarius* foi a mais abundante, com 36,4%. O género *Streptococcus* mostrou a maior variedade de espécies identificadas em todos os queijos. Neste trabalho, quatro espécies do género *Streptococcus* foram identificadas: *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*, *Streptococcus lutetiensis*, *Streptococcus macedonicus* e *Streptococcus inae*. A identificação do *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* é muito frequente em produtos fermentados artesanais produzidos na África (Jans *et al.*, 2012). Gaglio *et al.* (2014) identificaram *S. lutetiensis* e *S. infantarius* no queijo italiano Vastedda della Valle Del Belice. De acordo com Winn *et al.* (2008), o *S. lutetiensis* é uma reclassificação do *S. infantarius* subsp. *coli*, que pertence ao complexo bacteriano *S. bovis/Streptococcus equinus* (Schlegel *et al.*, 2000; Pacini *et al.*, 2006). Membros do género *Streptococcus* também foram encontrados em outras pesquisas realizadas com Queijo de Coalho em Pernambuco (Guedes Neto, 2008) e no Ceará (Albuquerque, 2010), no Brasil. Orsahin (2012) no seu trabalho com queijo Armola, na Turquia, também isolou o *S. lutetiensis*.

O *S. macedonicus* foi isolado apenas na microrregião da Serra do Teixeira (R7). É uma bactéria termofílica e homofermentativa, que cresce bem a 42 °C. O *S. macedonicus* foi isolado em queijo da Canastra, Minas Gerais (Nóbrega, 2012), sendo, no entanto, o primeiro registro destes microrganismos em Queijo de Coalho. Nos queijos da microrregião de Cajazeiras (R2), analisados neste trabalho não foram identificadas espécies do género *Streptococcus*.

Do género *Lactobacillus*, as espécies isoladas foram *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus*. Este género é frequentemente isolado em produtos lácteos, por se tratar de uma espécie abundante nestes alimentos e desempenha um papel importante nas características organolépticas de produtos lácteos, além das suas propriedades probióticas e produtoras de antimicrobianos.

Em Queijo de Coalho já foram isoladas espécies do género *Lactobacillus* como descrito por Santos *et al.* (2015), Albuquerque (2010), Assis (2010), Ramos (2009), Viana (2009), Guedes Neto (2008), Queiroz (2008), Carvalho (2007), entre outros.

Espécies do género *Lactobacillus* foram também isoladas de outros tipos de queijo e de outros produtos lácteos (Yu *et al.*, 2015), de queijo Zlatar, um queijo tradicional da Servia (Veljovic *et al.*, 2007), leite de ovelha (Acúrcio *et al.*, 2014), leite de cabra (Almeira Júnior *et al.*, 2015), queijo grego (Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 2011), queijo português (Ratão, 2010) e queijos da Serra da Canastra e Serrano (Nóbrega, 2012). Apesar da sua importância em produtos lácteos, neste trabalho o género *Lactobacillus* aparece apenas em 5,18% dos isolados. Resultados similares foram encontrados por Ramos (2009) e Albuquerque (2010), que pesquisaram BAL em Queijo de Coalho de Alagoas e de Pernambuco, Brasil, e que encontraram percentagens de 4,6% a 13,55% de *Lactobacillus* nos isolados de BAL. No presente trabalho a percentagem de espécies do género *Lactobacillus* variou entre as microrregiões, sendo de 28,8% desse género isolados da região de Cajazeiras (R2), de 11,8% na região de Sousa (R3) e de 1,5% na região de Patos (R4).

O género *Leuconostoc*, que também compõe a microbiota láctica, é considerado importante na produção de derivados de laticínios, devido à sua ação adjuvante na produção de aroma em produtos lácteos (Hassan e Frank, 2001). Neste trabalho, a espécie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* foi isolada de Queijo de Coalho na microrregião de Catolé do Rocha (R1) e na microrregião de Patos (R4). Vários investigadores isolaram espécies do género *Leuconostoc* a partir de amostras de leite e queijos artesanais. Freitas (2011), Albuquerque (2010) e Ramos (2009) identificaram este género em Queijo de Coalho de diferentes regiões de Pernambuco e Alagoas. *Leuconostoc* também foi isolado em queijos de Espanha (Alegria *et al.*, 2009), leite de ovelha cru fresco (Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 2011), queijos da Bósnia e Herzegovina (Terzic-Vidojevic *et al.*, 2014) e de queijos Canastra e Serro (Nóbrega, 2012).

Weissella paramesenteroides foi identificada em Queijo de Coalho produzido na microrregião de Patos (R4). Borelli (2006) também encontrou esta espécie em queijo artesanal de Minas Gerais, na região da Serra da Canastra.

Trabalhos realizados em Espanha (Mas *et al.*, 2002) e na Grécia (Gerasi *et al.*, 2003) também isolaram *W. paramesenteroides* de queijos artesanais. No Brasil, existem registos de espécies de *Weissella* isoladas de queijos artesanais: Guedes Neto (2008) isolou *Weissella confusa* em Queijo de

Coalho de Pernambuco e Ferreira *et al.* (2015) isolaram *W. paramesenteroides* do queijo Marajó produzido no Estado do Pará, Brasil.

Microrganismos deste género estariam envolvidos em reações de proteólise, importantes no desenvolvimento de *flavour* de queijos maturados (Guedes Neto, 2008). Até à introdução das técnicas moleculares na identificação de microrganismos, a *Weissella* era classificada como *Lactobacillus*, não havendo registo de espécies deste género isoladas em queijos do Brasil antes do século XXI.

Os resultados deste trabalho contribuem para o conhecimento sobre a diversidade de espécies que compõe a microbiota láctica dos Queijos de Coalho produzidos no Estado da Paraíba, e com isso ajudar na seleção de linhagens de BAL específicas da região para a produção de um produto artesanal com origens geograficamente específicas, para ser utilizado no processo de industrialização deste queijo, mantendo deste modo as suas características organolépticas, sem expor a população a riscos pelo consumo de produtos microbiologicamente contaminados.

No entanto, na pesquisa das espécies de BAL presentes no Queijo de Coalho produzido no Sertão da Paraíba, outras espécies não lácticas foram identificadas, conforme mostra a Tabela 5.4. A maioria das espécies não lácticas pertence aos géneros da família *Enterobacteriaceae* como *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Shigella*. Além dessas bactérias de outros géneros e potencialmente patogénicas também foram identificadas como foi o caso de *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*.

Das espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae* a espécie *Escherichia coli* foi a que apresentou o número de colónias mais elevado, com 39 isolados. bactéria *gram* negativa, com formato de bastonete, fermentadora de lactose com produção de ácido láctico, a *E. coli* é associada a um risco para população, pela possibilidade de veicular estirpes como EPEC (*E. coli* enteropatogénica), EIEC (*E. coli* enteroinvasiva) e ETEC (*E. coli* enterotoxigénica). A presença desta espécie em queijos está associada a condições higiénicas e sanitárias precárias e é responsável por provocar danos aos próprios queijos como estufamento e alteração do formato ou sabor do produto.

A identificação da *E. coli* em queijos artesanais tem sido relatada por vários autores no Brasil (Nóbrega, 2012; Guedes Neto, 2008; Feitosa *et al.*, 2003; Ramos, 2009; Oliveira *et al.*, 2010; Santana, 2008) e no mundo (Alegria, 2009; Ratão, 2011). Além da *E. coli* outras espécies *gram* negativas e termotolerantes como a *Klebsiella pneumoniae* e a *Shigella flexneri*, foram identificadas nesta pesquisa, sugerindo problemas relacionados a higiene no processamento do produto, indicando condições higiénicas e sanitárias insatisfatórias. No entanto, não foram identificadas estirpes de *Salmonella* em nenhuma amostra de Queijo de Coalho analisada neste trabalho.

Utilizando PCR-ribotipagem foi possível identificar espécies do género *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Macroccoccus*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, e *Staphylococcus* em isolados dos queijos estudados neste trabalho.

Tabela 5.4: Espécies de bactérias não ácido-lácticas isoladas de Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba, Nordeste, Brasil

Espécies identificadas com base na elevada identidade no score da região 16S (cepas agrupadas)	Número de acesso ao Gen Bank	Número de colônias por microrregião							TOTAL
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
<i>Brevibacillus brevis</i>	KU096918	0	0	1	0	0	0	0	01
<i>Cronobacter sakazakii</i>	KU096919/ KU096920	0	0	0	2	0	0	0	02
		0	0	0	1	0	0	0	01
<i>Enterobacter ludwigii</i>	KU096921	0	0	0	1	0	2	1	04
<i>Escherichia coli</i>	KU096922/KU096923/KU096924/KU096925/KU096926/KU096927/KU096928/KU096929/KU096930/KU096931/KU096932/KU096933/KU096934/KU096935/KU096936/KU096937/KU096938/KU096939/KU096940/KU096941/KU096942/KU096943/ KU096944/KU096945/KU096946	15	2	0	0	5	2	0	24
		6	1	0	0	1	0	7	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KU096947/KU096948/KU096949/KU096950/KU096951/KU096952/KU096953/KU096954/	0	2	1	5	0	0	0	08
		0	1	0	0	0	0	0	01
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	KU096955	0	0	0	0	0	1	0	01
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KU096956/KU096957/KU096958/KU096959/KU096960/KU096961/KU096962/KU096963/KU096964/KU096965	0	0	1	0	4	0	5	10
		0	0	3	0	5	1	3	12

(Tabela 5.4 continuação)

Espécies identificadas com base na elevada identidade no score da região 16S (cepas agrupadas)	Número de acesso ao Gen Bank	Número de colónias por microrregião							TOTAL
		R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
<i>Ralstonia sp.</i>	KU096966/KU096967/KU096968/KU096969	0	0	1	0	1	1	0	03
		0	0	2	0	3	2	0	07
<i>Shigella flexneri</i>	KU096981/KU096982/KU096983	2	0	0	0	0	1	0	03
<i>Staphylococcus aureus</i>	KU096970/KU096971/KU096972/KU096973/ KU096974/KU096975/KU096976/KU096977/ KU096978/KU096979/KU096980	0	0	10	0	0	1	0	11
		0	0	1	0	0	0	0	01
Total		23	06	20	09	19	11	16	104

Pseudomonas spp. são bactérias *gram* negativas, em forma de bastonetes, aeróbicas e não esporuladas que podem ser encontradas na água, ar, solo, poeira e vegetais. Esta bactéria é considerada o principal microrganismo psicotrófico associado à deterioração de alimentos refrigerados (Ramos, 2013). Espécies deste gênero podem ser encontradas em produtos lácteos como resultado de possível contaminação durante o processamento de alimentos frescos, refrigerados e congelados (Ramos, 2013). A presença de microrganismos psicotróficos está associada a alterações no *flavour*, na cor, sobretudo associadas a alterações proteolíticas e lipolíticas (Dogan e Boor, 2003).

De entre as bactérias patogênicas que causam doenças no homem e mastite em animais o *Staphylococcus aureus* é uma das mais frequentes e eficientes, e foi isolada em amostras de leite e derivados (Ratão, 2010). A identificação de estirpes de *S. aureus* neste trabalho evidencia um problema de saúde pública, devido ao risco dessas estirpes serem produtoras de enterotoxinas termorresistentes, e tornando os queijos onde foram identificadas como alimentos perigosos para o consumo *in natura*. No entanto esta ocorrência foi minoritária, pois das 28 amostras de Queijo de Coalho analisadas, apenas três apresentaram estirpes de *S. aureus*. A presença desta espécie sugere uma manipulação inadequada ou alguma falha no processo. A higienização inadequada de formas e utensílios ou a falha durante algumas etapas como a salga e a enformagem no processamento dos queijos podem contaminar o produto, mas a transmissão através do manipulador é a mais provável, já que o homem é o principal reservatório natural desta espécie. Várias pesquisas com queijos no Brasil e em outros países relatam a presença de *S. aureus* (Guedes Neto, 2008; Nóbrega, 2012; Quigley *et al.*, 2011; Litopoulou-Tzanetaki *et al.*, 2011; Ramos, 2009; Almeida Júnior *et al.*, 2015; Freitas, 2011; Oliveira, 2010; Santana, 2008; Riquelme *et al.*, 2015).

Espécies de *Ralstonia* sp. são bastonetes *gram* negativos que crescem bem em vários ambientes. Esta bactéria foi isolada a partir de amostras de soluções de cloreto de sódio abertas e fechadas e estéreis (Labarca *et al.*, 1999). Estirpes desta espécie crescem bem numa faixa de temperaturas de 15 a 42 °C. O gênero *Ralstonia* surgiu em 1995, depois de várias análises genotípicas da espécie *Pseudomonas pickettii* que sugeriram uma nova espécie, passando a ser classificada como *Ralstonia pickettii*. Espécies de *Ralstonia* foram isoladas de diversas fontes ambientais, industriais e clínicas, tendo sido alvo de pesquisas em água ultrapura, devido a ter sido identificada na formação de biofilmes em tubagem de distribuição de água ou sistemas de purificação de água (Ryan *et al.*, 2011).

