

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - BACHARELADO



Trabalho de Conclusão de Curso

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO TIPO MINAS
FRESCAL E RICOTA COMERCIALIZADOS EM PELOTAS,
RS, BRASIL.**

ÍGOR NUNES FERNANDES

Pelotas, 2010

ÍGOR NUNES FERNANDES

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO TIPO MINAS
FRESAL E RICOTA COMERCIALIZADOS EM PELOTAS,
RS, BRASIL.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de
Pelotas, como parte das exigências
para obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientadora Gladis Aver Ribeiro

PELOTAS, 2010

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

F362a Fernandes, Igor Nunes

Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal e ricota comercializados em Pelotas, RS, Brasil / Igor Nunes Fernandes. – 44f. – Monografia (Conclusão de curso). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2010. – Orientador Gladis Aver Ribeiro.

1.Biologia. 2.Ecologia. 3.Queijo. 4.Ricota.
5.Staphylococcus aureus. 6.Escherichia coli. 7. Salmonella.
8. Intoxicação alimentar. I. Ribeiro, Gladis Aver. II. Título

CDD: 576.163

BANCA EXAMINADORA

Gladis Aver Ribeiro

Kelly Lameiro Rodrigues

Anelise Vicentini Kuss

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que sempre me apoiou sem hesitação em todos os momentos desse percurso;

Aos meus amigos que são um forte pilar sobre o qual me apoiei nos momentos de necessidade, e que tornaram a caminhada menos penosa;

À Prof^a Gladis que me incorporou ao laboratório, aceitando a responsabilidade de responder por mais um orientado quando os prazos eram curtos, pela paciência e compreensão;

À Mariana que foi quase uma co-orientadora me acompanhando durante quase todo o percurso do trabalho, que me auxiliou em todos os momentos necessários;

À Melina que me ajudou muito na elaboração do trabalho e incentivou nos momentos em que o ritmo diminuiu;

À Lisiane que trabalhou em um feriado pra me ajudar no cumprimento dos prazos e sempre foi prestativa atendendo aos pedidos por ajuda, à Anelize sempre presente no laboratório descontraindo o ambiente e tornando o trabalho menos cansativo;

À todos que colaboraram comigo na construção deste trabalho.

RESUMO

FERNANDES, Igor Nunes. **Avaliação microbiológica de queijo Tipo Minas Frescal e Ricota comercializados em Pelotas, RS, Brasil.** 2010. 41f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Queijo é o produto fresco ou maturado obtido por drenagem do líquido depois da coagulação do leite. Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles, elaborados a partir de leite cru no Brasil, a comercialização de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente tem sido realizada abertamente em nosso meio. Devido as suas características intrínsecas, a ricota fresca é um dos alimentos que apresentam ótimas condições para o desenvolvimento de microrganismos, tanto deterioradores como patogênicos, o que reduz sua vida de prateleira, além de colocar em risco a saúde do consumidor. O queijo é amplamente produzido e comercializado no Brasil, apresentando freqüentemente contaminação por microorganismos que oferecem riscos à saúde pública. O presente trabalho teve por objetivo verificar a contaminação de queijo minas frescal e ricota, industrializados, por *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella spp.* e Coliformes Totais e Termotolerantes e identificação de *Escherichia coli* em amostras obtidas em estabelecimentos no município de Pelotas, RS, Brasil. Das 42 (21 minas e 21 ricota) amostras avaliadas encontrou-se Coliformes Termotolerantes, *Staphylococcus coagulase positiva* e *Salmonella spp.* em 5(12%), 2(5%) e 1(2%) amostras de queijo minas e em 8(19%), 3(7%) e 2(5%) amostras de ricota respectivamente, estando 3(7%), 1(2%) e 1(2%) e 4(10%), 2(5%) e 2(5%) acima do padrão permitido pela legislação brasileira, caracterizando um total de 31% das amostras como impróprias para consumo humano. Este é um resultado preocupante, visto que foram analisadas amostras que passaram por um processo industrial, onde os cuidados higiênicos necessários deveriam ser tomados.

Palavras chave: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, intoxicação alimentar, queijo, ricota

ABSTRACT

FERNANDES, Igor Nunes. **Microbiological evaluation of Cheese Minas fresh and Ricotta Fresca marketed in Pelotas, Brazil.** 2010. 41f. Monografia (Graduação) – Bacharelado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Cheese is the fresh or matured product obtained by draining the liquid after coagulation of milk. Despite the legal ban imposed on the marketing of fresh and soft cheeses, made from raw milk in Brazil, the marketing of Cheese Minas fresh home made has been conducted openly in our midst. Due to its inner characteristics, fresh ricotta is one of the foods which presents great conditions for microorganism's development, pathogenic and deteriorants, this reduces its shelf life and puts the consumer's health in risk. The cheese is widely produced and marketed in Brazil, presenting frequently contamination by microorganisms that pose risks to public health. This study aimed to investigate the contamination of industrialized minas "fresh" cheese and ricotta by *Staphylococcus* positive coagulase, *Salmonella* spp., and Total and Thermotolerant Coliforms and identification of *Escherichia coli* in samples obtained in establishments in the city of Pelotas, Brazil. Were found from the 42 (21 minas and 21 ricotta) samples evaluated, in 5(12%), 2(5%) e 1(2%) samples of minas cheese and in 8(19%), 3(7%) e 2(5%) samples of ricotta, Thermotolerant Coliforms, *Staphylococcus* positive coagulase and *Salmonella* spp. respectively, and 3(7%), 1(2%),1(2%); and 4(10%), 2(5%), 2(5%) above the limit allowed in the Brazilian code of law, characterizing 31% of the samples as inadequate for human consumption. This is a worrying result, given that the analyzed samples passed through an industrial process, where the necessary hygiene precautions should be taken.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., food poisoning, cheese, ricotta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Índice de contaminação bacteriana das amostras de queijo minas e ricota.....	23
Figura 2	Contaminação bacteriana acima do limite permitido em queijo minas e ricota.....	24
Figura 3	Índices de contaminação de queijo minas frescal e ricota por Coliformes Termotolerantes.....	24
Figura 4	Frequência de contaminação de ricota e queijo minas frescal por <i>Escherichia coli</i>	27
Figura 5	Frequência de contaminação de ricota e queijo minas frescal por <i>Salmonella</i> spp.	28
Figura 6	Índices de contaminação acima do padrão por Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) em queijo minas frescal e ricota.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Queijo.....	8
1.2. Queijo Minas.....	9
1.3. Ricota.....	11
1.4. Microrganismos.....	12
1.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	14
1.6. <i>Salmonella</i>	15
1.7. Coliformes Totais e Termotolerantes.....	17
1.7.1 <i>Escherichia coli</i>	17
2. OBJETIVOS.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Amostragem.....	20
3.2. Isolamento e Identificação de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivo.....	20
3.3. Isolamento e Identificação de Coliformes Totais e Termotolerantes.....	21
3.4. Isolamento e Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5. CONCLUSÃO.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. ANEXOS.....	38

1 INTRODUÇÃO

1.1 Queijo

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. A denominação “queijo” está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea (BRASIL, 1987).

Os produtos lácteos são contemplados pelo Ministério da Saúde e incluem queijos de coalho, frescal e ricota, queijo curado e queijo ralado, e queijo fundido e/ou pasteurizado. Para eles são determinados índices máximos permitidos de contaminação por coliformes termotolerantes (5×10^3 NMP em queijo minas frescal e ricota) e ausência de *Salmonella* spp. em 25g da amostra (BRASIL, 1987; BRASIL, 2001).

Existem diversas etapas, ao longo do processamento de queijos, em que os microrganismos podem ser introduzidos no produto. Desta forma, a qualidade do produto final é influenciada pelas condições higiênico-sanitárias em que o leite foi obtido, pelo processamento na indústria, pelas condições de sanificação do ambiente, qualidade da água e pelo armazenamento e transporte da matéria-prima e do produto (ICMSF, 1997).

O uso de leite cru na produção de queijo, pasteurização inadequada e contaminação cruzada são importantes fatores que contribuem para surtos de doenças transmitidas por alimentos (ZOTTOLA; SMITH, 1991).

O leite cru, que no Brasil é produzido em situações de higiene nem sempre adequadas, pode representar sério risco à saúde pública por utilizar água não tratada nos processos de produção. Esse problema é agravado pela sua

comercialização informal (clandestino) ou a de seus subprodutos, particularmente o queijo-de-minas frescal artesanal (BULHÕES & ROSSI JUNIOR, 2002).

Entre os patógenos que podem ser encontrados no queijo estão a *Listeria* spp. e a *Brucella* spp. Existem poucos relatos de listeriose humana no Brasil, como também das fontes de contaminação. Apesar de atingir um grupo reduzido de pessoas, a listeriose é uma doença séria porque apresenta uma taxa de mortalidade entre 20 e 40% (COSSART, 1992; MCLAUCHLIN et al., 2004). De acordo com Cavalcante et al., 2007, vários estudos sobre a qualidade microbiológica de queijo-coalho relataram ocorrência de microrganismos patogênicos e contagem de microrganismos deterioradores em números que excedem, às vezes, os limites estabelecidos pela legislação. Dentre as bactérias patogênicas observadas destacam-se *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

1.2 Queijo Minas Frescal

O queijo Minas Frescal é um dos queijos mais populares do Brasil, sendo produzido em larga escala e consumido por todas as camadas da população durante todo o ano, em lanches, cafés da manhã e como sobremesa. É uma variedade não maturada, para consumo imediato e de curta durabilidade no mercado (FURTADO, 1999).

