

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

GABRIELA DE MATOS KAMI MURA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE
QUEIJO MINAS FRESCAL**

BAURU

2016

GABRIELA DE MATOS KAMI MURA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO MINAS
FRESCAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

BAURU

2016

Kami Mura, Gabriela de Matos

K154a

Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal /
Gabriela de Matos Kami Mura. -- 2016.

43f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) -
Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

1. Queijo minas frescal. 2. DTA. 3. Micro-organismos
patogênicos. 4. Contaminação alimentar. I. Coutinho, Ana Paula
Cerino. II. Título.

GABRIELA DE MATOS KAMI MURA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO
MINAS FRESCAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde da Universidade do Sagrado Coração, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato
Universidade do Sagrado Coração

Prfa. Dra. Ana Carolina Polano Vivan
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 29 de novembro de 2016.

Dedico primeiramente aos meus pais, os quais me proporcionaram todo o apoio e recursos para a minha formação; À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula Cerino Coutinho por ter me dado toda a estrutura, conhecimento e paciência para a realização e conclusão deste trabalho, juntamente com todos do laboratório que foram responsáveis pelos equipamentos e materiais.

“Sem a curiosidade o novo nunca irá existir” (Sebastião Kami Mura, 2016)

RESUMO

O grande consumo de queijo minas frescal no Brasil vem crescendo anualmente, e devido a isso novas tecnologias estão sendo utilizadas para a produção. Entretanto ainda há uma grande produção de queijos artesanais que são comercializados em feiras livres. O queijo minas frescal é um grande veículo para as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's), pois sua composição nutricional favorece o crescimento de diversos micro-organismos patogênicos como *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e coliformes termotolerantes. A presença dessas bactérias em alimentos é um grande indicador de más condições higiênico-sanitárias, provenientes da falta de higiene no processo de produção do queijo. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica de queijos minas frescal produzidos artesanalmente e produzidos em feiras livres e industrializados (metodologia convencional e ultrafiltrado) obtidos na região da cidade de Bauru-SP. As análises microbiológicas realizadas foram pesquisa de *Salmonella spp*, *Staphylococcus aureus*, coliformes termotolerantes e *Bacillus cereus*. As técnicas utilizadas para a pesquisa dos patógenos foram Número mais provável (NMP) para contagem de coliformes totais e termotolerantes, para pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* o método utilizado foi o Método de contagem direta em placas e o método BAM/FDA para pesquisa de *Salmonella spp*. A presença desses organismos não foi detectada em nenhuma das amostras obtidas no presente estudo, caracterizando assim condições higiênico-sanitárias satisfatórias. Pesquisas realizadas em diversas localidades do Brasil obtiveram resultados de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e contagem de micro-organismos patogênicos acima do permitido para a legislação brasileira para os queijos minas frescal.

Palavras chaves: Queijo minas frescal. DTA. Micro-organismos patogênicos. Contaminação alimentar

ABSTRACT

The consumption of soft white cheese in Brazil has been growing every year and thanks to that, new technologies are being used for its production. However, there is still a large production of farmhouse cheeses that are commercialized in street markets. The soft white cheese is a great vehicle for Foodborne Diseases (DTAs) because its nutritional composition favors the growth of many pathogenic microorganisms, such as *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and thermotolerant coliforms. The presence of these bacteria in food is a great indicator of poor sanitary conditions, arising from the poor hygiene in the process of cheese production. The study aimed to evaluate the microbiological quality of soft white cheese produced in farmhouses (traded on street markets) and in industries (ultrafiltered and traditional methodology) obtained in the region of the city of Bauru-SP. The microbiological analyzes carried out were the investigation for *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, thermotolerant coliforms and *Bacillus cereus*. The techniques involved for investigating the pathogens were the Most Probable Number (MPN) for counting total and thermotolerant coliforms; the direct counting method on plates for investigating *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* and the BAM/FDA method for *Salmonella* spp. The presence of these organisms was not detected in any of the samples obtained in this study, characterizing satisfactory sanitary conditions. Research conducted in several locations in Brazil though, obtained results of unsatisfactory hygiene and sanitary conditions and pathogenic microorganisms count above permitted by the Brazilian law for soft white cheese.