Existem relatos na literatura de casos de septicemia por *R. pickettii* em humanos (Strateva, 2012). A presença de estirpes desse gênero em alimentos constitui um risco para a população, representando um perigo especialmente elevado para indivíduos imunocomprometidos. Alguns autores relatam o isolamento através de técnicas moleculares em queijo de leite de vaca (Delbes *et al.*, 2007). A identificação de oito estirpes de *Ralstonia* sp. nas amostras de Queijo de Coalho da Paraíba desperta interesse por se tratar do primeiro relato da presença de bactérias deste gênero isoladas neste produto. Apesar dos relatos de isolamento de espécies de *Ralstonia* em alimentos, trabalho recente relata a contaminação de kits de extração de ADN por esta espécie (Salter *et al.*, 2014).

Brevibacillus são bastonetes *gram* positivos e aeróbicos, geralmente encontrados no solo, matéria em decomposição, água e ar. O gênero surgiu em 1996, depois uma reclassificação do gênero *Bacillus* (Shida *et al.*, 1996). Pertencente ao Filo *Firmicute*, Ordem *Bacillales* e Família *Paenibacillaceae*, o

Brevibacillus agri, de acordo com a literatura, já foi isolado de leite esterilizado (Nakamura, 1997). Não existe registo na literatura da deteção de *Brevibacillus agri* em Queijos de Coalho.

Devido à importância cultural e socioeconómica da produção artesanal de Queijo de Coalho no estado da Paraíba, e o risco ao qual a população está exposta por consumir este produto produzido com leite cru, espera-se que os resultados obtidos neste trabalho possam contribuir para a solução deste problema, e para a melhoria da qualidade e segurança para o consumidor mantendo, no entanto, as características sensoriais e organoléticas do produto.

5.4 Conclusões

O Queijo de Coalho artesanal produzido no Sertão da Paraíba apresentou uma grande diversidade na microbiota de bactérias ácido-lácticas, representada pelos géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*;

O sequenciamento do gene 16S rARN é uma ferramenta bastante eficaz na identificação e diferenciação desses microrganismos;

A microrregião de Itaporanga foi a que apresentou maior população de UFC/g de queijo, enquanto a microrregião de Cajazeiras foi a que apresentou o menor número de colónias de BAL.

O número de colónias mesófilas foi maior do que o número de colónias termofílicas pode ser atribuído a uma possível padronização no processo de fabricação do queijo, sugestivo do não-cozimento da massa;

As espécies mais abundantes identificadas nas amostras de Queijo de Coalho foram *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subs. *lactis*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Lactococcus garvieae*;

Observou-se diferença na prevalência de espécies de BAL entre as microrregiões do Sertão Paraibano;

Na microrregião de Catolé do Rocha (R1) a prevalência foi do género *Streptococcus*, enquanto nas microrregiões de Cajazeiras (R2), Sousa (R3) e Patos (R4) a maior prevalência foi de espécies do género *Enterococcus*, e o género *Lactococcus* foi o mais abundante nas microrregiões de Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7);

A microrregião de Patos (R4) foi a que apresentou maior diversidade de espécies de BAL, identificando espécies dos seguintes géneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*;

O género *Enterococcus* foi o que apresentou maior diversidade, incluindo espécies como *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. italicus*;

Lactococcus foi o género que apresentou maior prevalência neste trabalho, tendo sido isolada em todas as microrregiões pesquisadas;

E. gallinarum, *E. casseliflavus*, *Lactococcus garvieae* e *S. macedonicus* foram isolados e identificados pela primeira vez em Queijo de Coalho artesanal no Brasil, não havendo registo o *L. garvieae* em queijos brasileiros;

Observou-se a ausência de alguns gêneros nas amostras de Queijo de Coalho, como na microrregião de Cajazeiras (R2) não foram isoladas espécies do gênero *Streptococcus* e nas microrregiões de Catolé do Rocha (R1), Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) não houve isolamento de espécies do gênero *Lactobacillus*;

Além das BAL, espécies não lácticas também foram isoladas e identificadas nas amostras de Queijo de Coalho da Paraíba, pertencendo a maioria a família *Enterobacteriaceae* como *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Shigella*, além da *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*;

A identificação das espécies que compõe a microbiota láctica dos Queijos de Coalho produzidos na Paraíba vem contribuir para a possibilidade de seleção de linhagens de BAL específicas para a região, na busca para a produção de um produto artesanal com origens geograficamente específicas, para ser utilizado no processo de industrialização deste queijo, sem comprometer suas características organolépticas e sem expor a população a riscos pelo consumo de produtos microbiologicamente contaminados.

Referências

- Achilleos, C. e Berthier, F. 2013. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. *Food Microbiology*, 36, 286-295.
- Acúrcio, L. B., Souza, M. R., Nunes, A. C. e Alvim, L. B. 2014. Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66, 940–948.
- Albesharat, R., Ehrmann, M.A., Korakli, M., Yazaji, S. e Vogel, R.F. 2011. Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 148-155.
- Albuquerque, T. C. 2010. Perfil microbiano láctico do Queijo de Coalho artesanal de Cachoeira-PE, Brasil. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Alegría, Á., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S. e Mayo, B. 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 44-51.
- Almeida, R.C. 2007. Caracterização bioquímica e genética de bactérias lácticas isoladas de queijo Serrano. Dissertação (Mestrado), Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul.
- Almeira Júnior, W. L. G., Ferrari, I S., Souza, J. V., Silva, C. D. A., Costa, M., MATIUZZI, M. e DIAS, F. S. 2015. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. *Food Control*, 53, 96–103.
- Alves, L.M.C., Amaral, L.A., Correa, M.R. e Sales, S.S. 2009. Qualidade microbiológica de leite cru e de Queijo de Coalho comercializado informalmente na cidade de São Luiz-MA. *Pesquisa em Foco*, 17, 1-13.
- André, M., Campos, M., Borges, L. J., Kipnis, A., Pimenta, F. C. e Serafini, Á. B. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control*, 19, 200–207.

Assis, B.S. 2010. Efeito de *L. rhamnosus* e de *L. lactis* isolados de Queijo de Coalho na viabilidade e produção de enterotoxina B para *S. aureus* FRI-S6 em queijo. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Bassi, D., Puglisi, E. e Cocconcelli, S. 2015. Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*, 52, 106-118.

Borelli, B.M. 2006. Caracterização das bactérias lácticas, leveduras e das populações de *Staphylococcus* enterotoxigênicos durante a fabricação do queijo minas curado produzido na Serra da Canastra – MG. Dissertação (Doutoramento), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Borges, M.F. 2006. Diagnóstico da contaminação por bactérias patogênicas em uma indústria processadora de Queijo de Coalho e detecção de genes associados a fatores de virulência. Dissertação (Doutoramento), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

Bozoudi, D., Kotzamanidis, C., Hatzikamari, M., Tzanetakis, N., Menexes, G. e Litopoulou-Tzanetaki, E. 2015. A comparison for acid production, proteolysis, autolysis and inhibitory properties of lactic acid bacteria from fresh and mature FETA PDO Greek cheese, made at three different mountainous areas. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 87-96.

Carr, F. J., Chill, D. e Maida, N. 2002. The acid lactic bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28, 281-370.

Casalta, E. e Montel, M. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms : The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 271–273.

Cavalcante, J., Furtado, N., Ferreira, M., Pinto, C., Oliveira, C. e Elard, E. 2007. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 205–214.

Carvalho, J. 2007. Caracterização da microbiota láctica isolada de Queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. Dissertação (Doutoramento), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Coelho, M. C., Silva, C. C. G., Ribeiro, S. C.; Dapkevicius, M. L. N. E. e Rosa, H. J. D. 2014. Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 191, 53–59.

Dantas, D.S. 2012. Qualidade microbiológica do Queijo de Coalho comercializado no município de Patos-PB. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

Delbes, C., Ali-Mandjeel, L. e Montel, M.C. 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and independent 16S rRNA genes based analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1882-1891.

Dogan, B. e Boor, K. 2003. Genetic diversity and spoilage potencial among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 130-138.

Dolci, P., Alessandria, V., Zeppa, G., Rantsiou, K., e Cocolin, L. 2008. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food microbiology*, 25, 392-399.

Feitosa, T., Borges, M.F., Nassu, R.T., Azevedo, E.H.F., Muniz, C.R. 2003. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênico- sanitários em queijos produzidos no Rio Grande do Norte. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 162-165.

Ferreira, A.A., Seixas, V.N.C., Eller, M.R., Nero, L.A., Carvalho, A.F. 2015. Diversity of lactic acid bacteria in Marajó chees produced in the Amazon Region, Brazil. 28º Congresso Brasileiro de

Microbiologia, Disponível em <http://sbmicrobiologia.org.br/cd28cbm/resumos/R1026-1.PDF>. Consultado em 16 de agosto de 2016.

Ferreira, C. L. L. F. 2003. Grupo de bactérias lácticas caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. IN: *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 7- 33.

FAO. 1990. Animal production and health-The thecnology of tradicional milk products in developing countries. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/t0251e/t0251E13.htm>. Consultado a 1 de dezembro de 2015.

Fortina, M. G., Ricci, G. e Borgo, F. 2009. A study of lactose metabolism in *Lactococcus garvieae* reveals a genetic marker for distinguishing between dairy and fish biotypes. *Journal of Food Protection*, 6, 1248-1254.

Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M. e McSweeney, P.L.H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*, Springer US, Nova Iorque, p.588.

Freitas, W.C. 2011. Aspectos higiênico-sanitários, físico-químicos e microbiota láctica de leite cru, Queijo de Coalho e soro de leite produzidos no Estado da Paraíba. Tese (Doutoramento), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa.

Fuka, M.M., Engel, M., Skelin, A., Redžepović, S. e Schloter, M. 2010. Bacterial communities associated with the production of artisanal Istrian cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 19-24.

Gaaloul N., Braiek O. B., Berjeaud, J. M., Arthur T., Cavera, V. L., Chikindas M. L., Hani K. e Ghrairi, T. 2014. Evaluation of antimicrobial activity and safety aspect of *Enterococcus italicus* GGN10 strain isolated from Tunisian bovine raw milk. *Journal of Food Safety*, 34, 300–311.

Gerasi, E., Litopoulou-Tzanetaki, E. e Tzanetakis, N. 2003. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the greek island Sifnos. *International Journal Dairy Technology*, 56, 117–122.

Giannino, M.L. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 188-195.

Gandra, E. A.; Gandra, T. K. V; De Mello, W. S. e Da Godoi, H. 2008. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. *Acta Scientiarum - Technology*, 30, 109–118.

Garnica, M.L., Saéz-Nieto, J.A., González, R., Santos, J.A., Gonzalo, C. 2014. Diversity of gram-positive catalase-negative cocci in sheep bulk tank milk by comparative 16 rDNA sequence analysis. *International Dairy Journal*, 34, 142-145.

Georgalaki, M., Manolopoulou, E., Anastasiou, R., Papadelli, M., Tsakalidou, E. 2009. Detection of *Streptococcus macedonicus* in Greek cheeses. *International Dairy Journal*, 19, 96-99.

Golic, N., Cadez, N., Terzic-Vidojevic, A., Suranska, H., Beganovic, J., Lozo, J., Kos, B., Suskovic, J., Raspor, P. e Topisirovic, L. 2013. Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in tradicional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology*, 166, 294-300.

Guedes Neto, L. G. 2008. Isolamento, identificação e avaliação de características probióticas de bactérias ácido-lácticas isoladas de amostras de Queijo de Coalho produzidas em Pernambuco – Brasil. Tese (Doutoramento), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

Guedes Neto, L.G., Souza, M.R., Nunes, A.C., Nicoli, J.R. e Santos, W.L.M. 2005. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de Queijo de Coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, 245-250.