Apresenta grande susceptibilidade a contaminações microbianas, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima, ou por contaminações cruzadas durante ou após o processamento. As contaminações, aliadas às alterações decorrentes podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo (ROCHA; BURITI; SAAD, 2006). Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade (PICOLI et al., 2006).

O Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária, em atendimento ao Mercosul, estabeleceu o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos, no qual se define como queijo frescal aquele que está pronto para o consumo, logo após sua fabricação, e por queijo maturado aquele que sofreu trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade considerada. Como produto maturado enquadra-se, além do padronizado, o queijo canastra, genericamente assim designado por se tratar de produto de caráter

regional, originário da região da Serra da Canastra, em Minas Gerais (BRASIL, 1996).

O queijo Minas frescal é um produto que tem ampla aceitação comercial e que faz parte do hábito alimentar da população, na maioria das regiões do país (Pereira et al., 1991). Apesar das exigências para que o leite destinado ao fabrico de queijos seja higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente (Brasil, 1974), é intensa a comercialização dos queijos Minas fora dessas especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos e temperaturas inadequadas, e incorretas condições de manufatura e armazenagem contribuem, também, de forma efetiva, para a má qualidade do produto final (SANTOS et al., 1981; MANDIL et al., 1982). Este tipo de queijo é produzido a partir de leite cru ou pasteurizado e devido a vários fatores como umidade, ser um produto de origem animal e especialmente por ser um produto manufaturado, pode ser facilmente contaminado e constitui um meio favorável à sobrevivência e multiplicação de bactérias (CÂMARA et al., 2002).

Quando este produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou recontaminação do produto. Além disso, por não ser maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado (SILVA & LEITÃO, 1980).

De acordo com a Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, o queijo Minas Frescal deve atender aos seguintes padrões microbiológicos: número mais provável (NMP) máximo de $5,0 \times 10^3$ /g para coliformes termotolerantes e NMP ou contagem direta em placa (máximo) de 10^3 UFC/g para *Staphylococcus aureus*, objetivando levar ao consumidor um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (BRASIL, 2001).

Em trabalho realizado por Pereira et al. (1999) na cidade de Belo Horizonte – MG evidenciou-se uma má qualidade microbiológica em produtos com regulamentação do Serviço de Inspeção Federal, com índice de condenação de 90% para o queijo Minas Frescal, permitindo questionar o controle feito pelos órgãos de fiscalização, sobretudo no acompanhamento de etapas operacionais.

Em análises efetuadas por Almeida e Franco (2003) em queijos comercializados no município do Rio de Janeiro – RJ, também foi evidenciada a ocorrência de falhas no controle da qualidade de queijos fiscalizados, indicando que o carimbo do Serviço de Inspeção Federal (SIF) não representa garantia de que os queijos estão enquadrados nas normas vigentes de segurança alimentar. Os resultados obtidos por esse autor assemelharam-se aos anteriormente obtidos por Pereira et al. (1999), com 90% de contaminação fecal.

Dados obtidos por Caixeta et al. (2005) que analisaram queijo Minas Frescal artesanal comercializados em Uberlândia-MG, mostraram que a maioria das contagens médias estava acima dos padrões preconizados pela Portaria nº146/96, com relação à *Staphylococcus coagulase positivo* e coliformes (BRASIL, 1996).

1.3 Ricota

A ricota é um queijo de origem italiana fabricado em diversos países sob várias denominações. É conhecida também por queijo de albumina, por se constituir basicamente desta e de lactoglobulina, que são os principais componentes protéicos do soro, não coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas pelo calor, sob a influência de acidificação, o que constitui o princípio básico da fabricação da ricota (FURTADO, 1994).

O soro constitui subproduto do processamento de queijo, da caseína e de outros laticínios acidificados. Contém a metade do extrato seco do leite, que é composto por lactose, proteínas e sais. Do volume de leite destinado à fabricação de queijos, entre 75 e 85% resulta em soro (ZADOW, 1997).

A utilização do soro na indústria alimentícia vem sendo estudada por diversos autores, e cada vez mais se tem utilizado essa matéria-prima na elaboração de novos produtos, seja como simples substituto da água ou como ingrediente de funcionalidade reológica ou nutricional. Esses novos produtos passaram, então, a fazer parte da dieta da população, incluindo os idosos e principalmente as crianças, o que faz com que o controle da qualidade, não só nutricional, mas também higiênico-sanitário do soro, seja fundamental (CHIAPPINI et al., 1995a,b).

Pelo seu baixo teor de gordura, alta digestibilidade e ausência de sal, a ricota é considerada um produto leve e nutritivo, mundialmente consumido em

muitas dietas alimentares. No período de 1996 a 2001, o produto aumentou sua produção em cerca de 35%, números referentes a estabelecimentos sob inspeção federal (ABIQ, 2001).

Enquadra-se dentre os produtos que aguardam a criação dos padrões de identidade e qualidade assim como o Minas padrão, produtos de destino e origem do soro de queijo, respectivamente (TEIXEIRA, 2005).

A massa da ricota é obtida por meio da acidificação do soro de queijo, adicionado ou não de 10% de leite integral, após seu aquecimento a aproximadamente 92°C. O rendimento médio da fabricação é de cerca de 4 a 6%, sendo um produto de pouca durabilidade, e, portanto, considerado queijo fresco. Geralmente, pode ser comercializada de várias formas: defumada, condimentada ou cremosa, na forma prensada ou em potes (RIBEIRO et al, 2005).

1.4 Microrganismos

A World Health Organization (1984) define doença transmitida por alimento, aquela de característica infecciosa ou tóxica causada por microrganismos que invadem o organismo veiculados por alimentos (PIRES et al., 2002).

Entende-se por toxinfecção alimentar as doenças microbianas de origem alimentar que podem ser subdivididas em duas grandes categorias: intoxicação alimentar, causada pela presença de uma toxina bacteriana formada no alimento, e infecção alimentar, causada pela entrada de bactéria no organismo através da ingestão de alimentos contaminados e consequente reação orgânica pela presença de bactérias ou de seus metabólitos (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação microbiana dos alimentos é indesejável e, inclusive, nociva. Esse aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, que implicariam em contaminação do alimento, busca-se averiguar a presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos (SALOTTI et al., 2006). Usa-se o termo indicador para identificar qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de organismos, cuja presença ou ausência proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra (FORSYTHE, 2002).

Define-se surto quando duas ou mais pessoas apresentam uma síndrome semelhante após a ingestão do mesmo alimento comum (PINTO; BERGMAN, 2000).

Estima-se que as pessoas são cem mil vezes mais suscetíveis a ter uma doença alimentar de origem microbiana do que causada por resíduos de pesticidas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002).

Os agentes patogênicos de origem entérica como bactérias, vírus e parasitos são mais encontrados em água poluídas, podendo ser responsáveis por doenças como disenterias bacilares, amebíase, giardíase e criptosporidiose, entre outras (ROMPRÉ et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2003; OLIVEIRA; TERRA, 2004).

Leite cru é um meio de crescimento ideal para vários microrganismos. Leite e seus derivados são considerados veículos de *Staphylococcus aureus* para infecção em humanos (ZECCONI; HAHN, 2000).

Muitos microrganismos enteropatogênicos são encontrados em leite e laticínios como o queijo, os quais são frequentemente armazenados sob temperaturas inadequadas e consumidos sem nenhum tratamento térmico. Estes são comumente associados a surtos de doenças causadas por alimentos (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002).

É necessário ressaltar importantes aspectos das doenças transmitidas por alimentos: a perda econômica dos indivíduos afetados, das companhias envolvidas, da economia nacional; a perda social das reuniões de lazer ou outras ocasiões especiais, assim como a perda pessoal. Em circunstâncias extremas essas doenças podem causar morte, mas mesmo em casos de doença moderada experiências extremamente desagradáveis são causadas aos pacientes (VARNAM; EVANS, 1991).

Estimou-se que, no ano de 1989, o custo total nos Estados Unidos com doenças transmitidas por alimentos foi de US\$ 6.777.000.000. Nos países em desenvolvimento, onde o problema com doenças diarréicas é muito maior, os prejuízos podem ser também muito maiores (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2002).

1.5 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos ocorrem em grupos que se assemelham a cachos de uva. A espécie estafilocócica mais importante é o *Staphylococcus aureus*, denominado assim por causa da pigmentação amarela das colônias (*aureus* = dourado). Os membros desta espécie são anaeróbios facultativos. (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005).

S. aureus produz muitas toxinas que contribuem para sua patogenicidade, aumentando sua habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. A habilidade de desenvolver resistência a antibióticos como a penicilina contribui para seu perigo, *S. aureus* produz a toxina responsável pela síndrome do choque tóxico, uma infecção grave caracterizada por febre alta e vômitos, algumas vezes ocasionando a morte. *S. aureus* também produz uma enterotoxina que causa vômitos e náusea quando ingerida; esta é uma das causas mais comuns de intoxicação alimentar. (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005).

O gênero *Staphylococcus* é formado por trinta e duas espécies. Destas o *S. aureus* é a mais relacionada a doenças transmitidas por alimentos, devido a sua capacidade de produzir enterotoxinas. Há vários casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos, causados pela ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré formadas (SILVA; GANDRA, 2004).

Os sintomas de intoxicação por *Staphylococcus* são náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia, com período de incubação de 1 a 6 horas. Os sintomas têm curta duração, de poucas horas a um dia, eventualmente a intoxicação alimentar por toxina estafilocócica pode ser fatal (CARMO, 1996).