Keywords: Soft White cheese. Foodborne diseases. Pathogens. Food contamination

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-Fabricação do queijo minas frescal pelo método tradicional	17
Figura 2 -- Fabricação de queijo minas frescal através de ultrafiltração	18
Figura 3- Crescimento de colônias com brilho metálico	20
Figura 4 -Crescimento suspeito de <i>S.aureus</i> em Ágar Baird-Parker	22
Figura 5 -Crescimento de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i> spp em Ágar XLD	23
Figura 6- Crescimento de colônias suspeitas de <i>Salmonella</i> spp em Ágar He.....	23
Figura 7 -Esquema de análise de coliformes totais, termotolerantes em alimentos pelo método APHA do NMP	28
Figura 8 -Ilustração da metodologia para pesquisa de <i>Salmonella</i>	30
Figura 9 -Tubos de LST sem formação de gás.....	33
Figura 10 -Tubos de LST com produção de gás com turvação.....	34
Figura 11 -Tubos VB com formação de gás e turvação.....	34
Figura 12-Tubo EC com produção de gás.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição quantitativa da composição do leite de vaca	15
Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas	33
Tabela 3 - Valores máximos aceitados pela legislação brasileira	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 LEITE	15
3.2 QUEIJO MINAS FRESCAL	16
3.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DO QUEIJO MINAS FRESCAL E SUAS CARACTERÍSTICAS	19
3.3.1 Coliformes totais e termotolerantes	19
3.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	21
3.3.3 <i>Salmonella</i> spp	22
3.3.4 <i>Bacillus cereus</i>	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	26
4.2 MÉTODOS	26
4.2.1 Contagem de coliformes totais e termotolerantes	26
4.2.2 Pesquisa de <i>S. aureus</i> coagulase positivo	28
4.2.3 Pesquisa de <i>Bacillus cereus</i>	29
4.2.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6 CONCLUSÃO	39
7 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Com a globalização e o crescimento da população mundial, a preocupação com problemas envolvendo a produção de alimentos e a sua qualidade para o consumo humano vem ficando cada vez mais evidente, alertando assim a necessidade de evitar a contaminação por agentes patogênicos, os quais são classificados de acordo com o potencial de causar danos à saúde (BALBANI; BUTUGAN, 2001).

O leite e os seus derivados são considerados alimentos ricos em componentes nutritivos, os tornando ótimos meios de cultura para o desenvolvimento de diversos micro-organismos. Sendo assim, quando processados sob más condições higiênico-sanitárias se tornam importantes veículos de transmissão de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). (VIDAL-MARTINS; ROSSI; REZENDE-LAGO, 2005).

No Brasil, o consumo anual de queijos é de 4,5 Kg per capita, e a, a produção brasileira de queijos foi em média 745 mil toneladas em 2011.(ABIQ, 2011).

O queijo minas frescal é um dos produtos derivados do leite mais consumidos no Brasil, e é classificado segundo a RDC 12 de Janeiro de 2001 de duas formas: os de alta umidade (46%) e de muita alta umidade (55%) com bactérias lácticas abundantes e viáveis.

Por apresentar elevado teor de umidade, ser altamente perecível e na maioria das vezes por seu processo ser manual, o queijo minas pode apresentar condições propícias para a contaminação microbiana, incluindo por patógenos. (BRASIL, 2001).

Segundo a Portaria N° 146, de 7 de março de 1996, para que haja qualidade no produto derivado lácteo, o leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização antes de ser utilizado como matéria prima de qualquer produto (BRASIL, 1996).