- Hassan, A.N. e Frank, J. F. Starter cultures and their use. In: Marth, E. H. e Steele, J. L. 2001. *Applied Dairy Microbiology*, Marcel Decker, Nova Iorque, 53-58.
- Holtzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. e Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 365S-373S.
- Jans C., Follador, R., Lacroix, C., Meile, L., e Stevens, M.J.A. 2012. Complete genome sequence of the african dairy isolate *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* strain CJ18. *Journal of Bacteriology*, 194, 2105-2106.
- Jans, C., Kaindi, D.W.M., Bock, D., Njage, P.M.K., Kouamé-Sina, S.M., Bonfoh, B., Lacroix, C. e Meile, L. 2013. Prevalence and comparison of *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* and *Streptococcus gallolyticus* subsp. *macedonicus* in raw and fermented dairy products from East and West Africa. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 186-195.
- Jay, J. M. 2005. *Microbiologia dos alimentos*, Artmed, Porto Alegre.
- Kongo, J.M., Ho, A.J., Malcata, F.X. e Wiedmann, M. 2007. Characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from São Jorge cheese, using biochemical and ribotyping methods. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1838-1844.
- Kullen, M.J., Sanozky-Dawes, R.B., Crowell, D.C. e Klaenhammer, T.R. 2000. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 511-516.
- Labarca, J.A., Trick, W.E., Peterson, C.L., Carson, L.A., Holt, S.C., Arduino, M.J., Meylan, M., Mascola, L. e Jarvis, W.R. 1999. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. *Clinical Infectious Diseases*, 29, 1281-1286.
- Lima, M.H.P., Telles, F.J.S., Macedo, B.A. e Benevides, S.D. 1998. Elaboração de Queijo de Coalho a partir de leite pasteurizado e inoculado com *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*: Aspectos bioquímico e sensorial. *Boletim CEPPA*, 16, 37-44.
- Litopoulou-Tzanetaki, E. e Tzanetakis, N. 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101, 17-32.
- Luz, I.S. 2008. Caracterização molecular das toxinas em *Staphylococcus aureus* isolados de leite e Queijo de Coalho em município da região agreste de Pernambuco. Dissertação (Mestrado), Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G. e Malcata, F.X. 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology*, 21, 233-240.
- Martín-Platero, A.M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J. e Martínez-Bueno, M. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*, 26, 294-304.
- Mas, M., Tabla, R., Moriche, J., Roa, I., Gonzalez, J., Rebollo, J.E. e Cáceres, P. 2002. Ibore goat's milk cheese: Microbiological and physicochemical changes throughout ripening. *Le Lait*, 82, 579-587.
- Mehmeti, I., Muji, S., Diep, D.B., Nes, I.F. 2015. High frequency of the potential pathogen *Lactococcus garvieae* in raw milk from Kosovo. *Food Control*, 53, 189-194.
- Menezes, S.S.M., Crz, F.T. e Menasche, R. 2010. Queijo de Coalho e Queijo Artesanal Serrano: identidades de produtores e de consumidores associadas a atributos de qualidade. *VIII Congresso Latinoamericano de Sociologia Rural*, Porto de Galinhas, Brasil.

Monte, M., Buchin, S., Mallet, A., Delbes-Paus, C., Vuitton, D.A., Desmasures, N. e Berthier, F. Microbiology Traditional cheeses : Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177, 136–154.

Moraes, C.R.M., Fuentefria, A.M., Zaffaria, C.B., Conte, M., Rocha, J.P.A. Spanemberg, A., Valente, P., COrça G. e Costa, M. 2005. Qualidade microbiologica de leite cru produzido em cinco municipios do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Scientiae Vetrinariae*, 33, 259-264.

Nóbrega, J.E. 2012. Biodiversidade microbiana, descritores físico-químicos e sensoriais dos queijos artesanais fabricados nas regiões da Serra de Canastra e do Serro, Minas Gerais. Dissertação (Doutoramento), Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa.

Nakamura, L.K. 1997. Reclassification of "Bacillus pulvifaciens" group II as *Brevibacillus agri*. *Current Microbiology*, 34, 233-240.

Oliveira, K.A., Evencio Neto, J., Paiva, J.E. e Melo, L.E.H. 2010. Qualidade microbiologica do Queijo de Coalho comercializado no municipio de Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. *Arquivo Instituto de Biologia*, 77, 435-440.

Oliver, S., Jayarao, B. e Almeida, R. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environmental: food safety and public health implications. *Foodborne Pathogenes Diseases*, 2, 115-129.

Orsahin, H. 2012. Quality characteristics and shelf-life of 'Armola' cheese. Dissertação (Mestrado), Izmir Institute of Technology, Izmir.

Ortoloni, M.B.T. 2009. Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queij Minas Frescal: Isolamento de ulturas bactriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Viçosa.

Pacini, F., Cariolato, D., Andrighetto, C., Lombardi, A. 2006. Occurrence of *Streptococcus macedonicus* in Italian cheeses. *FEMS Microbiology Letters*, 261, 69-73.

Pangallo, D., Saková, N., Korenová, J., Puskarová, A., Kraková, L., Valík, L. e Kuchta, T. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 170, 38–42.

Queiroz, A.A.M. 2008. Caracterização molecular de bactérias ácido lácticas com potencial tecnológico para produção de Queijo de Coalho no Ceará. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

Quigley, L., Sullivan, O.O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. e Cotter, P.D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150, 81–94.

Ramos, A.C.S. 2009. Caracterização e seleção tecnológica de cultura láctica isoladas de Queijo de Coalho do sertão alagoano. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

Ramos, M.S. 2013. Isolamento e caracterização de bacteriofagos para biocontrole de *Pseudomonas* spp. em queijo minas frescal. Dissertação (Mestrado), Univerisdade Federal de Minas Gerais, Viçosa.

Ratão, I.M.C. 2010. Microbiological and chemical characterization of traditional cheese made from milk produced by the Algarvian goat breed. Dissertação (Doutoramento), Universidade de Cranfield, Bedfordshire, Reino Unido.

Riquelme, C., Câmara, S., Dapkevicius, M.L.N.E., Vinuesa, P., Silva, C.C.G., Malcata, F.X. e Rego, O.A. 2015. Characterization of the bacterial biodiversity in Pico cheese (an artisanal Azorean food). *International Journal of Food Microbiology*, 192, 86–94.

- Ryan, M.P., Pembroke, J.T., Adley, C.C. 2011. Genotypic and phenotypic diversity of *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa* isolates from clinical and environmental sources including high-purity water. Diversity in *Ralstonia pickettii*. *BMC Microbiology*, 11, 2-11.
- Salter, S.J., Cox, M.J., Turek, E.M., Caws, S.T., Calus, S.T., O'Cookson, W., Moffatt, M.F., Turner, P., Parkhill, J., Loman, N.J. e Walker, A.W. 2014. Reagents contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biology*, 87, 2-12.
- Santana, R.F., Santos, D.M., Martinez, A.C.C. e Lima, A.S. 2008. Qualidade microbiológica de Queijo de Coalho comercializado em Aracajú, Sergipe. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60, 1517-1522.
- Santarelli, M., Bottari, B., Lazzi, C., Neviani, E., Gatti, M. 2013. Survey on the community and dynamics of lactic acid bacteria in Grana Padano cheese. *Systematic and Applied Microbiology*, 36, 593-600.
- Santos, K.M.O., Vieira, A.D.S, Buriti, F.C.A., Nascimento, J.C.F., Melo, M.E.S. et al. 2015. Artisanal Coalho cheese as source of beneficial *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* strain. *Dairy Science & Technology*, 95, 209-230.
- Santos Neto, T.M.S. 2010. Caracterização da microbiota láctica, não láctica e utilização do tratamento ôhmico para processamento de Queijo de Coalho. Dissertação (Doutoramento), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M.D., Regnault, B., Grimont, P.A.D., Bouvet, A. 2000. *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov. and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal Systematic Evolution Microbiology*, 50, 1425–1434.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. e Komagata, K. 1996. Proporsal for two genera *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 939-946.
- Silva, L. F. 2011. Identificação e caracterização da microbiota láctica isolada de queijo Mussarela de búfala. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- Silva, N., Junqueira, V. C. A., Silveira, N.F.A., Taniwaki, M.H., Santos, R.F.S., Gomes, R.A.R. 2007. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. Varela, São Paulo: Varela, p. 552.
- Silva, R.A., Bismara, P.A., Moura, R.B., Lima Filho, J.L., Porto, A.L.F., Cavalcanti, M.T.H. 2012. Avaliação da microbiota bacteriana do Queijo de Coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 64, 1732-1738.
- Strateva, T., Kostyanov, T. e Setchanova, L. 2012. *Ralstonia pickettii* sepsis in a hemodialysis patient from Bulgaria. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16, 400-401.
- Terzic-Vidojevic, A., Mihajlovic, S., Uzelac, G., Veljovic, K., Tolinacki, M., Nikolic, M., Topisirovic, L. e Kojic, M. 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams and sweet kajmaks over four seasons. *Food Microbiology*, 39, 27–38.
- Tormo, H., Lekhal, D.A.H. e Roques, C. 2015. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 9-15.
- Viana, A.C. 2009. Avaliação de Queijo de Coalho produzido com bactérias lácticas endógenas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Bahia, Salvador.
- Veljovic, K., Terzic-Vidojevic, A., Vukasinovic, M., Strahinic, I., Begovic, J., Lozo, J., Ostojic, M., Topisirovic, L. 2007. Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2142-2152.

Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C., Woods, G.L. 2008. *Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution Background. *Microbiological Reviews*, 51, 221-271.

Wouters, J.T., Ayad, E. H., Hugenholtz, J. e Smit, G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 91-109.

Yu, J., Wang, H.M., Zha, M.S., Qing, Y.T., Bai, N., Ren, Y., Xi, X.X., Liu, W.J., Meghe, B.L.G., Zhang, H.P. 2015. Molecular identification and quantification of lactic acid bacteria in traditional fermented dairy foods of Russia. *Journal Dairy Science*. 93, 5143–5154.

Zaffari, C. B. 2005. Detecção de *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Brucella sp* em queijos produzidos artesanalmente na região litorânea do Rio Grande do Sul. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CAPÍTULO

Correlações entre parâmetros avaliados nos queijos individuais

6

6.1 Correlações entre parâmetros de avaliação físico-química e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba

As correlações entre os parâmetros de avaliação físico-química e os restantes parâmetros de avaliação, considerando os ácidos gordos agrupados em grupos funcionais e os microrganismos agrupados em géneros, são apresentadas na Tabela 6.1.

Tabela 6.1: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação físico-química dos queijos individuais e os restantes parâmetros de avaliação considerando os ácidos gordos agrupados em grupos funcionais e os microrganismos em géneros.

Parâmetros*	pH	Proteína	Gordura	Cinzas	Cloretos
Cloretos				0,55	
Cor Amarelada				0,56	
Sabor Salgado					0,71
Sabor Ácido	-0,71				
Textura Macia		-0,62			
Textura Borrachosa		0,71			
Textura Seca		0,57			
CT	-0,58				
Lactococcus		-0,57			

*São apresentados os parâmetros que obtiveram valores de $p \geq 0,6$

Apresentam-se também os coeficientes de correlação de Pearson que atingem o valor de 0,6, mas apenas por arredondamento à décima.

O pH apresentou uma correlação negativa com o sabor ácido o que é expectável pois, quanto mais baixo o pH, maior a quantidade de espécies ácidas presentes. Observou-se uma correlação negativa do pH com os valores de coliformes totais ($p = -0,58$), o que indica um efeito de inibição da proliferação destes microrganismos em queijos com maior acidez livre.

Como seria também de esperar, observa-se uma correlação forte entre o teor de cloretos e o sabor salgado, bem como entre o teor de proteína e a textura borrachosa. O teor de proteína está também negativamente correlacionado com o parâmetro sensorial textura macia que predomina em queijos com maior teor de gordura.

O teor de proteína apresentou uma correlação positiva com a textura seca, que reflete o efeito da proteína na textura da massa de leite coagulada, à semelhança do que é observado para o parâmetro textura borrachosa. O teor de proteína apresentou também uma correlação negativa com a quantidade de microrganismos do género *Lactococcus*, o que pode refletir o consumo de espécies proteicas da matriz queijo, durante o período de maturação, por parte destes microrganismos.

O teor de cinzas apresenta correlações positivas com o teor de cloretos (o que é normal tendo em conta que o primeiro engloba o segundo) e com a cor amarelada; no caso deste último parâmetro, esta associação pode resultar do contributo de alguns componentes das cinzas para a cor do queijo.

As correlações entre os parâmetros de avaliação físico-química e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e dos microrganismos individuais são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação físico-química e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e das colónias individuais

Parâmetros*	C14:0a	EcFm	LcLL
Gordura		-0,63	
Proteína			-0,67
Cinzas	-0,62		

*São apresentados os parâmetros que obtiveram valores de $p \geq 0,6$

As correlações entre os parâmetros de avaliação físico-química e as concentrações de ácidos gordos individuais e o número de colónias de microrganismos individuais apresentaram coeficientes ligeiramente superiores a 0,6, o que lhes confere a classificação de correlações fortes, apesar de se situarem na parte inferior do correspondente intervalo.