Glândulas mamárias infectadas por *S. aureus* são a principal causa de contaminação do leite (Jayarao et al, 2004), e a contaminação do equipamento utilizado, assim como das mãos do trabalhador são comuns veículos de transmissão (Cullor, 1997). Embora a pasteurização mate as células de *S. aureus*, as toxinas termoestáveis geralmente mantêm sua atividade biológica. O risco de intoxicações estafilocócicas causadas por alimentos pode ser minimizado através de um resfriamento adequado do leite até o momento do tratamento de calor, seguido de rigorosos esforços para evitar a recontaminação (JORGENSEN et al, 2005).

O leite e derivados, pelo alto índice de mastite bovina associado a *S. aureus*, bem como os derivados cárneos, devido à grande manipulação a que são submetidos, são facilmente contaminados com Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) (GANDRA et al, 2009).

Peresi et. al., 2004, relataram que no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, ocorreram quatro casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos, pelo consumo de alimentos contaminados por *S. aureus*, na cidade de São José do Rio Preto, SP. Os alimentos veiculadores apresentaram contagem de *S. aureus* superior a 10^6 UFC (Unidade Formadora de Colônia) por grama de alimento, quantidade suficiente para desencadear a produção de enterotoxina.

No Brasil, apesar de se desconhecer o número correto de surtos de intoxicações por *S. aureus*, estudos prévios indicam que leite cru, assim como laticínios manufaturados a partir deste, são agentes importantes em surtos em humanos (TONDO et al, 2000).

Há na literatura, dados de diversos pesquisadores demonstrando que espécies coagulase negativa de *Staphylococcus* possuem a capacidade de produzir enterotoxina em meios de cultura laboratoriais, sejam isolados de alimentos, de animais saudáveis ou de animais doentes. Algumas espécies coagulase negativas relatadas como produtoras de enterotoxina foram: *S. epidermidis*, *S. saprofiticus*, *S. haemoliticus*, *S. xylosus*, entre outras. Também foi verificada experimentalmente em alimentos a produção de enterotoxinas por linhagens não produtoras de coagulase. Foram relatados, na literatura, três casos de surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativas, tendo sido o primeiro no Japão, por consumo de leite, o segundo nos EUA, por consumo de carne assada, e o terceiro no Brasil, pelo consumo de leite cru (PERESI et al, 2004).

1.6 Salmonella

As bactérias *Salmonella* spp. são bastonetes gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Seu habitat normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais. Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, causando salmonelose, ou gastroenterite por *Salmonella* spp. (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005).

A salmonelose tem um período de incubação de 12 a 36 horas. A *Salmonella* spp. primeiramente invade a mucosa intestinal e se multiplica ali. Ocasionalmente ultrapassa a mucosa intestinal para penetrar nos sistemas linfático e cardiovascular e dali pode se disseminar e afetar muitos órgãos. (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005).

A salmonelose é uma zoonose de grande importância em todo o mundo e apresenta-se como um desafio para a saúde pública em razão da elevada endemicidade, alta morbidade e, acima de tudo, pela dificuldade do seu controle (SILVA; DUARTE, 2002). A partir da década de 70, observou-se aumento considerável e constante de surtos de salmonelose (ANDRIGHETO, 2006).

As salmonelas estão amplamente difundidas na natureza e são capazes de infectar o homem e os animais. As aves acometidas por salmonelas paratíficas podem desenvolver a doença clinicamente ou de forma assintomática, albergar esses agentes, tornando-se fonte em potencial de salmonelose para seres humanos (NAGARAJA, POMEROY, WILLIAMS, 1991; BARROW, 1993).

Os produtos à base de carne são particularmente suscetíveis à contaminação por *Salmonella*. As fontes de bactérias são os tratos intestinais de muitos animais, e a carne, especialmente de frango, pode ser contaminada facilmente em fábricas de processamento (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005). Segundo Kottwitz et al. (2003), no Brasil, diversos são os relatos que implicam ovos em surtos de toxinfecções causadas por *Samonella* spp. Estima-se que um em cada 20 mil ovos nos Estados Unidos esteja contaminado com *Salmonella* spp. (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2005). Segundo Okamura et al. (2001), a capacidade de transmissão transovariana e horizontal de *S. Enteritidis* para ovos resultou em ampla disseminação e persistência desse sorovar na indústria avícola.

Em geral, a manipulação inadequada durante o preparo de alimentos é um fator importante de contaminação cruzada (Téo, 2002). A viabilidade intracelular do microrganismo, a produção de citotoxinas, a presença de endotoxinas e a resistência aos antimicrobianos convencionais, figuram dentre os principais fatores de virulência associados às infecções pelos diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. em animais (QUINN et al. 2005; FERREIRA & CAMPOS, 2008).

1.7 Coliformes Totais e Termotolerantes

O "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" define o grupo coliforme como: "todas as bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, gram negativas, não esporuladas e na forma de bastonete", as quais fermentam a lactose com formação de gás dentro de 48h a 35°C. Neste grupo incluem-se organismos que diferem nas características bioquímicas, sorológicas e no seu habitat. Podem ser classificadas em: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e outros gêneros que quase nunca aparecem em fezes como a *Serratia* (CETESB, 1997).

Os coliformes têm sido úteis para medir a ocorrência e grau de poluição fecal em águas há, aproximadamente, 70 anos. Durante este tempo, acumulou-se grande número de dados que permitem avaliação da sensibilidade e especificidade de tal indicador bacteriano e da presença de poluição de origem fecal. Por outro lado, os coliformes termotolerantes, um subgrupo dos coliformes, dão uma correlação direta da poluição por fezes de animais de sangue quente (GELDREICH, 1974).

A principal característica bioquímica usada para identificar os coliformes termotolerantes é a sua capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás, na temperatura de 44,5°C (GELDREICH, 1974).

1.7.1 *Escherichia coli*

O uso do grupo coliforme mais especificamente, de *Escherichia coli* como indicador da qualidade microbiológica da água, data de seu primeiro isolamento a partir de fezes, no final do século XIX (ROMPRÉ et al., 2002).

E. coli é um dos agentes etiológicos mais freqüentemente isolados em casos de diarreia no homem e em diferentes espécies animais (HOLAND, 1990; NATARO; KAPER, 1998). A maioria das cepas de *E. coli* presentes no trato gastrointestinal são comensais não patogênicos (NATARO; KAPER, 1998). Cepas enteropatogênicas de *E. coli* causam diarreia aquosa ou sanguinolenta devido à liberação de enterotoxinas ou invasão dos tecidos (FRANCIS, 2002).

A detecção de coliformes, especialmente *E. coli*, em alimentos processados é uma indicação de contaminação fecal. Também evidencia o controle inadequado do material cru, a contaminação do manipulador envolvido no processo de produção, e

a pobre qualidade do produto final. O fato de alguns sorogrupos de *E. coli*, cuja patogenicidade é conhecida pelos seus mecanismos de infecção e toxigenicidade (CÂMARA et al., 2002), poderem ser isolados do queijo também sugere que outros microrganismos enteropatogênicos podem também estar presentes neste alimento (RITTER et al., 2001).

As cepas de *E. coli* implicadas em doenças de origem alimentar podem ser divididas em 5 grupos: enteropatógenas (EPEC), enterotoxigênicas (ETEC), enteroinvasivas (EIEC), enterohemorrágicas (EHEC) e facultativamente enteropatógenas (FEEC). As EPEC geralmente não produzem toxina, mas produzem um fator de aderência e podem causar diarreia. As EIEC não produzem enterotoxina e sua patogenia é semelhante à das *Shigella*. As ETEC produzem duas toxinas, sendo uma termolábil e a outra termoestável, e produzem também um fator de colonização que media a união dos microrganismos ao epitélio intestinal. As EHEC, representadas pela *E. coli* O157:H7, produzem as toxinas SLT-I e SLT-II, causadoras de enterohemorragias (JAY, 1994).

Os primeiros estudos sobre a enfermidade diarréica relacionada com *E. coli* foram realizados na ocasião de uma epidemia acontecida em uma creche, em meados de 1940, que produziu um índice de mortalidade da ordem de 50%. As cepas de *E. coli* mais importantes como possíveis patógenos transmitidos por alimentos, se encontram nas fezes (JAY, 1994).

De Buyser et al. (2001) contabilizaram 60 surtos de doenças transmitidas por leite e derivados, na França e em outros países, de 1980 a 1997, e determinaram que *E. coli* patogênica foi responsável por aproximadamente 20% dos casos notificados, e que queijo feito a partir de leite cru ou não especificado foi o alimento mais frequentemente envolvido.

2 OBJETIVOS

Verificar a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo minas frescal e ricota;

Verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em amostras de queijo minas frescal e ricota;

Verificar a ocorrência de Coliformes Termotolerantes em amostras de queijo minas frescal e ricota e identificar *E. coli*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas. Foram analisadas 42 amostras de alimentos, sendo 21 queijos minas frescal e 21 ricotas, os quais foram obtidos através de 2 coletas em 3 supermercados escolhidos aleatoriamente. As coletas foram realizadas de junho a outubro de 2010. Imediatamente após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e enviadas para o laboratório para a realização das análises microbiológicas.

Pesou-se 25 g da amostra e diluiu-se em 225 mL de diluente (água peptonada a 0,1%), agitou-se no liquidificador até homogeneizar. Então, retirou-se 1 mL da homogeneização e depositou-se em 3 tubos contendo 9 mL de água peptonada estéril para diluição. Foram realizadas quatro diluições em triplicata para cada amostra.