Os queijos minas frescal industriais são produzidos com leites pasteurizados e em condições higiênico-sanitárias adequadas, já nos queijos artesanais pode ocorrer uma variação nesse procedimento, pois quando produzidos por pequenos produtores não se tem controle sobre o processo de pasteurização e padronização microbiológica como se tem nos laticínios, onde as condutas de boas práticas de fabricação são fiscalizadas frequentemente (PEREIRA, et al. 1999)

Para a preparação de queijos com qualidade microbiológica, o leite deve ser obtido com higienização através de um animal saudável, deve haver boas práticas na ordenha, saber manusear o leite com equipamentos e utensílios devidamente higienizados e o

resfriamento do leite deve ser realizado em no máximo 2 horas após a ordenha na temperatura entre 0-4°C, para que não haja nenhum tipo de contaminação nessa fase da produção (PEREIRA, et al., 1999)

A falta de higiene pessoal e de equipamentos no processamento de alimentos pode facilitar a presença de *Salmonella* spp., que é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo um dos principais agentes causadores de gastroenterites típicas, com aparecimento dos sintomas, como dor de cabeça, cólicas abdominais, diarreia, náusea e vômitos, entre 6 a 48 horas após a ingestão do alimento contaminado. (SHINOHARA et al., 2008)

Pacientes portadores da AIDS são considerados grupo de risco, assim como idosos e crianças, pois podem sofrer uma grave desidratação se ingerirem algum alimento contaminado com *Salmonella* spp. No caso de pacientes com AIDS, a frequência de salmonelose é 20 vezes maior do que na população em geral, tornando assim as DTAs (Doenças transmitidas por alimentos) um grave assunto para a saúde pública (SILVA et al, 2010).

Outros micro-organismos patogênicos que frequentemente podem estar presentes no queijo se não houver a devida higienização são os *Staphylococcus* sp e *Escherichia coli*, os quais são classificados como organismos indicadores de higiene, ou seja, a presença dos mesmos em alimentos é um indicativo de que houve má higienização pessoal e de utensílios durante a produção do produto (JAY, 2005; SILVA et al., 2010).

O *S. aureus* é um micro-organismo naturalmente encontrado nos seres humanos em locais como pele, narinas e axilas, também podem estar presentes em animais como no úbere da vaca, o qual pode levar a um quadro de mastite estafilocócica em rebanhos leiteiros, agravando as chances de contaminação alimentar em produtos derivados do leite, como o queijo (CARMO et al., 2003). A ingestão das toxinas do *S. aureus* pode causar uma intoxicação de origem alimentar, a qual seus sintomas aparecem geralmente dentro de 2-4 horas após a ingestão do alimento contaminado, e tem como principal características as náuseas, câimbras abdominais, diarreia, dor de cabeça, sudorese e em algumas vezes pode haver queda na temperatura corporal (CARVALHO, 2003).

A presença de *E.coli* pode indicar a contaminação fecal em alimentos “in natura” podendo provocar doenças, como as gastrenterites que resultam em diarreias que podem variar de intensidade conforme o sorotipo da bactéria, como nos casos mais graves que são causadas pelo sorotipo da *E.coli* enterotoxigenica (ETEC), que é responsável por ocasionar

desde diarreias brandas até colite hemorrágica, síndrome hemolítico-urêmica e purpura trombocitopênica trombótica (GIBSON, 2006).

O queijo minas frescal por ser um produto de ampla aceitação comercial e por fazer parte do hábito alimentar da população brasileira na maioria das regiões, é frequentemente fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, podendo então ocorrer contaminação diversos micro-organismos patogênicos já citados (CARDOSO, 2004).

A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que, anualmente, mais de um terço da população mundial adoeça devido a surtos de DTA, porém somente uma pequena proporção é notificada (BRASIL, 2014).

No Brasil, entre 2001 e 2014, foram notificados 9.928 surtos de DTA, tendo em 2005 o maior número de notificações (BRASIL, 2014).