A correlação negativa entre os teores de gordura e de proteína e respetivamente o número de colónias de EcFm (*Enterococcus faecium*) e LcLL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), pode refletir uma maior eficácia destes microrganismos em consumir substratos lipídicos e substratos proteicos.

6.2 Correlações entre os parâmetros de avaliação sensorial e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba.

Não se observaram correlações fortes ou muito fortes entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações relativas de ácidos gordos agrupados segundo grupo funcional e o número de colónias de microrganismos agrupados por género. O coeficiente de correlação entre o número de colónias de microrganismos do género *Lactobacillus*, e a classificação atribuída ao parâmetro textura seca apresentou o valor de 0,55 que, por arredondamento à décima, se situa no valor limite estabelecido para as correlações fortes. Dado que este género representa uma parte importante da microbiota do queijo, a sua maior proliferação pode estar de algum modo associada a uma modificação da atividade da água na matriz queijo que pode ser percecionada de forma distinta pelos elementos do painel de provadores.

As correlações entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e o número de colónias de microrganismos individuais são apresentadas na Tabela 6.3.

Tabela 6.3: Coeficientes de correlação de Pearson entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e do número de colónias de microrganismos individuais.

Parâmetros*	C13:0b	C20:0	EcYt	LbFe
Aparência Molhada				-0,55
Sabor Salgado			0,58	
Textura Macia	0,60	0,55		

*São apresentados os parâmetros que obtiveram valores de $\rho \geq 0,6$, por arredondamento à décima

Não se encontraram muitas correlações fortes ou muito fortes entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações de ácidos gordos individuais, exceto dos ácidos gordos C13:0b e C20:0 com o parâmetro textura macia; esta observação é coerente com o efeito do teor de gordura na textura do queijo.

Apesar de se situar no limite do intervalo de definição observou-se uma correlação positiva do número de colónias de EcYt (*Enterococcus italicus*) com o sabor salgado, o que pode refletir uma alteração do sabor da matéria-prima leite por contaminação com este microrganismo.

O número de colónias de LbFe (*Lactobacillus fermentum*) apresentou uma correlação negativa com a aparência molhada o que pode ser uma consequência de uma sequestração da água disponível no queijo pelo crescimento microbiano.

Não se observaram correlações fortes ou muito fortes entre as concentrações relativas de ácidos gordos agrupados por grupos funcionais (AGS, AGI, AGMI, AGDI e AGPI) e o número de colónias de microrganismos, considerados individualmente ou agrupados por género (BAC, CM, CT, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, BAL-Total, BNL-Total).

As correlações entre as concentrações relativas de ácidos gordos individuais e o número de colónias de microrganismos individuais ou agrupados por género são apresentadas na Figura 6.1.

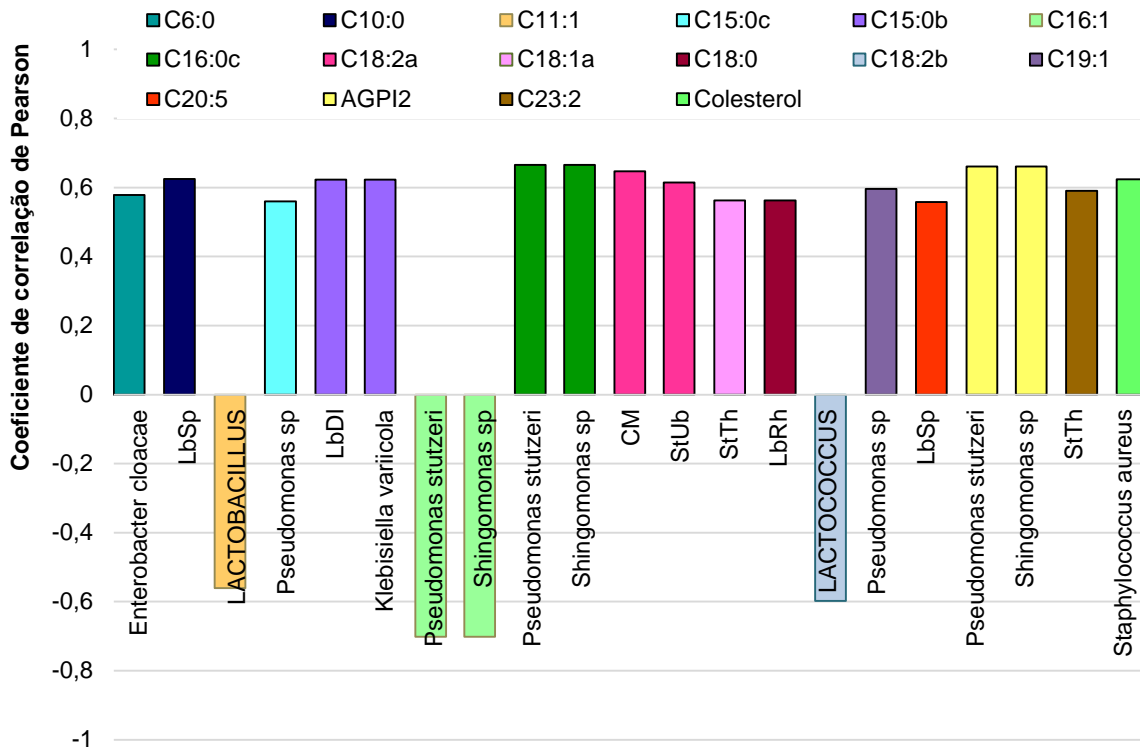


Figura 6.1: Coeficientes de correlação de Pearson $\geq 0,6$ entre concentrações de ácidos gordos individuais e o número de colônias de microrganismos individuais ou agrupados por género.

De maneira geral, as correlações positivas moderadamente fortes entre os ácidos gordos individuais e o número de microrganismos podem traduzir uma tendência de que alguns ácidos gordos possam ser resultado do metabolismo dos microrganismos, uma vez que alguns grupos destes podem estar produzindo outros ácidos gordos através da hidrogenação da sua cadeia lateral. Outra hipótese, decorre do fato dos queijos serem artesanais, ou seja, produzidos com leite cru e serem queijos frescos, sendo influenciados pela ação dos microrganismos, através da biohidrogenação a nível de rumem.

Lucatto e colaboradores (2014) relatam que vários microrganismos presentes no rumem são responsáveis pela transformação e metabolismo dos ácidos gordos e inclusivamente, que determinadas bactérias lácticas são inibidas pela presença em excesso de alguns ácidos gordos, como o ácido linoleico e ácidos gordos polinsaturados.

6.3 Correlações entre parâmetros médios para os queijos da mesma região

Ao calcular o valor médio de cada parâmetro avaliado para os 4 queijos de cada região procurou-se obter um valor representativo dessa região e minimizar as variações individuais que podem afetar alguns dos queijos analisados.

Avaliou-se a co-variância desses valores médios de forma análoga ao que foi efetuado para os valores individuais para cada queijo.

6.3.1 Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação físico-química por região e as médias dos restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba, por microrregião de produção.

As correlações por regiões entre as médias dos parâmetros físico-químicos, as médias da avaliação sensorial e as médias das concentrações de ácidos gordos agrupados por grupo funcional e as médias do número de colónias agrupadas por género, são apresentadas na Tabela 6.4.

Tabela 6.4: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre as médias dos parâmetros físico-químicos, as médias da avaliação sensorial e as médias das concentrações de ácidos gordos agrupados por grupo funcional e as médias do número de colónias agrupadas por género.

Humidade	Sabor Queijo Fresco				
	0,82				
pH	Sabor Manteiga	CM	BAC	CT	Aroma Manteiga
	0,80	-0,81	-0,83	-0,89	0,92
Gordura	Proteína	<i>Lactobacillus</i>	Textura Seca	Textura Macia	
	-0,77	-0,82	-0,87	0,89	
Proteína	BAL-Total	Textura Macia	<i>Lactococcus</i>		
	-0,77	-0,78	-0,82		
Cinzas	<i>Enterococcus</i>				
	-0,78				
Cloretos	Aparência Molhada	<i>Leuconostoc</i>			
	-0,86	-0,91			

*São apresentados os parâmetros que obtiveram valores de $\rho \geq 0,6$ e com nível de significância de 0,05 ou 0,01.

A humidade apresentou uma correlação muito forte com o sabor de queijo fresco o que pode evidenciar a dissolução de componentes responsáveis pelo sabor do queijo na água livre tornando-os mais perceptíveis pelas papilas gustativas durante a avaliação sensorial.

O pH apresentou uma correlação fortemente positiva com o sabor a manteiga e o aroma de manteiga pois quanto mais elevado o pH, menor será a acidez livre e mais perceptíveis serão outras características sensoriais como o aroma e sabor a manteiga.

O teor de gordura correlacionou-se positivamente com a textura macia e negativamente com o teor de proteína, bem como com a textura seca; quanto maior o teor de gordura maior será a quantidade de material não proteico na amostra logo menor será o teor de proteína e menor será o impacto dessa fração proteica na textura do queijo nomeadamente a percepção de textura seca.

O teor de gordura também se correlacionou negativamente com o número de colónias de *Lactobacillus* o que pode refletir a lipólise promovida por estes micro-organismos e a sua utilização dos ácidos gordos como fonte de energia e para fins estruturais (estruturas lipoproteicas das membranas celulares).

Uma tendência semelhante foi observada para o teor de proteína que apresentou correlações negativas com o crescimento microbiano expresso nas variáveis BAL-Total e *Lactococcus* totais, o que pode resultar das necessidades metabólicas associadas à proliferação microbiana.

O teor de proteína também apresentou uma correlação negativa com o parâmetro sensorial Textura Macia que se correlacionou positivamente com o teor de gordura.

O teor de cinzas médio apresentou uma correlação negativa com o número médio de colônias de *Enterococcus* o que pode refletir uma inibição no crescimento destes organismos por componentes das cinzas entre os quais os cloretos.

Uma associação negativa semelhante foi encontrada entre o teor médio de cloretos e o número médio de colônias de micro-organismos do gênero *Leuconostoc*.

Tal como observado para o crescimento microbiano, também o valor médio do teor de cloretos por região apresentou uma correlação negativa com a aparência molhada pois a presença de maior quantidade de sais modifica a atividade da água na matriz e a sua percepção pelos provadores.

As correlações por região entre as médias dos parâmetros físico-químicos e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais e dos microrganismos individuais são apresentadas na Tabela 6.5.

Tabela 6.5: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre as médias dos parâmetros físico-químicos e as concentrações medias relativas dos ácidos gordos individuais e dos micro-organismos individuais.

Humidade	LeMM		<i>Escherichia sp.</i>				
	-0,76		-0,76				
pH	EcGa	LcL	StUb	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>
	-0,79	-0,87	-0,79	-0,79	0,76	-0,79	-0,79
Gordura	LbDI		LbPe	LbPI	LbPP	<i>Klebsiella variicola</i>	
	-0,84		-0,84	-0,84	-0,84	-0,84	
Proteína	LcLL						
	-0,87						
Cinzas	C14:0a						
	-0,77						

*São apresentados os parâmetros que obtiveram valores de $\rho \geq |0,6|$ e com nível de significância de 0,05 ou 0,01.

A humidade média por região apresentou uma correlação negativa com o número de colônias de diversos microrganismos o que reflete a necessidade de água livre para que o crescimento microbiano se processe.

Semelhante as correlações dos parâmetros individuais, observou-se uma correlação negativa forte da gordura e proteína com os microrganismos LbDI (*Lactobacillus delbrueki* subsp. *lactis*), LbPe (*Lactobacillus pentosus*), LbPI (*Lactobacillus plantarum*), LbPP (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*), *Klebsiella variicola* e LcLL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), respectivamente, quando analisado por região. Isto pode refletir a influencia da ação dos microrganismos na liposile e proteolise

do queijo, com uma tendência destes microrganismos em consumir substratos lipídicos e substratos proteicos.

6.3.2 Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação sensorial por região e os restantes parâmetros estudados nos queijos de Coalho do Sertão da Paraíba

Os coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação sensorial e o número de colónias de micro-organismos, que apresentaram um nível de significância de 0,01 ou 0,05 são apresentados na Tabela 6.6.

Tabela 6.6: Correlações por regiões entre as médias dos parâmetros de avaliação sensorial e o número de colónias de microrganismos individuais e agrupados por género.