3.2 Isolamento e Identificação de *Staphylococcus Coagulase Positiva* (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 1997). (Anexo 1)

Para contagem de *Staphylococcus* spp. foi utilizado o método NMP (Número Mais Provável) recomendado para alimentos naturais e não processados, com baixo índice de contaminação.

Inoculou-se porções de 1mL de cada diluição, em uma série de três tubos contendo 10ml de Caldo Tryptic Soy Broth (TSB), acrescentado de 10% de Cloreto de Sódio (NaCl); os tubos foram incubados a 36°C/48h.

Para confirmação, semeou-se uma alçada da cultura de cada tubo positivo, com turvação, em placas de Ágar Baird-Parker (BP) e incubou-se a 36°C/48h.

Verificou-se a presença, de colônias típicas destes microrganismos: circulares, pretas, pequenas, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por uma zona opaca ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca. No caso de ausência dessas características típicas, considera-se a colônia como não sendo de *Staphylococcus* e sim de algum outro microrganismo.

Após a confirmação das colônias típicas, selecionou-se uma ou mais colônias de cada placa, semeou-se em tubos de Ágar Nutriente (AN) e incubou-se a 36°C/24h, para realização de coloração de Gram e posteriormente a realização da prova de coagulase.

O teste de coagulase foi feito através da semeadura pelo método de dispersão, do inóculo para um tubo contendo 2 mL de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e incubou-se a 36°C/24h. Após este período retirou-se 1,8 mL do inóculo e aos 0,2 mL restantes adicionou-se 0,2 mL de coagu-plasma, e incubou-se novamente a 36°C por um período de 6 horas, sendo que a cada hora foi verificada a formação de coágulo.

Anotou-se o número de tubos de TSB-NaCl confirmados pela coagulase e determinou-se o NMP/g de produto, analisado através da tabela de Hoshinks.

3.3 Isolamento e Identificação de Coliformes Termotolerantes (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 1997). (Anexo 2)

De cada diluição citada no item 3.1, retirou-se 1 mL e colocou-se em tubos contendo 9 mL de Caldo Lactosado (CL) estéril, incubou-se a 36°C/ 24-48 horas, com a finalidade de fazer um teste presuntivo de Coliformes totais.

Após o período de incubação, verificou-se os tubos de CL positivos, com turvação e formação de bolha de ar no tubo de Dhuran, passou-se então uma alçada de cada tubo positivo para tubos de meio *E. coli* (EC) para confirmação de coliformes termotolerantes e incubou-se a 45°C/24-48 horas.

Após o período de incubação contou-se os tubos positivos e verificou-se os resultados na tabela do NMP.

Para a identificação de *Escherichia coli*, foi retirada uma alçada de cada tubo de EC positivo e semeou-se, pela técnica de esgotamento, em placas de Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubou-se a 36°C/24-48 horas. Após o período de incubação foram selecionadas as colônias características, esféricas, esverdeadas e

metálicas nas quais foram feitos os testes bioquímicos MR (Methyl Red), VP (Voges Proskauer), Ágar Citrato e Motilidade, Indol e Produção de ácido sulfídrico (SIM).

3.4 Isolamento e Identificação de *Salmonella* (SILVA, JUNQUEIRA, SILVEIRA, 1997). (Anexo 3)

Para isolamento e identificação de *Salmonella* spp., foi pesada assepticamente 25g de amostra, homogeneizada em 225mL de Caldo Lactosado (CL), no qual foi verificado o pH, que deve ser de 6,8, e incubado a 36°C por 24 horas para recuperação de células injuriadas. Então, inoculou-se a amostra em tubos contendo os meios de enriquecimento seletivo Rapaport (RR), Tetrionato (TT) e novamente incubou-se a 36°C por 24 horas. Após este período, de cada tubo inoculado, foram semeadas placas com os meios seletivos Hektoen Enteric (HE) e Xylosine Lisine Desoxicolate (XLD), através do método de esgotamento e incubadas a 36°C por 24 horas. Colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram submetidas a testes bioquímicos nos meios Lisine Iron Agar (LIA), Ágar Tríplice de Ferro (TSI) e Uréia para obtenção de resultados conclusivos. Sendo então as amostras positivas submetidas ao teste de identificação sorológica, utilizando o soro anti *Salmonella* somático polivalente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliadas 42 amostras, (21 de queijo minas e 21 de ricota) as quais foram coletadas em três estabelecimentos comerciais da cidade de Pelotas, RS. Os índices de contaminação bacteriana por coliformes termotolerantes, (ECP) e *Salmonella* spp. estão demonstrados nas Fig. 1 e 2.

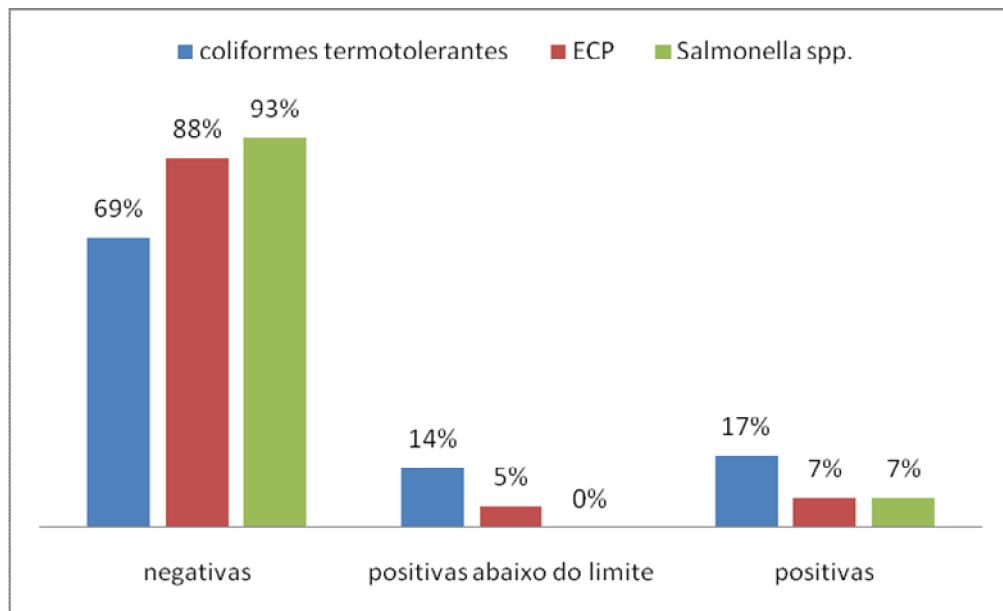


Figura 1 – Índice de contaminação bacteriana das amostras de queijo minas e ricota.

As percentagens referentes às contaminações nos diferentes produtos (queijo minas frescal e ricota) podem ser avaliadas na Fig. 2:

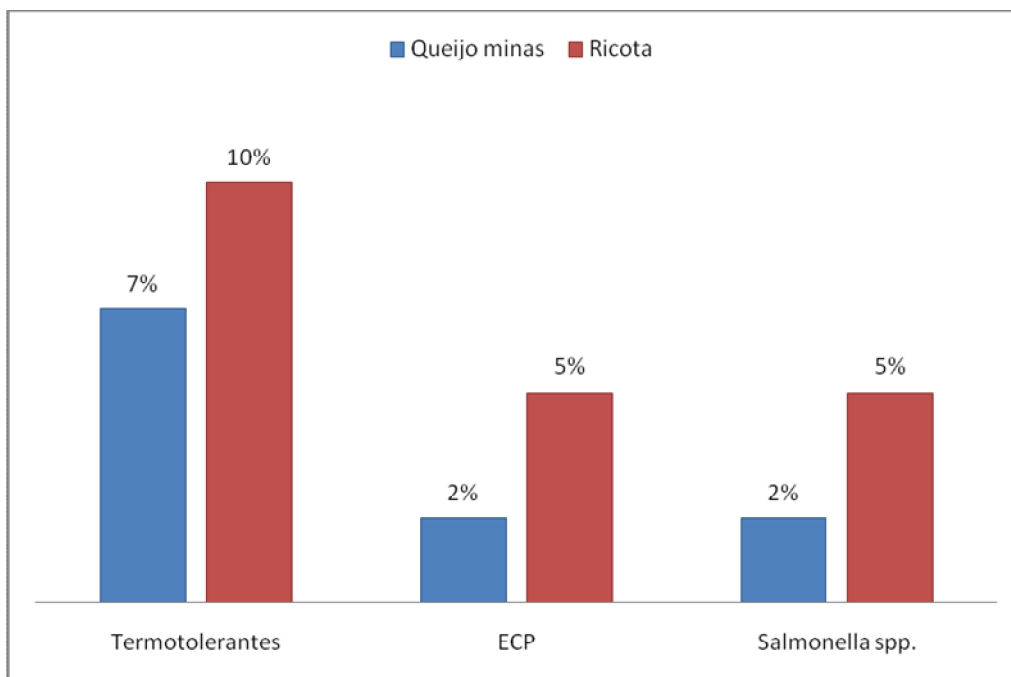


Figura 2 – Contaminação bacteriana acima do limite permitido em queijo minas e ricota.