Com isso, a importância do controle na produção de queijos no Brasil deve ser vistas com outros olhos, para que o número de doenças de origem alimentícia diminuam futuramente (FEITOSA, et al. 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar microbiologicamente queijos minas frescal produzidos artesanalmente e industrializados adquiridos na cidade de Bauru e região.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Pesquisar a presença dos principais micro-organismos que contaminam o queijo como *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, coliformes termotolerantes e totais, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*;

-Propor medidas preventivas para evitar a contaminação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEITE

Segundo a Instrução Normativa nº 51 de 18/09/2002 “entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas”, líquido de cor esbranquiçada, opaco e nutritivo” (Figura 1) (BRASIL, 2002).

O leite é um dos alimentos nutricionalmente mais completo na alimentação dos brasileiros, sendo um elemento fundamental para a economia do país (MATA, et al 2011).

No Brasil, o leite é o principal produto de origem animal e seu consumo interno per capita é em torno de 173,6 litros/habitante/ano (CONAB, 2016).

Segundo o IBGE (2016) (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) no ano de 2015 a quantidade de leite cru adquirido pelos laticínios por trimestre foi de 6,28 bilhões de litros.

Por ser um produto de grande importância nutricional e bastante perecível, cuidados com a higiene na hora da obtenção (ordenha) e na produção devem ser realizadas com qualidade, pois é ótimo meio de cultura para os micro-organismos patogênicos. Um leite com boa qualidade higiênica é caracterizado pela ausência de agentes físicos, químicos e biológicos como corpos estranhos, micro-organismos patogênicos, antibióticos. (MILANI, 2011).

O leite apresenta um alto teor de minerais, proteínas, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas, e água (Tabela 1). A gordura é o principal componente nutricional do leite e sua concentração é variável dependendo da raça do animal, da alimentação que ele é submetido e do clima da região de criação. A gordura do leite é composta principalmente de triacilgliceróis (SIMIONATO, 2008).

Tabela 1- Composição quantitativa da composição do leite de vaca

Constituintes	Média (%)
Água	87,00
Gordura	4,00
Proteína	3,40
Lactose	4,80
Minerais	0,80

Fonte: Modificado a partir de Behmer (1980, p.15)

A gordura presente no leite e produtos lácteos é muito complexa e possui propriedades nutricionais únicas. Já em sua composição podem conter acima de 400 tipos de ácidos graxos, os quais são responsáveis por exercer funções essenciais para o organismo, como produção de energia e aumento do metabolismo (COBUCI et al 2000).

Com grande importância na dieta do homem, as proteínas são essenciais para o organismo, sendo usadas principalmente como material de construção das células do nosso corpo, e o leite é uma fonte rica de obtenção de proteína, onde as principais são a caseína, albumina, globulina e proteína-membrana, sendo que a caseína é responsável por 78% da composição do leite (BEHMER, 1980).

Os principais produtos derivados do leite são os iogurtes, queijos, bebidas lácteas e sobremesas.

O leite pode ser classificado de acordo com seu teor de gordura e contaminação microbiológica, de acordo com o Ministério da Agricultura, como A, B ou C (BRASIL, 2002)

3.2 QUEIJO MINAS FRESCAL

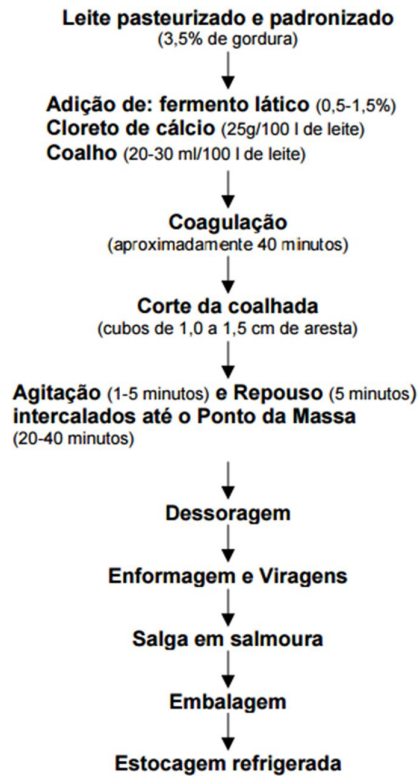
O queijo minas frescal é definido como um produto fresco obtido do leite pasteurizado, integral ou parcialmente desnatado através da coagulação enzimática.