Aroma Manteiga	CT		
	-0,98		
Sabor Queijo Fresco	<i>Lactococcus</i>	BAL-Total	
	0,87	0,84	
Sabor Salgado	BAL-Total	BNL-Total	
	0,80	-0,81	
Sabor Ácido	BAC	CM	BAL-Total
	0,85	0,90	0,87
Textura Borrachosa	AGS		
	-0,76		
Textura Seca	<i>Lactobacillus</i>		
	0,91		

Em termos regionais encontrou-se uma associação positiva forte ($\rho=0,8$) das BAL totais com o sabor salgado e com o sabor ácido ($\rho=0,87$), o que é uma evidência de que o crescimento da microbiota láctica promove as reações geradoras de compostos que contribuem para o sabor dos queijos, e em particular para o sabor ácido e sabor salgado, típicos do Queijo de Coalho. De entre as bactérias ácido lácticas os grupos que apresentam uma correlação positiva forte com o sabor ácido foram os bacilos ($\rho=0,85$), mas sobretudo os cocos mesofílicos ($\rho=0,90$). Os cocos termofílicos não só não apresentam uma correlação forte com as características sensoriais salgado ou ácido como ainda apresenta uma correlação negativa muito forte com o aroma a manteiga outra característica sensorial típica do Queijo de Coalho. Estes resultados indicam, portanto, que os cocos termofílicos são o grupo de bactérias lácticas que menos contribuem para as propriedades sensoriais do Queijo de Coalho, logo, não há vantagem em adotar métodos de processamento do queijo que estimulem a sua proliferação ou que desfavoreçam a proliferação das restantes bactérias lácticas como é o caso da cozedura da coalhada.

Observou-se que as bactérias não lácticas apresentam uma correlação negativa com o sabor salgado, o que indica que não participam no mesmo tipo de reações que as bactérias lácticas e ao

inibirem o seu crescimento limitam as reações de desenvolvimento do sabor e aroma do queijo. Assim verifica-se que a contaminação com bactérias não lácticas não só é um fator de risco microbiológico para o consumidor como inibe o desenvolvimento das propriedades organoléticas adequadas no queijo.

Em termos de géneros, encontrou-se uma associação muito forte entre o número de colónias de *Lactococcus* e o sabor a queijo fresco e entre o número de colónias de *Lactobacillus* e a textura seca, resultados que devem ser tidos em conta na elaboração de um fermento artificial.

Relativamente aos ácidos gordos, só foi encontrada uma correlação negativa entre o teor médio de ácidos gordos saturados e a textura borrachosa, o que indica que são estes ácidos gordos que mais afetam esta característica sensorial muito relacionada com a presença de proteína coagulada. Assim esta é uma indicação de que a utilização de leite com um teor de gordura muito elevado que geralmente está associado a teores de ácidos gordos saturados elevados, pode afetar a textura borrachosa que também é um atributo típico do Queijo de Coalho.

As correlações por regiões entre os parâmetros de avaliação sensorial e as concentrações relativas dos ácidos gordos individuais são apresentados nas Figura 6.2.

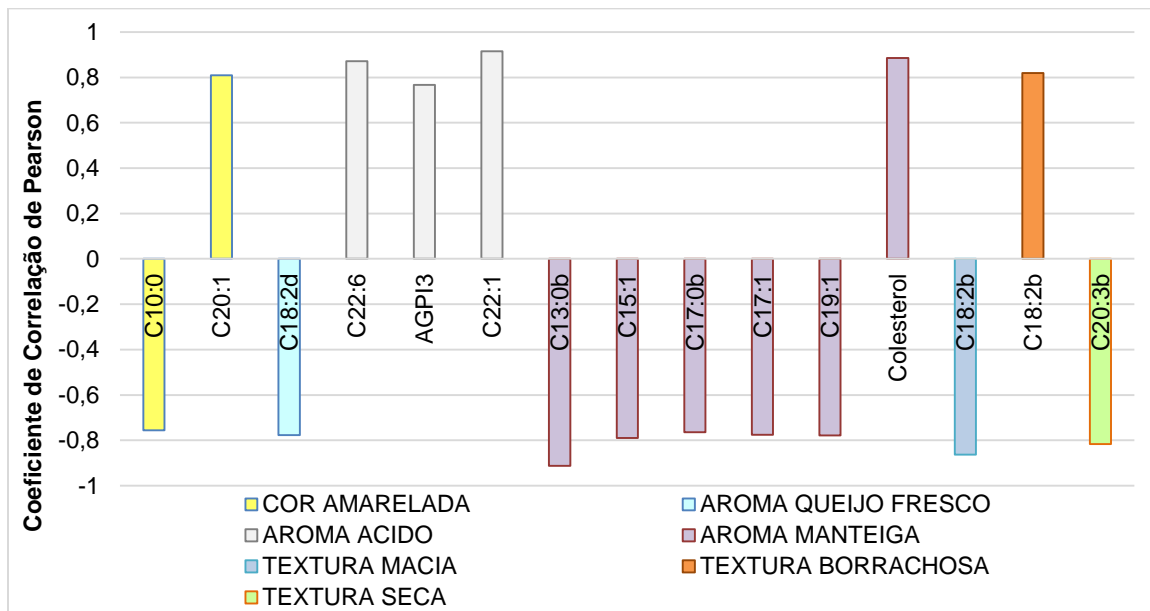


Figura 6.2: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre parâmetros de avaliação sensorial e concentrações de ácidos gordos individuais, com nível de significância de 0,01 ou 0,05.

Os parâmetros que apresentaram maior número de correlações fortes ou muito fortes com as concentrações de ácidos gordos foram o aroma ácido e o aroma de manteiga.

O aroma ácido apresenta uma correlação positiva forte ou muito forte com as concentrações de alguns ácidos gordos insaturados, sendo dois deles polinsaturados. Esta associação pode indicar que estes ácidos polinsaturados não são precursores de elementos do aroma ácido ou que as bactérias que mais promovem a formação de componentes responsáveis pelo aroma ácido são também produtoras destes ácidos gordos.

O aroma de manteiga apresenta uma correlação negativa forte muito forte com diversos ácidos gordos de número de carbono ímpar que são componentes minoritários ou mesmo vestigiais no perfil

de ácidos gordos da matéria-prima, o leite. Esta correlação negativa pode indicar que estes ácidos gordos podem funcionar como precursores de outros componentes do aroma que assim se sobrepõem ao aroma a manteiga ou que as bactérias lácticas que estimulam a formação desses outros componentes do aroma do queijo são também produtoras destes ácidos gordos.

Os coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre os parâmetros sabor a queijo fresco, sabor a manteiga, sabor salgado e sabor ácido e as concentrações de ácidos gordos individuais, com nível de significância de 0,01 ou 0,05, são apresentados na Figura 6.3.

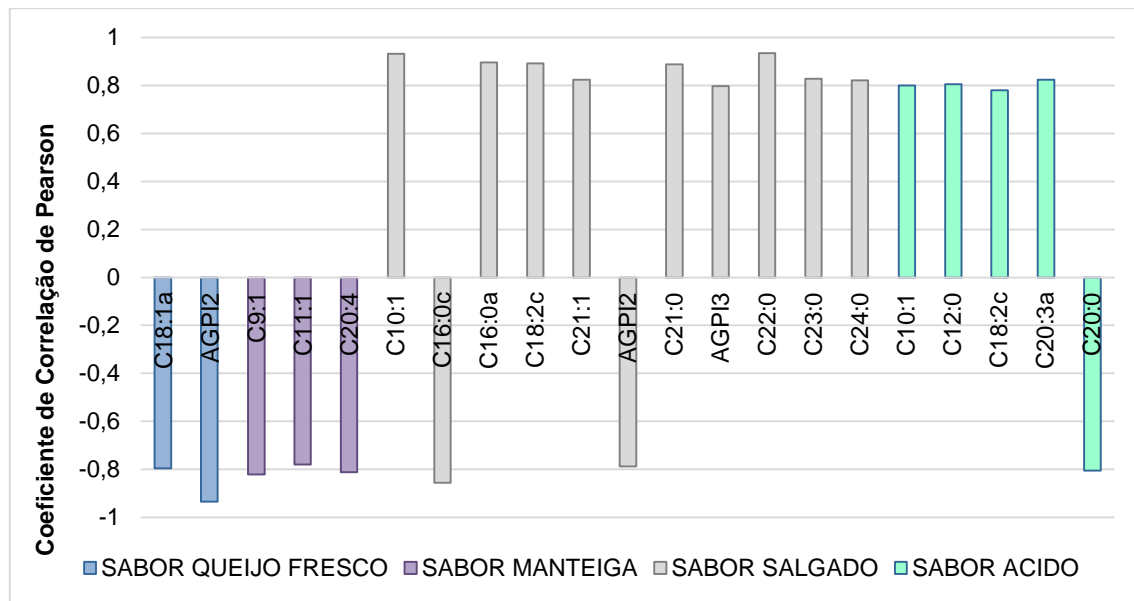


Figura 6.3: Coeficientes de correlação de Pearson por regiões entre os parâmetros sabor a queijo fresco, sabor a manteiga, sabor salgado e sabor ácido e as concentrações de ácidos gordos individuais, com nível de significância de 0,01 ou 0,05.

Tal como no caso do aroma ou textura, a correlação positiva forte entre determinadas características de sabor dos queijos e a presença de ácidos gordos específicos indica que ou estes ácidos gordos contribuem para uma determinada característica do sabor do queijo ou as bactérias responsáveis pela formação desses componentes do aroma são também produtoras desses ácidos gordos.

O sabor salgado foi o parâmetro de avaliação do sabor que apresentou maior número de correlações com a concentração de ácidos gordos, especialmente com ácidos gordos com mais do que 18 carbonos, que podem ser de origem microbiana.

O sabor ácido apresentou correlações positivas fortes ou muito fortes com ácidos de cadeia curta (C10:1 e C12:0) e com ácidos de cadeia mais longa, mas com 2 ou mais ligações duplas (C18:2 e C20:3).

Rodrigues e colaboradores (2011) avaliando a influencia de algumas bactérias pró-bióticas, composto pré-bióticos e maturação sobre o perfil dos FFA e CLA, observaram aumento de FFA e CLA durante todo período de maturação, especialmente nos queijos com adição das bactérias pró-bióticas. Alguns microrganismos foram identificados como potenciais produtores de CLA, sendo capazes de realizar a isomerização e a desidratação de um precursor de ácidos gordos responsáveis pela produção de CLA.

Por outro lado, as correlações negativas entre alguns ácidos gordos e determinadas características de sabor pode significar que esses são os ácidos gordos são precursores de compostos responsáveis por essa característica sensorial pois quanto maior a sua libertação por lipólise e a sua conversão noutros metabolitos mais intensa é a percepção desse atributo sensorial.

No caso do sabor a queijo fresco, verificou-se uma correlação negativa forte com o ácido oleico (C18:1) e com um ácido gordo polinsaturado, enquanto no caso do sabor a manteiga, verificou-se uma correlação negativa forte com as concentrações de C9:1, C11:1 e C20:4 que podem contribuir para outras características do sabor do queijo.

Segundo Perotti e colaboradores (2005) quando compararam o perfil de ácidos gordos livres no queijo argentino Reggianito e o Parmegiano Reggiano italiano concluíram que a lipólise que ocorre no queijo italiano produzido com leite cru e seu período de maturação é muito importante no perfil de todos os FFAs.

Referências

Lucatto, J.N., Mendonça, S.N.T.G., Drunkler, D.A. 2014. Ácido linoleico conjugado: estrutura química, efeitos sobre a saúde humana e análise em lácteos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 69, 199-211.

Perotti, M.C., Bernal, S.M., Meinardi, C.A., Zalazar, C.A. 2005. Free fatty acid profiles of Reggianito Argentino cheese produced with different starters. *International Dairy Journal*, 15, 1150–1155.

Rodrigues, D., Rocha-Santos, T., Gomes, A.M., Goodfellow, B.J., Freitas, A.C. 2011. Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles. *Food Chemistry*, 131, 1414–1421.

Tao, N., Depertes, E.J., German, J.B., Grimm, R., Lebrilla, C.B. 2009. Variations in bovine milk oligosaccharides during early and middle lactation stages analyzed by high-performance liquid chromatography-chip/mass spectrometry. *Journal of Dairy Science*, 92, 2991-3001.

CAPÍTULO 7

Conclusões finais e trabalhos futuros

Os resultados da caracterização físico-química, sensorial, microbiológica e química do Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba mostraram que os queijos analisados, de forma geral, apresentaram boa qualidade e corresponderam aos padrões definidos para o Queijo de Coalho.