Dentre as 42 amostras analisadas 7 (17%) apresentaram crescimento de Coliformes Termotolerantes superior ao limite permitido de $5 \times 10^3 \text{g}^{-1}$ (Brasil, 2001), como pode ser evidenciado na Fig. 3:

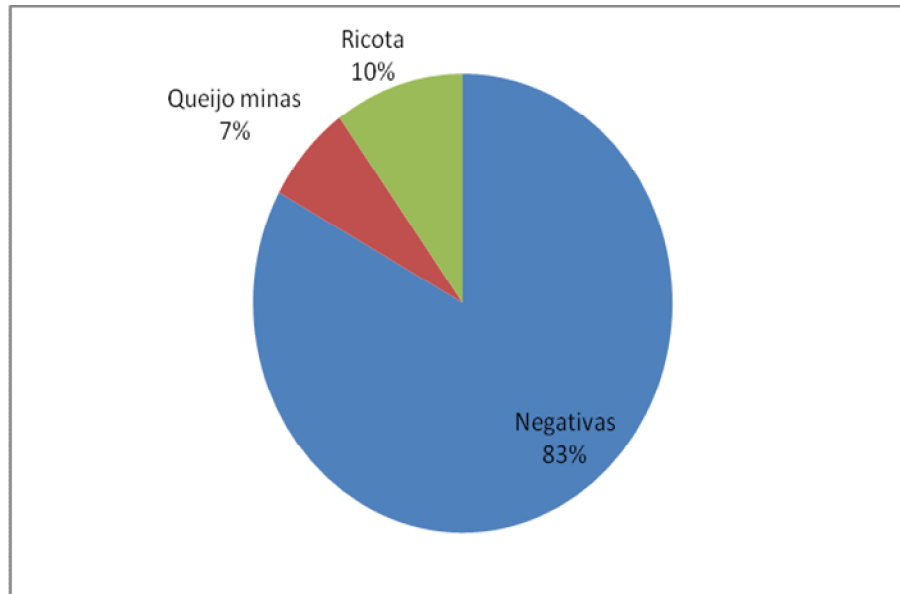


Figura 3 – Índices de contaminação de queijo minas frescal e ricota por Coliformes Termotolerantes

Este resultado é inferior aos dados de Santana et al. (2008) que verificaram que 93,3% dos queijos coalho analisados não estavam aptos à comercialização e, apresentaram índices de contaminação por coliformes termotolerantes superiores ao permitido pela legislação brasileira. Araújo et al. (1997) observaram que 100% das amostras de queijo-de-minas frescal analisadas, obtidas em supermercados e padarias localizadas na cidade do Rio de Janeiro, revelaram a presença de coliformes termotolerantes em níveis acima dos tolerados. Já Pereira et al. (1999) observaram, em Belo Horizonte, que 90% das amostras de queijo-de-minas frescal analisadas no período de 1995-96 apresentaram coliformes termotolerantes acima dos limites estabelecidos por lei. Brugnera et al (2010) analisaram 28 amostras de ricota provenientes de estabelecimentos comerciais, destas, 18(64,2%) apresentaram contagem de Coliformes Termotolerantes acima de $5,0 \times 10^2 \text{NMP/g}^{-1}$.

Os resultados inferiores encontrados neste trabalho podem ser justificados por precauções tomadas durante todo o processo de produção do queijo analisado. Desde a escolha da matéria prima, a sua manipulação, os materiais utilizados e sua higienização, assim como a higienização dos trabalhadores e do local de trabalho.

Justificam-se pelo uso das boas práticas de fabricação que diminuem a exposição do produto à contaminantes e conseqüentemente os índices de crescimento bacteriano no produto final.

Massa; Freitas; Okura (2006) encontraram em 23 (76,67%) amostras de queijo minas frescal coletadas aleatoriamente no comércio de Uberaba, MG, contagens acima do padrão para coliformes termotolerantes. Vinte e quatro amostras de queijos de minas tipo frescal (60%) apresentaram coliformes a 45°C acima de 5×10^3 UFC/g, estando todas impróprias para consumo humano de acordo com a contagem tolerada pela RDC ANVISA nº12/01 (BRANT;FONSECA;SILVA, 2007).

Sangaletti et al 2009 encontraram em 83,33% de suas amostras contagens de *E. coli* acima de $2,4 \times 10^3$ NMP.g⁻¹, visto que *E. coli* se enquadra dentro de Coliformes Termotolerantes estas amostras são caracterizadas inviáveis para o consumo humano. Foram encontrados também por Lisita (2005) queijos Minas com SIF contagem de $1,1 \times 10^8$ NMP.g⁻¹ de coliformes fecais, ainda na indústria. Loguercio e Aleixo (2001) encontraram em 93,33% contagens acima do padrão para Coliformes Termotolerantes. Em pesquisa em queijo minas frescal Rocha; Buriti; Saad (2006) verificaram que 61% apresentaram contagens de *E. coli* acima de 5×10^3 UFC/g, sendo este mais um resultado superior ao do presente trabalho.

Em contrapartida, Oliveira et al. (1998) relataram a detecção de coliformes termotolerantes acima do nível permitido na legislação brasileira em 9,4% das amostras de queijo-de-minas elaboradas por seis fábricas de laticínios localizadas na região nordeste do estado de São Paulo, mostrando um resultado não tão alarmante quanto os primeiros. Em trabalho realizado por Ribeiro et al (2005) foram encontrados resultados inferiores a 0,3 NMP/g Coliformes Termotolerantes em todas as amostras de ricota analisadas. Vilela et al. (2001), ao analisarem 70 amostras de queijos-de-minas, processados industrialmente em pequenos laticínios da região de Juiz de Fora-MG, encontraram 15,7% dessas impróprias para o consumo humano.

Estes resultados corroboram o do presente trabalho já que também mostram baixas freqüências dos microrganismos em questão. Ainda que baixos estes resultados não são positivos, pois por se tratarem de produtos industrializados estes produtos não deveriam apresentar nenhum tipo de contaminação fora dos padrões estabelecidos.

A frequência de contaminação por *Escherichia coli* em queijo minas e ricota pode ser analisada na Fig.4.

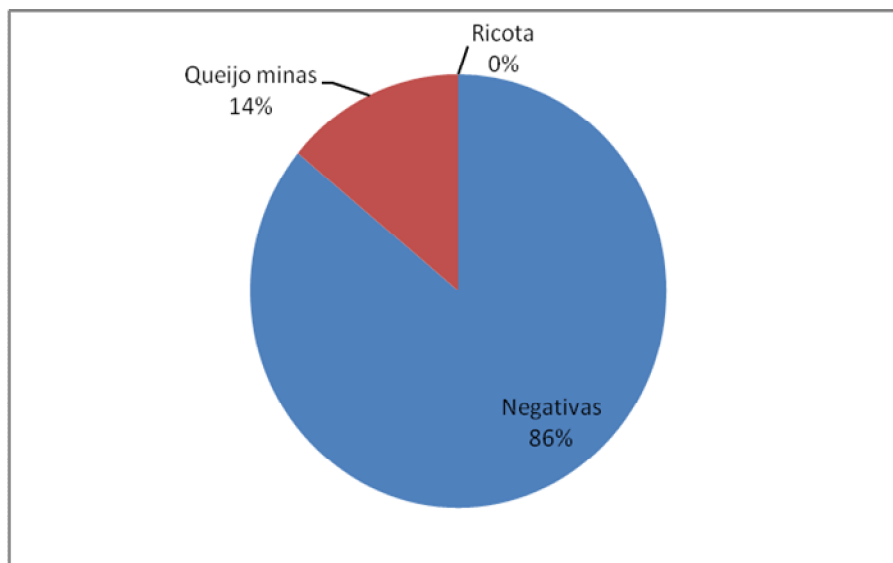


Figura 4 – Frequência de contaminação de ricota e queijo minas frescal por *Escherichia coli*.

Das 42 amostras testadas, evidenciou-se a presença de *Salmonella* spp. em 3 (7%), sendo 2(5%) em ricota e 1 (2%) em queijo minas frescal, como pode ser evidenciado na Fig. 5.

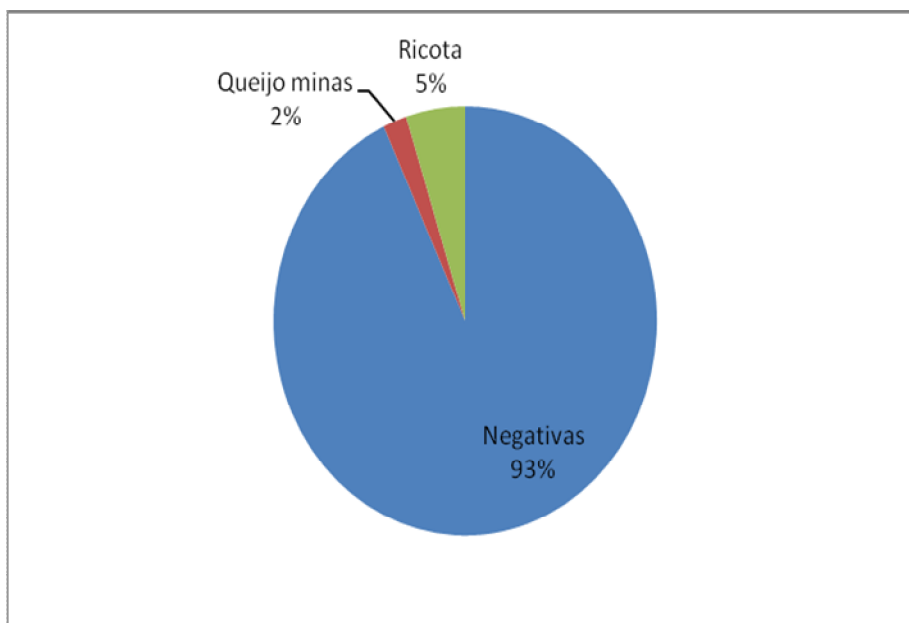


Figura 5 – Frequência de contaminação de ricota e queijo minas frescal por *Salmonella* spp.