O processamento do queijo pode ser realizado pela forma tradicional (processamento em cultura láctica) que é utilizada o fermento láctico, por acidificação direta e por ultrafiltração (CAMPOS, 2001).

No método tradicional, o queijo tipo minas frescal é obtido por coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho ou enzima coagulante e bactérias ácido lácticas que produzem ácido láctico pela metabolização da lactose, que tem função de melhorar a atividade do coagulante e auxiliar na expulsão do soro da coalhada. Esse processo ocorre entre 30 a 40 minutos a 35-37°C. Em seguida, é realizado o corte, a dessoragem (procedimento em que se retira a água e elementos do lactosoro do coágulo formado) e a enformagem. A salga pode ser feita por salmoura a 20% a 10-12°C. (FOX et al., 2000).

Na Figura 1 pode-se observar um fluxograma da fabricação do queijo minas frescal na forma tradicional.

Figura 1-Fabricação do queijo minas frescal pelo método tradicional



Fonte: Modificado a partir de Oliveira, 1986.

A segunda maneira para a produção do queijo minas é a acidificação direta, onde ao invés de se utilizar a cultura láctica é usado o ácido láctico industrial para a acidificação, e esse procedimento apresenta uma melhor durabilidade do queijo.

A mais recente técnica é a de ultrafiltração (MMV) que se baseia na tecnologia de membranas (MAUBOIS, MOCQUOT, 1969)

Essa técnica tem como principal característica o uso direto do retentado obtido na ultrafiltração de leite na fabricação de queijos, dispensando a dessoragem e o trabalho da massa nos tanques de fabricação (MAUBOIS, MOCQUOT, 1969)

O processo consiste em um procedimento de separação em fase líquida, por permeação através de uma membrana de permeabilidade seletiva e sob ação de um gradiente de pressão (BEATON, 1979).

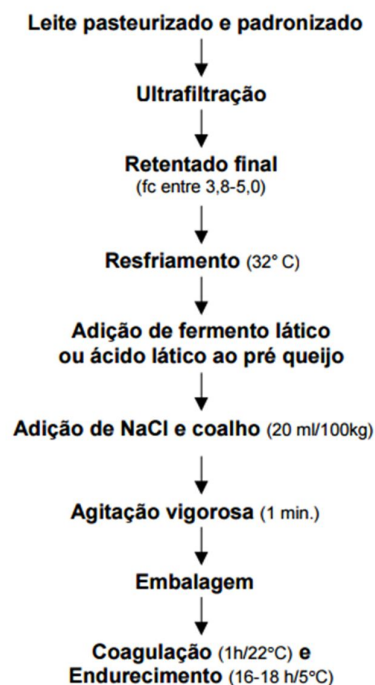
Nas indústrias de queijos, a utilização da ultrafiltração tem como principal vantagem a viabilização do aumento do rendimento do processo, pois este permite a

retenção maior das proteínas solúveis do soro, de alto valor nutritivo e da gordura do leite (PASSOS, et al 2009).

A membrana é a parte mais importante do sistema de ultrafiltração, onde moléculas de proteínas e a gordura são retidas pela membrana, apresentando uma alta taxa de retenção, de 94 até 100%. Já as bactérias não são retiradas na membrana (CARVALHO, MAUBOUIIS 2010).

Na Figura 2 pode-se observar um fluxograma dos procedimentos da fabricação do queijo minas frescal pelo método de ultrafiltração.

Figura 2 -- Fabricação de queijo minas frescal através de ultrafiltração



Fonte: Modificado a partir de Oliveira, 1986.

Essa técnica apresenta maior rendimento e higiene para o produto devido ao processamento em circuito fechado e a forma em que o queijo é diretamente enformado (RUDOLF, SCHERER, 2001).