Analisando por região, observou-se que os queijos apresentaram diferenças sensoriais que podem ajudar na definição de características dos queijos de Coalho produzido no Sertão da Paraíba. Na região 1 (Catolé do Rocha) os queijos apresentaram textura borrachosa, o que pode estar relacionado com uma maior presença de proteína e menor presença de gordura na massa coagulada, enquanto os queijos da região 2 (Cajazeiras) apresentaram aparência molhada e textura seca, que poderão estar relacionadas com o pH, que afeta sua capacidade de retenção de água. As amostras da região 4 (Patos) distinguiram-se por apresentarem cor amarela, que poderá traduzir uma maior proporção de gordura relativamente à quantidade de proteína. Na região 5 (Piancó), os queijos caracterizaram-se por valores elevados do teor de cinzas e teores baixos do teor de proteína, já os da região 6 (Itaporanga) distinguiram-se por apresentarem um sabor ácido, que pode estar associado às características da matéria-prima, como genética e fisiologia do rebanho, bem como fatores ambientais. Os queijos da região 7 (Serra do Teixeira) apresentaram textura macia, que pode estar associada ao teor de gordura que contribuem para uma textura mais macia e menos borrachosa da massa coagulada. Estas diferenças podem ser justificadas pelas diferenças no processo de produção e nas opções individuais de cada produtor, que afetam de forma relevante as propriedades dos queijos, sendo, por exemplo, da mesma região os queijos que apresentaram o maior e o menor teor de sal.

Foram identificados 57 ácidos gordos nas amostras de Queijo de Coalho, sendo predominantes os ácidos gordos saturados e monoinsaturados, em particular os ácidos: oleico (C18:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e mirístico (C14:0). Encontraram-se também concentrações relativamente elevadas de ácidos gordos di-insaturados, nomeadamente do ácido linoleico e do ácido linoleico conjugado. Os ácidos gordos polinsaturados incluíram o EPA e o DHA e foram a classe com menores concentrações totais, no entanto, foi esta classe que apresentou mais diferenças significativas entre as médias das amostras. Os queijos da região de Catolé do Rocha (R1), distinguiram-se dos restantes por apresentar a média mais baixa de ácidos gordos saturados, a média mais alta de ácidos gordos monoinsaturados, além de médias elevadas de ácidos gordos di-insaturados e polinsaturados, o que lhes confere características interessantes do ponto de vista nutracêutico. Já na região de Itaporanga (R6) os queijos apresentaram menor média de ácidos gordos insaturados, maior media de ácidos gordos saturados e uma média relativamente baixa de ácidos gordos polinsaturados, o que coloca algumas limitações ao seu valor nutricional e ao seu efeito fisiológico. As regiões Serra do Teixeira (R7) e Catolé do Rocha (R1) apresentaram médias mais elevadas de ácidos gordos polinsaturados, o que de alguma forma compensa o teor elevado de lípidos saturados típicos dos queijos. Os ácidos gordos C6, C8, C10 e os ácidos gordos com um número ímpar de carbonos como C13, C15, C17, C19, C21 e C23 estão

presentes em concentrações reduzidas nas amostras de queijo, no entanto, são ácidos que apresentam maior variabilidade entre queijos. No que se refere aos ácidos gordos insaturados, os ácidos nonadecênico (C19:1), gondóico (C20:1), heneicosanóico (C21:1) e erúico (C22:1), ácidos gordos monoinsaturados minoritários, foram identificados, em concentrações variáveis nas diversas amostras de Queijo de Coalho. Também o CLA foi encontrado em concentrações significativas na fração lipídica dos queijos de todas as regiões, em particular na região de Catolé do Rocha (R1A2, R1A3 e R1A4) e na região de Cajazeiras (R2A1, R2A3, R2A4); por outro lado as amostras das regiões de Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7) foram as que apresentaram menor concentrações de CLA. Já os ácidos nonadeca-hexanóico (C19:6), eicosapentaenóico (C20:5, EPA), eicosatrienóico (C20:3b) e docosahexaenóico (C22:6), foram alguns dos ácidos gordos polinsaturados identificados em todas as amostras de Queijo de Coalho. Apesar dos queijos de Coalho analisados apresentarem uma concentração de ácidos gordos saturados predominante, como é comum em produtos lácteos, registraram-se também concentrações elevadas de ácidos mono, di e polinsaturados quando comparados com outros queijos. Em particular é relevante a presença de ácidos polinsaturados como o CLA, o EPA, o DHA e outros ácidos polinsaturados que são precursores de metabolitos com ação antioxidante e anti-inflamatória e que de alguma forma compensam os efeitos pro-oxidantes e pro-inflamatórios de ácidos gordos saturados ou do ácido linoleico, que são precursores de metabolitos com estes efeitos indesejáveis.

Os queijos de Coalho artesanais produzidos no Sertão da Paraíba apresentaram uma rica diversidade na microbiota de bactérias ácido-láticas, representada pelos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*. As espécies mais abundantes identificadas nesta pesquisa foram *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* e *Lactococcus garvieae*. Na região de Catolé do Rocha (R1) observou-se a prevalência do gênero *Streptococcus*, enquanto nas regiões de Cajazeiras (R2), Sousa (R3) e Patos (R4) a maior prevalência foi de espécies do gênero *Enterococcus*, e o gênero *Lactococcus* foi o mais abundante nas regiões de Piancó (R5), Itaporanga (R6) e Serra do Teixeira (R7). A região de Patos (R4) apresentou a maior diversidade de espécies de BAL, tendo sido identificadas espécies dos seguintes gêneros: *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella*; de entre estes, o gênero *Enterococcus* foi o que apresentou maior diversidade, incluindo espécies como *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. italicus* e o gênero *Lactococcus* foi o que apresentou maior prevalência neste trabalho, tendo sido isolada em todas as regiões/microrregiões pesquisadas. *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *Lactococcus garvieae* e *S. macedonicus* foram espécies isoladas e identificadas pela primeira vez em Queijo de Coalho artesanal no Brasil, não havendo registro da espécie *L. garvieae* em queijos brasileiros. Espécies de bactérias não lácticas também foram isoladas e identificadas nas amostras de Queijo de Coalho da Paraíba, pertencendo a maioria à família *Enterobacteriaceae* como *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Shigella*, além da *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*. A identificação das espécies que compõem a microbiota láctica dos queijos de Coalho produzidos na Paraíba vem contribuir na possibilidade de seleção de linhagens de BAL específicas para a região, na busca para produção de um produto artesanal com origens geograficamente

específicas, para ser utilizado no processo de industrialização deste queijo, sem comprometer as suas características organolépticas e sem expor a população a riscos pelo consumo de produtos microbiologicamente contaminados.

Apesar dos resultados aqui apresentados, o estudo do Queijo de Coalho artesanal produzido na Paraíba deve ser continuado com o estudo da proteólise, através do desenvolvimento de método para determinação dos aminoácidos totais, bem como a determinação de amins biogénicas e peptídeos presentes na matriz queijo, com o propósito de identificar os mais importantes e sua associação com a microbiota láctica. A determinação dos ácidos orgânicos e voláteis que compõem o *flavour* dos queijos de Coalho artesanais produzidos na Paraíba, deve também ser estudada, a fim de ser utilizada como parâmetro de caracterização regional deste queijo. A avaliação da atividade tecnológica e probiótica das bactérias lácticas isoladas e identificadas nas amostras do Queijo de Coalho da Paraíba vão contribuir com o desenvolvimento de um fermento láctico, com o objetivo de preservar as características organolépticas do Queijo de Coalho artesanal, para ser utilizado na fabricação deste queijo com leite pasteurizado, conforme determina a Portaria Nº 146 de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

ANEXOS

Anexo 1 – Ficha de avaliação descritiva utilizada na avaliação das amostras de Queijo de Coalho

NOME DO AVALIADOR: _____ DATA: _____

AMOSTRA: _____

TURNO: () Manhã () Tarde

Por gentileza, avalie e registre a intensidade de cada atributo dos queijos de acordo com as escalas abaixo:

APARENCIA

Cor Amarelada | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Molhada | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

AROMA

Queijo fresco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Ácido | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Manteiga | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

SABOR

Queijo fresco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Manteiga | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Salgado | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Ácido | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

TEXTURA

Maciez | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Borrachento | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Seco | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
Nenhuma Forte

Anexo 2 - Resultado das bactérias lácticas e não lácticas isoladas nos diferentes queijos

2.1 - Região de Catolé do Rocha – R1

Tabela A2.1.1: BAL e BNL para a região R1A1.

R1A1		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A352	R1A1-B1	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A353	R1A1-B2	X		X		-	-
A354	R1A1-B3	X		X		-	-
A355	R1A1-B4	X		X		-	-
A356	R1A1-B6	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A357	R1A1-B7	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A358	R1A1-B8	X		X		-	-
A359	R1A1-B9	X		X		-	-
A360	R1A1-B10	X		X		-	-
A334	R1A1-CM1		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A335	R1A1-CM2		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A336	R1A1-CM3		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A337	R1A1-CM4		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A338	R1A1-CM5		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A339	R1A1-CM6		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A340	R1A1-CM7		X	X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
A341	R1A1-CM8		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A342	R1A1-CM9		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A343	R1A1-CT1		X		X	-	-
A344	R1A1-CT2		X		X	-	-
A390	R1A1-CT3		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A345	R1A1-CT4		X		X	-	-
A346	R1A1-CT5		X		X	-	-
A347	R1A1-CT6		X		X	-	-
A348	R1A1-CT7		X		X	-	-
A349	R1A1-CT8		X		X	-	-
A350	R1A1-CT9		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A351	R1A1-CT10		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	98

Tabela A2.1.2: BAL e BNL para a região R1A2.

R1A2		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A369	R1A2-B1	X		X		-	-
A370	R1A2-B2	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	97
A371	R1A2-B3	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A372	R1A2-B4	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A373	R1A2-B5	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A374	R1A2-B6	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	98
A375	R1A2-B7	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	100
A376	R1A2-B8	X		X		SEM CONTIG	
A377	R1A2-B9	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A378	R1A2-B10	X		X		SEM CONTIG	
A379	R1A2-CM1		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A380	R1A2-CM2		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A381	R1A2-CM3		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A382	R1A2-CM4		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A383	R1A2-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A384	R1A2-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A385	R1A2-CM7		X	X		<i>Streptococcus thermophilus</i>	98
A386	R1A2-CM8		X	X		<i>Streptococcus thermophilus</i>	93
A387	R1A2-CM9		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A388	R1A2-CM10		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A389	R1A2-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A361	R1A2-CT2		X		X	-	-
A362	R1A2-CT3		X		X	-	-
A363	R1A2-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A364	R1A2-CT5		X		X	-	-
A365	R1A2-CT6		X		X	-	-
A366	R1A2-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A367	R1A2-CT8		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A368	R1A2-CT9		X		X	-	-

Tabela A2.1.3: BAL e BNL para a região R1A3.

R1A3		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A424	R1A3-B1	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A425	R1A3-B2	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A426	R1A3-B3	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A427	R1A3-B4	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A428	R1A3-B5	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A429	R1A3-B6	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A430	R1A3-B7	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A431	R1A3-B8	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A432	R1A3-B9	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A433	R1A3-B10	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A397	R1A3-CM1		X	X		<i>Enterococcus durans</i>	97
A398	R1A3-CM2		X	X		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	99
A399	R1A3-CM4		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A434	R1A3-CM7		X	X		<i>Escherichia coli</i>	100
A435	R1A3-CM8		X	X		-	-
A391	R1A3-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A392	R1A3-CT2		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
A393	R1A3-CT3		X		X	-	-
A394	R1A3-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
A395	R1A3-CT5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A396	R1A3-CT6		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	92
A401	R1A3-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100

Tabela A2.1.4: BAL e BNL para a região R1A4.

R1A4		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A443	R1A4-B1	X		X		<i>Escherichia coli</i>	99
A451	R1A4-B2	X		X		<i>Fusibacter sp.</i>	90
A444	R1A4-B3	X		X		<i>Escherichia sp.</i>	99
A445	R1A4-B4	X		X		-	-
A446	R1A4-B5	X		X		<i>Shigella flexneri</i>	99
A447	R1A4-B6	X		X		<i>Streptococcus agalactiae</i>	96
A448	R1A4-B7	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	96
A449	R1A4-B8	X		X		<i>Pseudomonas brenneri</i>	94
A450	R1A4-B9	X		X		<i>Escherichia coli</i>	91
A452	R1A4-B10	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A439	R1A4-CM7		X	X		<i>Escherichia coli</i>	98
A440	R1A4-CM8		X	X		<i>Escherichia coli</i>	99
A441	R1A4-CM9		X	X		<i>Escherichia coli</i>	99
A442	R1A4-CM10		X	X		<i>Shigella flexneri</i>	100
A453	R1A4-CT1		X		X	-	-
A454	R1A4-CT2		X		X	<i>Escherichia sp.</i>	98
A455	R1A4-CT3		X		X	<i>Escherichia sp.</i>	98
A456	R1A4-CT4		X		X	<i>Escherichia coli</i>	92
A457	R1A4-CT5		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A458	R1A4-CT6		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	98
A459	R1A4-CT7		X		X	<i>Streptococcus thermophilus</i>	93

2.2 - Região de Cajazeiras – R2

Tabela A2.2.1: BAL e BNL para a região R2A1.