Santana et al. (2008) detectou *Salmonella* spp. em 16 (26,7%) das amostras de queijo-coalho analisadas. Feitosa et al. (2003) também observaram *Salmonella* spp. em 9,1% das amostras de queijo produzido no Rio Grande do Norte. Sangaletti et al (2009) não encontraram *Salmonella* spp. em nenhuma das amostras pesquisadas. Estes resultados reafirmam a baixa frequência de *Salmonella* spp. encontrada no presente trabalho.

Schneider; Pinto; Schmidt (2009) ao analisarem 27 amostras de queijo da serra produzidos em 11 fábricas de Cambará do Sul não encontraram nenhuma ocorrência de *Salmonella* spp. Em trabalho realizado por Feitosa et al (2003) *Salmonella* spp. foi detectada em 9% das amostras de queijo de coalho, e em 15% das amostras de queijo de manteiga, caracterizando-os como produtos em condições higiênicas insatisfatórias. Santos et al (2008) encontraram nas amostras analisadas a presença de *Salmonella* spp. em 6,25%, estando 93,75% em conformidade com a legislação. Pereira et al (1999) avaliaram 168 amostras de queijo minas frescal e não encontraram *Salmonella* spp. em nenhuma destas.

A baixa contaminação por *Salmonella* spp. tanto no presente trabalho quanto nos encontrados na literatura reforçam a ideia de que *Salmonella* spp. não é um contaminante tão frequente como o grupo Coliformes e *Staphylococcus* spp., dado que ocasionalmente podem ser encontrados no intestino de animais de sangue quente, mas não são encontrados na pele ou mucosas. A contaminação por *Salmonella* spp. causa sintomas na maioria dos casos, porém podem ser disseminadas por portadores assintomáticos que podem servir como reservatórios e contaminar o produto.

Houve crescimento de *Staphylococcus* spp. em todas as 42 amostras, no entanto apenas 5 (12%) foram confirmadas como *Staphylococcus* coagulase positiva. Destas, apenas 3 (7%), , ultrapassaram a concentração limite de $10^3/g^{-1}$ permitida pela ANVISA, 2(5%) de ricota e 1 (2%) de minas, conforme apresentado na Fig. 6:

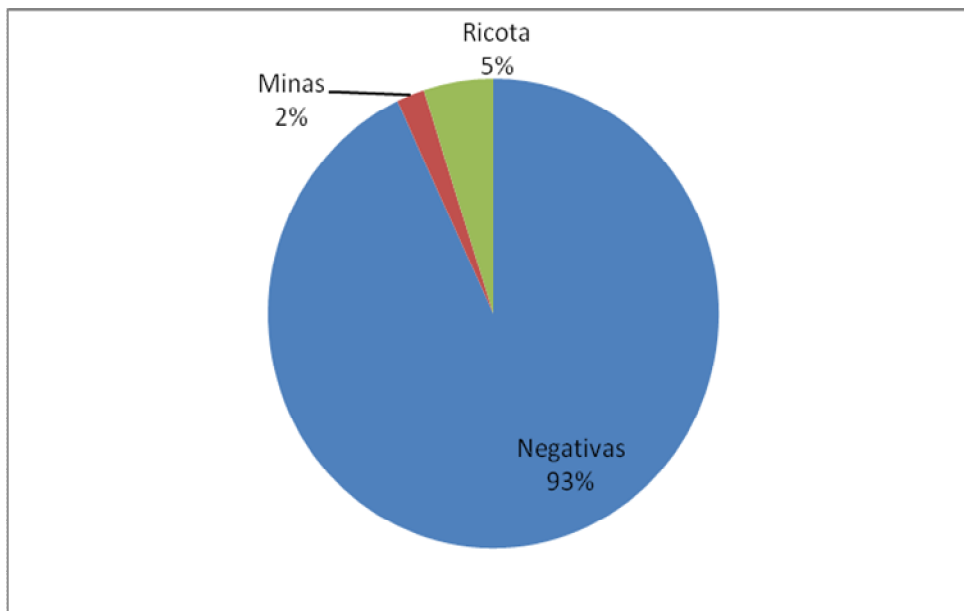


Figura 6 – Índices de contaminação acima do padrão por Estafilococos Coagulase Positiva (ECP) em queijo Minas frescal e ricota.

Almeida Filho e Nader Filho (2000) analisaram 80 amostras de queijos-de-minas fabricados artesanalmente, das quais 40 (50%) apresentaram-se impróprias para o consumo humano quanto à contagem de *S. aureus*. Sabioni et al. (1994), em levantamento realizado com 30 amostras de queijo-de-minas frescal na cidade Ouro Preto, MG, encontraram resultados positivos para *S. aureus*, com contagem de até 10^8 UFC/g. Loguercio e Aleixo (2001), ao pesquisarem queijo-de-minas frescal, encontraram 97% de amostras em desacordo com a legislação em relação à contagem de *S. aureus* e Laicini et al. (1993), ao analisarem laudos analíticos do Instituto Adolfo Lutz de 1989 a 1990, constataram 92% das amostras de queijos-de-minas em desacordo com os padrões legais. Cabral (1993), em análise de 50 amostras de queijo-coalho na cidade de João Pessoa, PB, demonstrou que 37 amostras foram positivas para *S. aureus*, com contagem média de $1,2 \times 10^5$ UFC/g. Komatsu et al (2010) concluiu que 88% das 50 amostras analisadas de queijo Minas frescal produzido em Uberlândia-MG estavam contaminadas, com níveis inaceitáveis de *Staphylococcus* coagulase positiva. Castro et al (2007) encontraram *Staphylococcus* coagulase positiva acima do limite permitido em 9 das 12 amostras analisadas, totalizando 75% de contaminação.

A capacidade de *Staphylococcus* spp. de se desenvolver em condições diversas, e o fato de ser habitante natural da pele e mucosas do ser humano

colocam esse gênero como um dos principais agentes de contaminação de alimentos, principalmente aqueles que são intensamente manipulados. São muitos os pontos onde pode ocorrer a contaminação por *Staphylococcus* spp., desde o momento da obtenção da matéria prima, já que a bactéria é agente da mastite bovina e pode contaminar o leite, até o momento do produto final, toda e qualquer manipulação descuidada pode ser fonte de contaminação.

Ribeiro et al (2005) encontraram em todas as amostras de ricota avaliadas resultados inferiores a $1,0 \times 10^2$ NMP/g⁻¹. Esse resultado é semelhante ao deste trabalho que também apresenta baixas taxas de contaminação por ECP. Estes resultados nos levam a crer que as boas práticas de produção foram tomadas e que houve cuidado com as possíveis fontes de contaminação bacteriana, assim como a manutenção adequada da temperatura do material durante todo seu processo de produção e estocagem.

5 CONCLUSÃO

O produto ricota revelou-se mais contaminado que o queijo minas frescal em relação aos três contaminantes observados.

Encontrou-se Coliformes Termotolerantes em 13 (31%) das amostras. Sendo 5 (12%) em queijo minas frescal e 8 (19%) em ricota, e 3 (7%) das amostras contaminadas de queijo minas e 4 (10%) de ricota ultrapassaram o limite permitido pela legislação brasileira.

Dentre as 7 (17%) amostras confirmadas como Coliformes Termotolerantes que ultrapassaram a concentração permitida, 6 (14%) foram identificadas como *Escherichia coli*.

Foram encontrados ECP em 5 (12%) das amostras. Com 2 (5%) destas correspondentes a queijo minas e 3 (7%) a ricota, dentre estas 1 (2%) e 2 (5%) acima do padrão, respectivamente.

Em 3 (7%) amostras identificou-se a presença de *Salmonella* spp., correspondendo destas, 1 (2%) a queijo minas frescal e 2 (5%) a ricota.

Os baixos índices de contaminação tanto em queijo minas quanto em ricota são um resultado positivo, mas ainda preocupantes dado que se trata de produtos industrializados e podem também oferecer risco à saúde do consumidor.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M.; Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e Coliformes Fecais. **Revista Higiene Alimentar**. v. 17, n.11, p. 79-85. 2003.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". **Rev. Saúde Publ.**, v.34, p.578-580, 2000.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo minas Frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Hig. Alim.**, v.16, p.71-73, 2002.

ANDRIGHETO, C. Disseminação de *Salmonella Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica. São Paulo. 2006. 99f. **Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.**

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. **Dados de produção Brasil em toneladas de produtos lácteos: 2000. São Paulo, 2001.**

ARAÚJO, V.S.; SANTOS, E.C.S.; QUEIROZ, M.L.P. et al. Análise bacteriológica do queijo-de-minas frescal comercializado na cidade do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19. Rio de Janeiro, 1997. **Anais... Rio de Janeiro: SBM, 1997, p. 283.**

BARROW, P.A. *Salmonella* - present, past and future. **Avian Pathol.** 22:651-669. 1993.

BRANT, L.M.F.; FONSECA, L.M.; SILVA, M.C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.59 no.6 Belo Horizonte Dec. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento de Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA). Brasília, 1974. p.138-209**

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº146, de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Seção I, Brasília, DF, p.3977-3886, 1996.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 01, de 28 de janeiro de 1987. **Diário Oficial da União**, Seção 1. Brasília, DF, p.2197-2200. 1987.