R2A1		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A63	R2A1-MRS1	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A64	R2A1-MRS2	X		X		<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A65	R2A1-MRS3	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A66	R2A1-MRS4	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A67	R2A1-MRS5	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A68	R2A1-MRS6	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A69	R2A1-MRS7	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A70	R2A1-MRS8	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A71	R2A1-MRS9	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A72	R2A1-MRS10	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	98
A75	R2A1-M173		X		X	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99
A76	R2A1-M175		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	97
A77	R2A1-M176		X		X	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99
A79	R2A1-M178		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A80	R2A1-M179		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99

Tabela A2.2 2: BAL e BNL para a região R2A2.

R2A2		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A82	R2A2-MRS1	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	99
A83	R2A2-MRS2	X		X		<i>Lactobacillus pentosus</i>	100
A84	R2A2-MRS3	X		X		<i>Lactobacillus pentosus</i>	99
A85	R2A2-MRS4	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i>	99
A88	R2A2-MRS7	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	95
A89	R2A2-MRS8	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A90	R2A2-MRS9	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	100
A91	R2A2-MRS10	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	100
A92	R2A2-M171		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A93	R2A2-M172		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A94	R2A2-M173		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A95	R2A2-M174		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A98	R2A2-M178		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100

Tabela A2.2.3: BAL e BNL para a região R2A3.

R2A3		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A121	R2A3-B1	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A122	R2A3-B2	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A123	R2A3-B3	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A124	R2A3-B4	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A125	R2A3-B5	X		X		<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A126	R2A3-B6	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A127	R2A3-B7	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A128	R2A3-B8	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A129	R2A3-B9	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A130	R2A3-B10	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A131	R2A3-CM2		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A132	R2A3-CM21		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A133	R2A3-CM23		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A134	R2A3-CM3		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A135	R2A3-CM32L		X	X		<i>Klebsiella milletis</i>	98
A136	R2A3-CM6		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A137	R2A3-CM45		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A138	R2A3-CM67		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A139	R2A3-CM7		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A140	R2A3-CM8		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A141	R2A3-CT1		X		X	<i>Klebsiella variicola</i>	99
A142	R2A3-CT2		X		X	<i>Klebsiella variicola</i>	99
A143	R2A3-CT3		X		X	<i>Escherichia coli</i> O111:H-	99
A144	R2A3-CT4		X		X	<i>E. coli</i>	99

Tabela A2.2.4: BAL e BNL para a região R2A4

R2A4		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A147	R2A4-B1	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A148	R2A4-B2	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	99
A149	R2A4-B3	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	99
A151	R2A4-B5	X		X		<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	100
A152	R2A4-B6	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A153	R2A4-B7	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A154	R2A4-B8	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	98
A155	R2A4-B9	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A156	R2A4-B10	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A157	R2A4-CM1		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A158	R2A4-CM2		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A159	R2A4-CM3		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A160	R2A4-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A161	R2A4-CT2		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A162	R2A4-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A163	R2A4-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A164	R2A4-CT5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99

2.3 - Região de Sousa – R3

Tabela A2.3.1: BAL e BNL para a região R3A1.

R3A1		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A1	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus sp.</i>	99
A2	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus sp.</i>	96
A3	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A4	R3A1-B	X		X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	98
A5	R3A1-B	X		X		<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A6	R3A1-C		X		X	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	100
A8	R3A1-C		X		X	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99
A9	R3A1-C		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A10	R3A1-C		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A11	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A12	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A13	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	98
A14	R3A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A15	R3A1-C		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A16	R3A1-C		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	95
A17	R3A1-C		X		X	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	96
A18	R3A1-C		X		X	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99

Tabela A2.3.2: BAL e BNL para a região R3A2.

R3A2		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A22	R3A2-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i> ,	99
A23	R3A2-CT4		X		X	<i>Lactobacillus fermentum</i>	93
A24	R3A2-CT4II		X		X	<i>Lactobacillus sp.</i>	?
A28	R3A2-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A30	R3A2-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A31	R3A2-CT10		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A32	R3A2-CM31		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A33	R3A2-CM32		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A34	R3A2-CM33		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	97
A35	R3A2-CM34		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	96
A36	R3A2-B31	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A37	R3A2-B32	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A38	R3A2-B33	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A39	R3A2-B34	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99

Tabela A2.3.3: BAL e BNL para a região R3A3.

R3A3		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A40	R3A3-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A41	R3A3-CM3		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	98
A42	R3A3-CM4		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	100
A43	R3A3-CM5		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A44	R3A3-CM8		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A45	R3A3-CM9		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A46	R3A3-CM10		X	X		<i>Staphylococcus aureus</i>	100
A47	R3A3-CT1		X		X	<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A165	R3A3-CT2		X		X	<i>Brevibacillus agri</i>	99
A166	R3A3-CT3		X		X	<i>Enterobacter sp.</i>	99
A167	R3A3-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A168	R3A3-CT5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A169	R3A3-CT7		X		X	<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A170	R3A3-CT8		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A171	R3A3-CT10		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A172	R3A3-B1	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A173	R3A3-B2	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A174	R3A3-B4	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A175	R3A3-B5	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A176	R3A3-B6	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A177	R3A3-B7	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A178	R3A3-B8	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A179	R3A3-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	96
A180	R3A3-B10	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99

Tabela A2.3.4: BAL e BNL para a região R3A4.

R3A4		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A608	R3A4-B1	X		X		-	-
A609	R3A4-B2	X		X		-	-
A610	R3A4-B3	X		X		<i>Pseudomonas sp.</i>	98
A611	R3A4-B4	X		X		-	-
A612	R3A4-B5	X		X		-	-
A613	R3A4-B6	X		X		-	-
A614	R3A4-B7	X		X		<i>Pseudomonas sp.</i>	96
A615	R3A4-B8	X		X		<i>Pseudomonas stutzeri</i>	93
A616	R3A4-B9	X		X		-	-
A617	R3A4-CT1		X		X	-	-
A618	R3A4-CT2		X		X	-	-
A619	R3A4-CT3		X		X	<i>Ralstonia sp.</i>	96
A620	R3A4-CT4		X		X	-	-
A621	R3A4-CT5		X		X	<i>Ralstonia sp.</i>	95
A623	R3A4-CT6		X		X	<i>Ralstonia sp.</i>	90
A624	R3A4-CT7		X		X	-	-
A625	R3A4-CT8		X		X	-	-
A626	R3A4-CT9		X		X	-	-
A622	R3A4-CT10		X		X	<i>Sphingomonas sp.</i>	99
A627	R3A4-CM1		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	98
A628	R3A4-CM2		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	96
A629	R3A4-CM3		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A630	R3A4-CM4		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A631	R3A4-CM5		X	X		<i>Enterococcus durans</i>	98
A632	R3A4-CM6		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	96
A633	R3A4-CM7		X	X		-	-
A634	R3A4-CM8		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A635	R3A4-CM9		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	96

2.4 - Região de Patos – R4

Tabela A2.4 1: BAL e BNL para a região R4A1.

R4A1		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A50	R4A1-B	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A52	R4A1-B	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A55	R4A1-B	X		X		-	-
A57	R4A1-C		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A59	R4A1-C		X		X	<i>Klebsiella milletis</i>	98
A61	R4A1-C		X		X	<i>Klebsiella milletis</i>	99
A62	R4A1-C		X		X	<i>Klebsiella milletis</i>	99

Tabela A2.4 2: BAL e BNL para a região R4A2.

R4A2		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A102	R4A2-C2		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A103	R4A2-C3		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A104	R4A2-C4		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A105	R4A2-B1	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A106	R4A2-B2	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A107	R4A2-B3	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A108	R4A2-B4	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A109	R4A2-B5	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A110	R4A2-B6	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A111	R4A2-B7	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A112	R4A2-B8	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A113	R4A2-B9	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A114	R4A2-B10	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A115	R4A2-C5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A116	R4A2-C6		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A117	R4A2-C7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A118	R4A2-C8		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A119	R4A2-C9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A120	R4A2-C10		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100

Tabela A2.4.3: BAL e BNL para a região R4A3.

R4A3		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A181	R4A3-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A182	R4A3-CM2		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A183	R4A3-CM3		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A184	R4A3-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A185	R4A3-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A186	R4A3-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A187	R4A3-CM7		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A188	R4A3-CM8		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A189	R4A3-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A190	R4A3-CM10		X	X		<i>Enterococcus italicus</i>	100
A191	R4A3-CT2		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	98
A192	R4A3-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A193	R4A3-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A194	R4A3-CT5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A195	R4A3-CT6		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A196	R4A3-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	98
A197	R4A3-CT8		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A198	R4A3-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A199	R4A3-CT10		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A200	R4A3-B1	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A201	R4A3-B2	X		X		<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99
A203	R4A3-B4	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
A204	R4A3-B5	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	91
A205	R4A3-B6	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A206	R4A3-B7	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	99
A207	R4A3-B8	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A208	R4A3-B9	X		X		<i>Weissella paramesenteroides</i>	97
A209	R4A3-B10	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	99

Tabela A2.4.4: BAL e BNL para a região R4A4.

R4A4		Tipos de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A210	R4A4-B2	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A211	R4A4-B3	X		X		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99
A212	R4A4-B4	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A213	R4A4-B5	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A214	R4A4-B6	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A215	R4A4-B7	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A216	R4A4-B8	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A217	R4A4-B9	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	98
A218	R4A4-B10	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A219	R4A4-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A220	R4A4-CM3		X	X		-	-
A221	R4A4-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	99
A222	R4A4-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A223	R4A4-CM6		X	X		<i>Enterobacter</i> sp.	99
A224	R4A4-CM8		X	X		<i>Lactococcus</i> sp.	99
A225	R4A4-CM9		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A226	R4A4-CM10		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A227	R4A4-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A229	R4A4-CT3		X		X	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99
A230	R4A4-CT4		X		X	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99
A231	R4A4-CT5		X		X	<i>Cronobacter sakazakii</i>	99
A233	R4A4-CT7		X		X	<i>Sem contig</i>	-
A234	R4A4-CT8		X		X	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	99

2.5 - Região de Piancó – R5

Tabela A2.5.1: BAL e BNL para a região R5A1.

R5A1		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A515	R5A1-B1	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A516	R5A1-B2	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	95
A517	R5A1-B3	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A518	R5A1-B4	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A519	R5A1-B5	X		X		-	-
A520	R5A1-B6	X		X		-	-
A521	R5A1-B7	X		X		-	-
A522	R5A1-B8	X		X		<i>Pseudomonas sp.</i>	99
A523	R5A1-B9	X		X		-	-
A524	R5A1-B10	X		X		<i>Pseudomonas brenneri</i>	99
A525	R5A1-CM2		X	X		-	-
A526	R5A1-CM4		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	96
A527	R5A1-CM5		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A528	R5A1-CM6		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A529	R5A1-CM7		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	95
A530	R5A1-CM8		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	95
A531	R5A1-CM9		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	94
A532	R5A1-CM10		X	X		-	-
A533	R5A1-CT1		X		X	<i>Pseudomonas sp.</i>	100
A534	R5A1-CT2		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	99
A535	R5A1-CT4		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	99
A536	R5A1-CT5		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	93
A537	R5A1-CT6		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	98
A538	R5A1-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A539	R5A1-CT8		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A540	R5A1-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A541	R5A1-CT10		X		X	-	-

Tabela A2.5.2: BAL e BNL para a região R5A2.

R5A2		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A542	R5A2-B1	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	100
A543	R5A2-B2	X		X		-	-
A544	R5A2-B3	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A545	R5A2-B4	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A546	R5A2-B5	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A547	R5A2-B6	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A548	R5A2-B7	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A549	R5A2-B8	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A550	R5A2-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	87
A551	R5A2-B10	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A552	R5A2-CM1		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A553	R5A2-CM2		X	X		-	-
A554	R5A2-CM3		X	X		-	-
A555	R5A2-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A556	R5A2-CM5		X	X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	97
A557	R5A2-CM6		X	X		-	-
A558	R5A2-CM7		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	94
A559	R5A2-CM8		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	96
A560	R5A2-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	94
A561	R5A2-CM10		X	X		-	-
A562	R5A2-CT1		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A563	R5A2-CT4		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A564	R5A2-CT6		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A565	R5A2-CT8		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99

Tabela A2.5 3: BAL e BNL para a região R5A3.