BRUGNERA, D., F.; De OLIVEIRA, M., M.; De SOUZA, T., R.; CAMARGOS, N., G.; BATISTA, N., N.; PICCOLI, R., H. Ricota: Os riscos microbiológicos de um alimento considerável saudável. **XXVII Congresso Nacional de Laticínios. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).2010**

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JUNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.54, no.3, Belo Horizonte. June. 2002.**

CABRAL, T.M.A. Coliformes totais e fecais, e *Staphylococcus aureus* enteropatogênico em queijo de "coalho" comercializado no município de João Pessoa, PB. **88f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1993.**

CAIXETA, C. M.; REZENDE, P. L.; AZEVEDO, A. C.; ROSSI, D. A. *Staphylococcus* coagulase positiva em queijo minas artesanal comercializado em feiras livres de Uberlândia-MG. In: II Congresso Latino Americano e Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 2005, Búzios. **Anais do II Congresso Latino Americano e Brasileiro de Higienistas de Alimentos (Higiene Alimentar encarte eletrônico). v. 19. 2005.**

CÂMARA, S.A.V.; AMARAL, G.B.; MULLER, M.T. Avaliação microbiológica de queijos tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2000. **Hig. Alim., v.16, p.32-36, 2002.**

CARMO, L. S. et al. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* Present in Food Implicated in Food Poisoning. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology, v. 27, nº. 2, p. 122-125, apr.-jun. 1996.**

CASTRO, V., de S.; do NASCIMENTO, V., L., V.; de OLIVEIRA, D., S., V.; SOARES, M., J., S.; da SILVA, M., J., M., PESQUISA DE COLIFORMES E *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO EM QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO EM TERESINA – PI. **II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - PB – 2007.**

CAVALCANTE, J.F.M.; ANDRADE, N.J.; FURTADO, M.M. et al. Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. **Cienc. Tecnol. Aliment., v.27, p.205-214, 2007.**

[CETESB] Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Controle da qualidade da água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo; 1997. p. 152-4.**

CHIAPPINI, C.C.J.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação do soro de queijo quanto aos coliformes totais e coliformes fecais. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes, v. 50, p.253-257, 1995a.**

CHIAPPINI, C.C.J.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação do soro de queijo quanto à *Staphylococcus aureus*. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, v. 50, p.259-263, 1995b.

COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: un système modèle à l'interface génétique bactérienne et biologie cellulaire. **Bulletin de la Société Française de Microbiologie**. Paris, v.7, p.247-250, 1992.

CULLOR, J.S. Risks and prevention of contamination of dairy products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, 16:472-481, 1997.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M. et al. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **Int. J. Food. Microbiol.**, v.67, p.1-17, 2001.

FEITOSA, T.; BORGES, M., de F.; NASSU, R., T.; AZEVEDO, E., H., de F.; MUNIZ, C., R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.23 suppl.0 Campinas Dec. 2003**.

FERREIRA E.O. & CAMPOS L.C. *Salmonella*, p.329-338. In: Althertum F. & Trabulsi L.R. (Eds), **Microbiologia**. 5ª ed. Atheneu, São Paulo, 2008.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 2002. 424p.

FRANCIS, D.H. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis. **J.Swine Health Prod.**, v.10, p.171-175, 2002.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, P. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4 ed., Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1993. 229p.

FURTADO, M. M. Tecnologia de queijos: **Manual técnico para produção industrial de queijos**. São Paulo: Pipemar, 1994. 118 p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos: causas e prevenção**. São Paulo: Fonte, 1999. 176p.

GANDRA, T. K. V.; OLIVEIRA, M. G.; BASSANI, M. T., da SILVA, W. P. Perfil de resistência/sensibilidade a antibióticos em cepas de estafilococos coagulase positiva isoladas de embutidos e de queijos, 2009. **XVIII Congresso de Iniciação Científica – UFPEL, XI ENPOS, I Mostra Científica**.

GELDREICH, E.E. Aspectos microbiológicos dos esgotos e dos seus processos de tratamento. In: Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. **Desinfecção das águas**. São Paulo, CETESB. 1974. cap. 10, p. 115-34.

GELDREICH, E.E. Qualidade microbiológica em águas potáveis. In: Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. **Desinfecção das águas. São Paulo, CETESB, 1974, cap. 7, p. 73-93.**

HOLAND, R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.3, p.345-375, 1990.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF).1997. **APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos. Varela, São Paulo.**

JAY, M. J. **Microbiologia Moderna de Los Alimentos.** 3ª ed. Zaragoza, España: Editorial Acibra, 1994.

JAYARAO, B.M.; PILLAI, S.R.; SAWANT, A.A.; WOLFGANG, D.R.; HEGDE, N.V. Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. **J. Dairy Sci.**, 87:3561-3573, 2004.

JORGENSEN, H.J.; MORK, T.; HOGASEN, H.R.; RORVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **J. Appl. Microbiol.**, 99:158-166, 2005.

KOMATSU, R., S.; RODRIGUES, M., A., M.; LORENO, W., B., N.; SANTOS, K., A. OCORRÊNCIA DE *Staphylococcus* coagulase positiva EM QUEIJOS MINAS FRESCAL PRODUZIDOS EM UBERLÂNDIA-MG. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 26, n.2, p. 316-321, Mar./Apr. 2010.

KOTTWITZ, Luciana Bill Mikito; OLIVEIRA, Tereza Cristina Rocha Moreira de; ALCOCER, Iliana; FARAH, Sonia Maria de Souza Santos; ABRAHÃO, Wanda Sikorski Moscalewski; RODRIGUES, Dalia dos Prazeres. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta scientiarum. Health sciences / Editora da Universidade Estadual de Maringá.-- Vol.25, no.1 (2003).**

LAICINI, Z.M.; PARMEZZANI, A.F.; PAULA, S.R. et al. Avaliação dos laudos analíticos das amostras de alguns tipos de queijos recebidos pelo instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.53, p.17-20, 1993.

LISITA, M. O. Evolução da população bacteriana na linha de produção do queijo Minas Frescal em uma indústria de laticínios. **Piracicaba, SP. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado)** - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente. **Cien. Rural**, v.31, p.1063-1067, 2001.

MANDIL, A., MORAIS, V.A.D., PEREIRA, M.L et al. *Staphylococcus aureus* em queijos "tipo Minas". **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.2, p.233-241, 1982.

MASSA, C.B FREITAS, M.P. OKURA, M.H. AVALIAÇÃO HIGIÊNICO SANITÁRIA DE QUEIJOS MINAS FRESCAL COMERCIALIZADOS EM UBERABA, MG. **Anais da V Jornada Científica da FAZU, 23 a 28 de outubro de 2006.**

MCLAUHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and *listeriosis*: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology, Londres, v.92, p.15-33, 2004.**

NAGARAJA, K.V., POMEROY B.S., WILLIAMS J.E. 1991. Paratyphoid infections, p. 99-130. In: **Calnek et al. (eds.) Diseases of Poultry.** 9th ed. Iowa State University Press, Ames, USA.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clin. Microbiol. Rev., v.11, p. 142-201, 1998.**

NOGUEIRA, G.; NAKAMURA, C.C.; TOGNIM, M.C.B.; ABREU FILHO, V.A.; DIAS FILHO, B.P. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, **Brazil. Rev. Saúde Pública, v.37, n.2, p.232-236, 2003.**

OLIVEIRA, A.C.S.; TERRA, A.P.S. Detecção de coliformes totais e fecais em água dos bebedouros do campus I da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro. **Higiene Alimentar, v.18, n.125, p.57-63, 2004.**

OLIVEIRA, C.A.F.; MORENO, J.F.G. MESTIERI, L. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos minas frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Hig. Aliment., v.12, p.31-35, 1998.**

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Segurança Básica dos Alimentos para Profissionais da Saúde. São Paulo: Roca, 2002.**

PEREIRA, M. L., LARA, M.A., DIAS, R.S. In. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". **Rev Microbiol, São Paulo, v.22, p.349-350, 1991.**

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

PERESI, J. T. M. Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos Contaminados por *Staphylococcus aureus*, Ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto – SP. **Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 63, nº. 2, p. 232 – 236, 2004.**

PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo frescal de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos, v. 1, n. 26, p. 64-69, jan./mar. 2006.**

PIRES, E. F. et. al. Surtos de toxinfecções alimentares em unidades de alimentação e nutrição. **Higiene Alimentar, São Paulo, Nº 16, nº 101, p. 20-24, outubro 2002.**

QUINN, P.J.; MARKEY, B.; CARTER, M.E. DONNELLY, W.J. & LEONARD, F.C. 2005. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.** Artmed, Porto Alegre, p.115-130.

RIBEIRO, Ana Cristina; MARQUES, Simone Cristina; SODRÉ, Arthur de Freitas; ABREU, Luiz Ronaldo de; PICCOLI, Roberta Hilsdorf. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa, **Ciênc. Agrotec., vol.29, no.1, Lavras, Jan./Feb. 2005.**

RITTER, R.; SANTOS, D.; BERGMANN, G.P. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. **Hig. Alim., v.15, p.51-55, 2001.**

ROCHA, J. S.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.58 no.2 Belo Horizonte Apr. 2006.**

ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; DE-ROUBIN, M-R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. **Journal of Microbiological Methods, v.49, p.31-54, 2002.**

SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Hig. Alim., v.8, p.22-23, 1994.**

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A. et al. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticaba, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol., v.73, p. 171-175, 2006.**

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; GUIDOLIN, S.; BRAZACA, S., G., C.; YAGAZAKI, A. C.; DEA, R., C., D.; da SILVA, M., V. Estudo da vida útil de queijo Minas. **Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.29 no.2 Campinas Apr./June 2009**

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. vol.60, nº 6, Belo Horizonte Dec. 2008**

SANTOS, E.S., GENIGEORGIS, C., FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. **J. Food Protect., v.44, p.172-176, 1981.**

SANTOS, M. dos; SILVA, T., V.; GAIOSKI, L., J.; PELOZATO, E.; SANTA, H., S., D. Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do Município de Guarapuava e Região. **Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). 2008.**

SCHNEIDER, R., N.; PINTO, A., T.; SCHMIDT, V. Análise microbiológica e do sistema produtivo do queijo serrano produzido em Cambará do Sul/RS. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2009.**

SILVA, W. P.; GANDRA, E. A. Estafilococos coagulase positiva: Patógenos de Importância em Alimentos. **Higiene Alimentar, São Paulo, v. 18, nº 122, p. 32-40, julho de 2004.**

SILVA, C.A.M., LEITÃO, M.F. de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo "Minas Frescal". In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro.** Programa Oficial, Resumos... Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p.186.

SILVA, Neusely da; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos.** São Paulo: Varela, 1997.p.295

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella Enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciencia Avicola, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.**

TEIXEIRA, L.V. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do soro de queijos minas padrão e mussarela produzidos em quatro regiões de Minas Gerais. 2005. **42f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.**

TÉO, C. R.P.A., Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no paraná entre janeiro de 1999 e junho de 2001. 2002. **101f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.**

TONDO, E.C.; GUIMARÃES, M.C.M.; HENRIQUES, J.A.P.; AYUB, M.A.Z. Assessing and analyzing contamination of a dairy products processing plant by *Staphylococcus aureus* using antibiotic resistance and PFGE. **Can. J. Microbiol., 46:1108-1114, 2000.**

TORTORA, Gerard J., BERDELL, R. Funke, CHRISTINE, L. Case. **Microbiologia.** 8 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005 p.894

VARNAM, A. H.; EVANS, M. G. Foodborne Pathogens an Illustred Text. **Aylesburg, England: Wolfe Publishing, 1991.**

VILELA, M.A.P.; REZENDE, P.R.; MEURER, V.M. *et al.* Incidência de estafilococos produtores de coagulase em queijo Minas frescal comercializado na cidade de Juiz de Fora e região. **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes, v.56, p.140-143, 2001.**

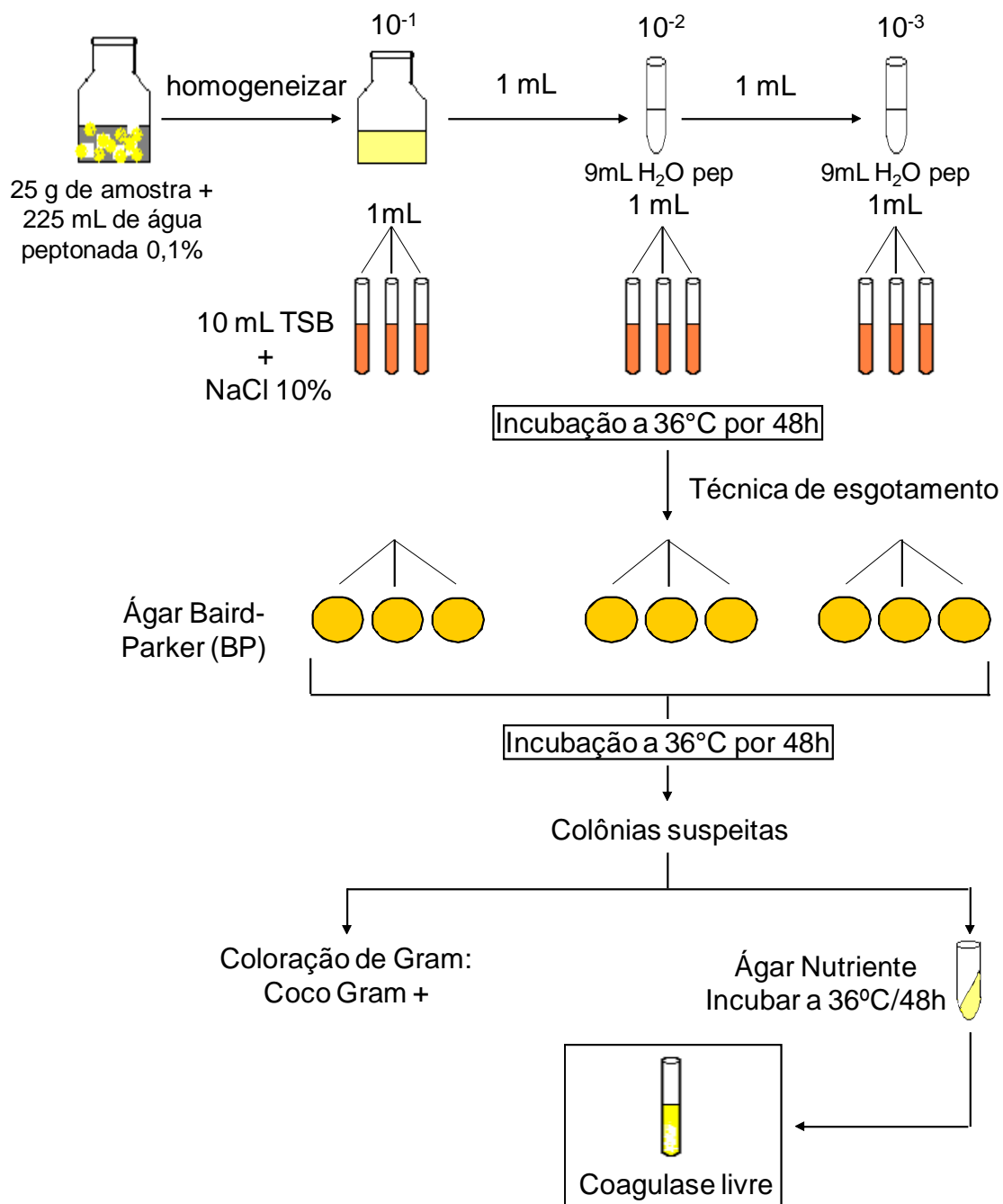
ZADOW, J.G., Modern dairy technology: advances in milk processing. **London: Elsevier,1997. v. 2.**

ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bull. IDF, 345:15-18, 2000.**

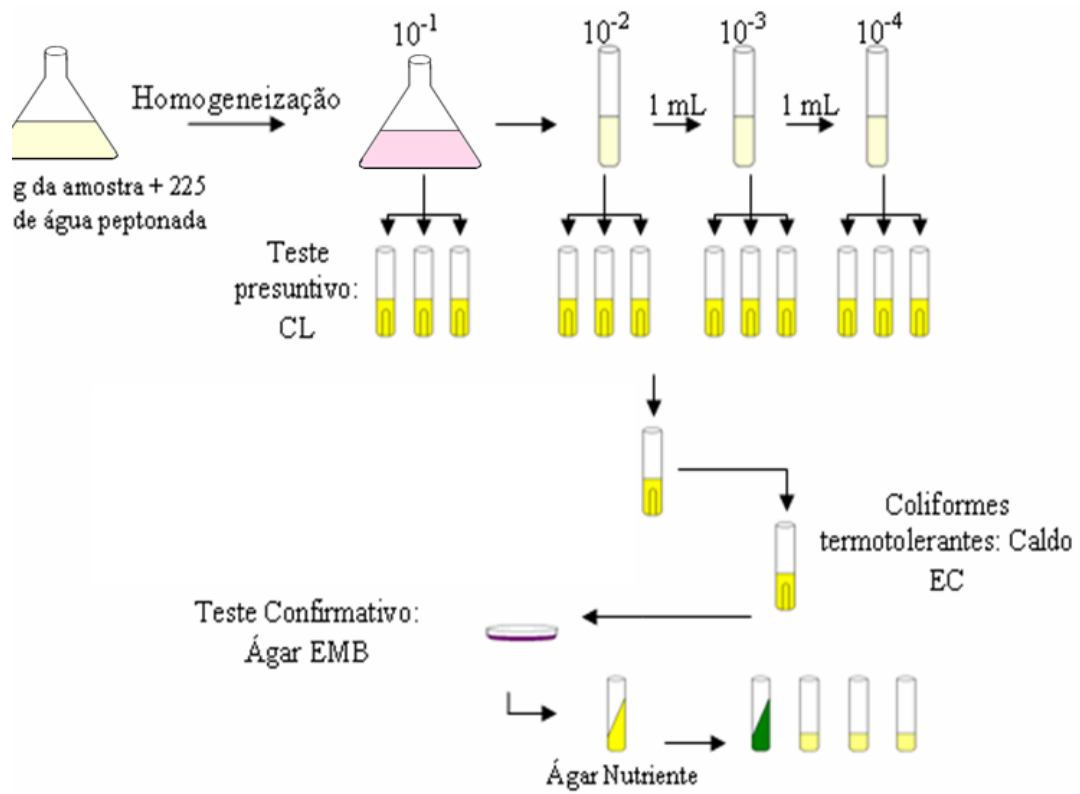
ZOTTOLA, E. A.; SMITH, L. B. Pathogens in Cheese. Food **Microbiology, V. 18, I. 3, September 1991, pages 171-182.**

ANEXOS

Anexo 1 - Contagem e confirmação de *Staphylococcus* coagulase positiva pelo método do Número Mais Provável (NMP)



Anexo 2 - Contagem de Coliformes Totais e Termotolerantes com identificação de *Escherichia coli*.



Anexo 3 - Contagem e identificação de *Salmonella* spp.