R5A3		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A566	R5A3-B1	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95
A567	R5A3-B2	X		X		<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	98
A568	R5A3-B3	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	96
A569	R5A3-B4	X		X		<i>Pseudomonas brenneri</i>	99
A570	R5A3-B5	X		X		<i>Pseudomonas brenneri</i>	99
A571	R5A3-B6	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A572	R5A3-B7	X		X		-	-
A573	R5A3-B8	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	88
A574	R5A3-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
A575	R5A3-B10	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	96
A576	R5A3-CM1		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A577	R5A3-CM2		X	X		-	-
A578	R5A3-CM3		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	99
A579	R5A3-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A580	R5A3-CM5		X	X		<i>Streptococcus thermophilus</i>	99
A581	R5A3-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	96
A582	R5A3-CM7		X	X		-	-
A583	R5A3-CM8		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A403	R5A3-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A584	R5A3-CT1		X		X	<i>Streptococcus</i> sp.	98
A585	R5A3-CT2		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A586	R5A3-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	98
A603	R5A3-CT4		X		X	<i>Ralstonia</i> sp.	94
A604	R5A3-CT5		X		X	<i>Pseudomonas</i> sp.	96
A605	R5A3-CT6		X		X	<i>Ralstonia</i> sp.	97
A404	R5A3-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	96
A423	R5A3-CT8		X		X	<i>Escherichia coli</i>	99
A405	R5A3-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	97

Tabela A2.5.4: BAL e BNL para a região R5A4.

R5A4		Tipo de bactéria		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A595	R5A4-B2	X		X		<i>Pseudomonas</i> sp.	88
A596	R5A4-B3	X		X		<i>Ralstonia</i> sp.	95
A597	R5A4-B4	X		X		-	-
A598	R5A4-B6	X		X		<i>Ralstonia solanacearum</i>	98
A599	R5A4-B7	X		X		<i>Pseudomonas</i> sp.	95
A600	R5A4-B8	X		X		-	-
A601	R5A4-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A602	R5A4-B10	X		X		<i>Pseudomonas</i> sp.	91
A406	R5A4-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A407	R5A4-CM2		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A408	R5A4-CM3		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A409	R5A4-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A410	R5A4-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A411	R5A4-CM7		X	X		-	-
A412	R5A4-CM8		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A413	R5A4-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98
A414	R5A4-CM10		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A415	R5A4-CT1		X		X	<i>Streptococcus infantarius</i> subsp. <i>infantarius</i>	99
A416	R5A4-CT2		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A417	R5A4-CT4		X		X	-	-
A418	R5A4-CT5				X	<i>Escherichia coli</i>	99
A419	R5A4-CT6				X	<i>Escherichia coli</i>	99
A420	R5A4-CT7				X	<i>Escherichia coli</i>	99
A421	R5A4-CT8				X	<i>Escherichia coli</i>	99

A422	R5A4-CT10				X	<i>Escherichia coli</i>	99
------	-----------	--	--	--	---	-------------------------	----

2.6 - Região de Itaporanga – R6

Tabela A2.6.1: BAL e BNL para a região R6A1.

R6A1		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A261	R6A1-B1	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A262	R6A1-B2	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A263	R6A1-B3	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A264	R6A1-B4	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A265	R6A1-B5	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A266	R6A1-B6	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A267	R6A1-B7	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A268	R6A1-B8	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A269	R6A1-B9	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A270	R6A1-B10	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A271	R6A1-CT1		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A273	R6A1-CT4		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A274	R6A1-CT5		X		X	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99
A275	R6A1-CT6		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A276	R6A1-CT8		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A277	R6A1-CT9		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A278	R6A1-CT10		X		X	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A280	R6A1-CM2		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A281	R6A1-CM3		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A282	R6A1-CM4		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A283	R6A1-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A284	R6A1-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A285	R6A1-CM7		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A286	R6A1-CM8		X	X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A287	R6A1-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A288	R6A1-CM10		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100

Tabela A2.6.2: BAL e BNL para a região R6A2.

R6A2		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A242	R6A2-B1	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	100
A243	R6A2-B2	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A244	R6A2-B3	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A245	R6A2-B4	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A246	R6A2-B5	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A247	R6A2-B6	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A248	R6A2-B7	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	100
A249	R6A2-B8	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	100
A250	R6A2-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A251	R6A2-B10	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	99
A235	R6A2-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
A236	R6A2-CT2		X		X	<i>Escherichia coli</i>	100
A237	R6A2-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A238	R6A2-CT4		X		X	<i>Escherichia coli</i>	99
A306	R6A2-CT6		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	100
A239	R6A2-CT8		X		X	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
A240	R6A2-CT9		X		X	<i>Enterococcus gallinarum</i>	100
A241	R6A2-CT10		X		X	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
A252	R6A2-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A253	R6A2-CM2		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A254	R6A2-CM3		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A255	R6A2-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	99
A256	R6A2-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A257	R6A2-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A258	R6A2-CM8		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A259	R6A2-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A260	R6A2-CM10		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99

Tabela A2.6.3: BAL e BNL para a região R6A3.

R6A3		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A332	R6A3-B1	X		X		<i>Streptococcus lutetiensis</i>	99
A587	R6A3-B3	X		X		-	-
A588	R6A3-B4	X		X		<i>Ralstonia pickettii</i>	95
A589	R6A3-B5	X		X		<i>Enterobacter</i> sp.	99
A590	R6A3-B6	X		X		<i>Shigella flexneri</i>	99
A591	R6A3-B7	X		X		<i>Enterobacter</i> sp.	99
A592	R6A3-B8	X		X		-	-
A593	R6A3-B9	X		X		<i>Pseudomonas</i> sp.	93
A594	R6A3-B10	X		X		-	-
A315	R6A3-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A316	R6A3-CT2		X		X	<i>Staphylococcus aureus</i>	99
A607	R6A3-CT4		X		X	<i>Ralstonia</i> sp.	96
A317	R6A3-CT5		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A318	R6A3-CT6		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A319	R6A3-CT7		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A321	R6A3-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A322	R6A3-CT10		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A323	R6A3-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A324	R6A3-CM2		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A325	R6A3-CM3		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A326	R6A3-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A327	R6A3-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99

A606	R6A3-CM8		-	-	-	-	-
A330	R6A3-CM9		-	-	-	-	-
A331	R6A3-CM10		X	X		<i>Macrococcus caseolyticus</i>	99

Tabela A2.6.4: BAL e BNL para a região R6A4.

R6A4		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A310	R6A4-B2		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A311	R6A4-B3		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A312	R6A4-B7		X	X		<i>Streptococcus uberis</i>	99
A313	R6A4-B8		X	X		<i>Enterococcus faecium</i>	99
A314	R6A4-B9		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A299	R6A4-CM1	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A300	R6A4-CM2	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	90
A304	R6A4-CM6	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A305	R6A4-CM7	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A307	R6A4-CM8	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A308	R6A4-CM9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A309	R6A4-CM10	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A289	R6A4-CT1	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A290	R6A4-CT2	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A291	R6A4-CT3	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A292	R6A4-CT4	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A293	R6A4-CT5	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A294	R6A4-CT6	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A295	R6A4-CT7	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	100
A296	R6A4-CT8	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A297	R6A4-CT9	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A298	R6A4-CT10	X			X	<i>Enterococcus faecium</i>	99

2.7 - Região da Serra do Teixeira – R7

Tabela A2.7 1: BAL e BNL para a região R7A1.

R7A1		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nº da amostra	Bacilos	Cocos	30º	42º		
A461	R7A1-B2	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98
A462	R7A1-B3	X		X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100
A463	R7A1-B4	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	98
A464	R7A1-B5	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A465	R7A1-B6	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A466	R7A1-B7	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A467	R7A1-B8	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
A468	R7A1-B9	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A469	R7A1-B10	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	94
A471	R7A1-CT2		X		X	<i>Escherichia coli</i>	95
A472	R7A1-CT3		X		X	<i>Pseudomonas lini</i>	89
A473	R7A1-CT4		X		X	<i>Escherichia coli</i>	92
A474	R7A1-CT5		X		X	<i>Pseudomonas sp.</i>	92
A475	R7A1-CT6		X		X	<i>Pseudomonas sp.</i>	88
A476	R7A1-CT8		X		X	-	-
A477	R7A1-CT10		X		X	-	-
A478	R7A1-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	97
A479	R7A1-CM2		X	X		-	-
A480	R7A1-CM3		X	X		<i>Enterococcus italicus</i>	99
A481	R7A1-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A482	R7A1-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A483	R7A1-CM6		X	X		<i>Enterococcus sp.</i>	99

A484	R7A1-CM7		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A485	R7A1-CM8		X	X		<i>Escherichia coli</i>	97
A486	R7A1-CM9		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99

Tabela A2.7.2: BAL e BNL para a região R7A2.

R7A2		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nºda amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A487	R7A2-B1	X		X		<i>Pseudomonas</i> sp.	93
A488	R7A2-B2	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A489	R7A2-B3	X		X		<i>Escherichia coli</i>	98
A490	R7A2-B4	X		X		-	-
A492	R7A2-B6	X		X		<i>Lactococcus lactis</i>	100
A493	R7A2-B7	X		X		<i>Escherichia coli</i>	94
A494	R7A2-B8	X		X		-	-
A495	R7A2-B9	X		X		<i>Enterobacter cloacae</i>	90
A496	R7A2-B10	X		X		<i>Escherichia coli</i>	94
A497	R7A2-CM1		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A498	R7A2-CM2		X	X		<i>Pseudomonas</i> sp.	90
A499	R7A2-CM3		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100
A500	R7A2-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A501	R7A2-CM5		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A502	R7A2-CM6		X	X		<i>Lactococcus lactis</i>	95
A503	R7A2-CM7		X	X		<i>Pseudomonas</i> sp.	90
A504	R7A2-CM8		X	X		-	-
A505	R7A2-CM9		X	X		-	-
A506	R7A2-CM10		X	X		-	-
A507	R7A2-CT2		X		X	-	-
A508	R7A2-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A509	R7A2-CT4		X		X	-	-
A510	R7A2-CT5		X		X	<i>Pseudomonas</i> sp.	97
A511	R7A2-CT6		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	94
A512	R7A2-CT7		X		X	<i>Enterococcus durans</i>	96
A513	R7A2-CT9		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	99
A514	R7A2-CT10		X		X	<i>Enterococcus faecalis</i>	97

Tabela A2.7.3: BAL e BNL para a região R7A3.

R7A3		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nºda amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A661	R7A3-B1	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A662	R7A3-B2	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A663	R7A3-B3	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A664	R7A3-B4	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A665	R7A3-B5	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A666	R7A3-B6	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A667	R7A3-B7	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A668	R7A3-B8	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	98
A669	R7A3-B9	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	98
A670	R7A3-CM1		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	98
A671	R7A3-CM2		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A672	R7A3-CM3		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A673	R7A3-CM4		X	X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	95
A674	R7A3-CM5		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A675	R7A3-CM6		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A676	R7A3-CM7		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A681	R7A3-CM8		X	X		-	-
A682	R7A3-CM9		X	X		-	-
A683	R7A3-CT1		X		X	-	-
A684	R7A3-CT2		X		X	-	-
A685	R7A3-CT3		X		X	-	-
A686	R7A3-CT4		X		X	-	-

A687	R7A3-CT5		X		X	-	-
A688	R7A3-CT6		X		X	-	-
A689	R7A3-CT7		X		X	-	-

Tabela A2.7.4: BAL e BNL para a região R7A4.

R7A4		Tipo de bactérias		Temperatura (°C)		Resultados	%
Código	Nºda amostra	Bacilos	Cocos	30°	42°		
A636	R7A4-B1	X		X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100
A637	R7A4-B2	X		X		<i>Pseudomonas sp.</i>	90
A638	R7A4-B3	X		X		-	-
A639	R7A4-B4	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	96
A640	R7A4-B5	X		X		-	-
A641	R7A4-B6	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A642	R7A4-B7	X		X		<i>Streptococcus macedonicus</i>	99
A643	R7A4-B8	X		X		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99
A644	R7A4-B9	X		X		<i>Lactococcus garvieae</i>	100
A645	R7A4-B10	X		X		<i>Enterococcus faecium</i>	100
A646	R7A4-CM1		X	X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
A647	R7A4-CM2		X	X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99
A648	R7A4-CM3		X	X		<i>Enterococcus casseliflavus</i>	100
A649	R7A4-CM4		X	X		-	-
A650	R7A4-CM5		X	X		<i>Enterococcus italicus</i>	99
A651	R7A4-CM6		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A652	R7A4-CM7		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A653	R7A4-CM8		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A654	R7A4-CM9		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A655	R7A4-CM10		X	X		<i>Lactococcus garvieae</i>	99
A656	R7A4-CT1		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A657	R7A4-CT2		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A658	R7A4-CT3		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A659	R7A4-CT4		X		X	<i>Enterococcus faecium</i>	99
A660	R7A4-CT5		X		X	<i>Lactococcus garvieae</i>	100