Todos os processos de fabricação do queijo minas apresentam vários pontos críticos durante a fabricação, principalmente na metodologia tradicional, pois durante o procedimento pode-se haver alterações indesejáveis no produto final devido a contaminação microbiológica da matéria prima, recontaminação do leite pós-pasteurizado,

temperaturas inadequadas de fabricação e armazenamento (SANTOS; NOGUEIRA; CUNHA, 1995)

Por apresentar características físicas, como alta umidade e diversos nutrientes, a contaminação por micro-organismos patogênicos nos queijos são frequentes e perigosas, entre os micro-organismos mais comuns está o *Clostridium* sp, *Pseudomonas* sp, *Streptococcus*, *Salmonella* spp, *Escheria coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolítica* e *Staphylococcus* sp (PERRY, 2004).

As boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são essenciais para a garantia de um produto de qualidade (PICOLI et al., 2006).

3.3 PRINCIPAIS CONTAMINANTES DO QUEIJO MINAS FRESCAL E SUAS CARACTERÍSTICAS

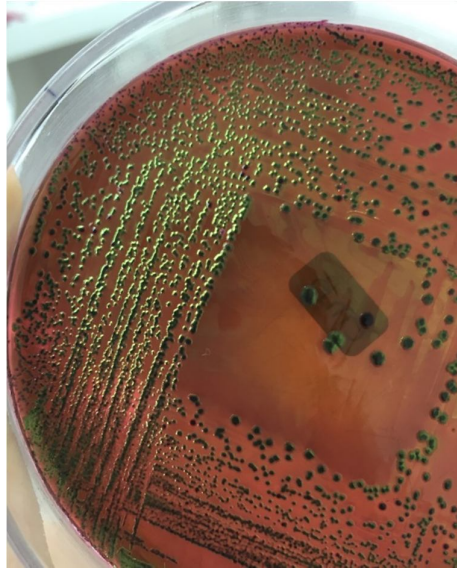
Existe um grande número de agentes patogênicos que podem ser transmitidos ao homem através de derivados do leite, como o queijo minas frescal, e os mais importantes são *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica* e *Staphylococcus aureus* (EMBRAPA, 2016)

A presença desses micro-organismos em grande quantidade é indicativa de uma possível matéria-prima contaminada, má higienização e sanificação insuficiente no processamento e/ou na conservação dos alimentos (JAY, 1994).

3.3.1 Coliformes totais e termotolerantes

Os coliformes totais a 35°C compreendem um subgrupo da família Enterobacteriaceae, que são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, que fermentam a lactose dentro de 48 horas e produzem colônias escuras com ou sem brilho metálico em ágar, como mostra a Figura 3 (JAY, 2005).

Figura 3- Crescimento de colônias com brilho metálico



Fonte: Elaborado pela autora

A capacidade desse grupo em fermentar a lactose pode ser verificada pela formação de gás nos meios de cultivo contendo lactose, auxiliando na identificação por métodos tradicionais de contagem de coliformes totais (SILVA et al., 2010).

O subgrupo dos coliformes totais são os coliformes termotolerantes, os quais até alguns anos atrás eram restritos aos organismos que vivem exclusivamente no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente, como a *Escherichia coli*, porém, atualmente sabe-se que o grupo inclui membros de origem não fecal, como algumas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* (SILVA, et al 2001; JAY, 2005)

Os coliformes termotolerantes 45° são usualmente utilizados como micro-organismos indicadores de contaminação microbiológica em alimentos, tendo como objetivo avaliar a sanificação dos alimentos, como no caso da *Escherichia coli*, cuja seu habitat natural é o trato gastrointestinal, definindo então se encontrada em quantidades elevadas em um determinado alimento uma possível contaminação por má higienização (SILVEIRA, 2001).

Diversas linhagens de *E. coli* são patogênicas para o homem e para os animais. Com base nos fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiológicas, as linhagens

de *E. coli* consideradas mais patogênicas são, atualmente, divididas em cinco classes: (JAY, 2005).

- EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica;
- EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasivas;
- ETEC – *Escherichia coli* enterotoxigênica;
- EHEC- *Escherichia coli* enterhemorrágica;
- EEC – *Escherichia coli* enteroagregativa.

Os coliformes são absolutamente indesejáveis na indústria de laticínios, pois são causadores de diversos defeitos no leite e seus derivados. (FRAZIER; WESHOFF, 1993).

Estudos realizados por Rosa (2005) em análises de queijo minas frescal, indicaram resultados em que a contagem desses micro-organismos estavam acima dos padrões sanitários permitidos, que é 5×10^2 em 25g, segundo a RDC 12 de janeiro de 2001.

Esse alto índice de contaminação de micro-organismos patogênicos foi reforçado pelos resultados obtidos por Paiva (2005) em análises microbiológicas de queijo minas frescal obtidos em supermercados, onde 76,6% das amostras analisadas se encontravam acima dos valores sanitários permitidos e dessas, 47% apresentavam valores superiores aos limites permitidos em relação a *E.coli*.

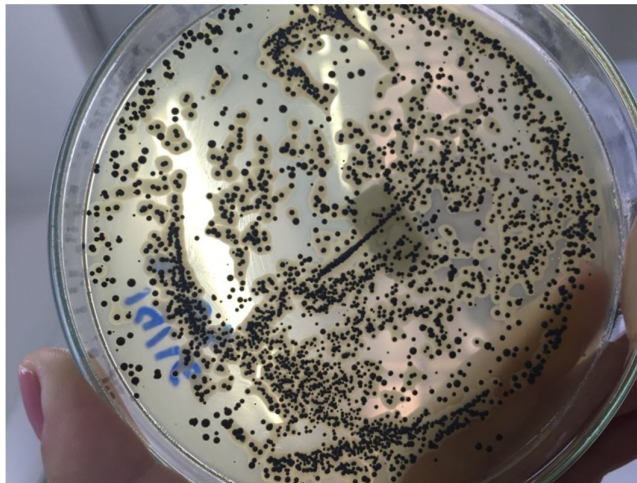
A presença desses micro-organismos patogênicos no alimento pode causar gastroenterite no paciente, apresentando fortes diarreias e dores abdominais (JAY, 2005).

3.3.2 *Staphylococcus aureus*

São cocos Gram-positivos, imóveis, agrupados em forma semelhante a cachos de uvas, aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase positiva. São capazes de fermentar a glicose com produção de ácido. Sua temperatura ótima de crescimento é de 35 a 40°C (BIER, 1984).

A Figura 4 mostra as colônias suspeitas de *S. aureus*.

Figura 4 -Crescimento suspeito de *S.aureus* em Ágar Baird-Parker



Fonte: Elaborado pela autora

Seu reservatório principal é o homem e outros animais. Pode ser encontrado no ambiente em diversas áreas do corpo humano, como por exemplo, fossas nasais, garganta, intestinos e pele. (SANTOS et al., 2007).

A intoxicação alimentar estafilocócica foi estudada pela primeira vez em 1894, por J.Denys e em 1914, por M.A.Barber, o qual reproduziu em si mesmo os efeitos e sintomas da doença ao ingerir um leite inoculado com uma cultura de *Staphylococcus aureus* (JAY, 2005).

Os sintomas são evidenciados entre duas a seis horas depois da ingestão da enterotoxina estafilocócica causando sintomas como náuseas, vômitos, contrações abdominais, diarreia, calafrios, cefaleia e febre. (SILVA et al, 2010).

O *S. aureus* não é resistente ao calor, sendo facilmente destruído no processo de pasteurização ou na cocção de alimentos (FLOWERS et al., 1992).

Os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação, embora equipamentos e superfícies do ambiente também possam contaminar os alimentos. A não pasteurização do leite também é um grande agravante, pois uma fonte comum de contaminação do leite é o úbere infectado de vacas leiteiras (CHAVES, 2001).

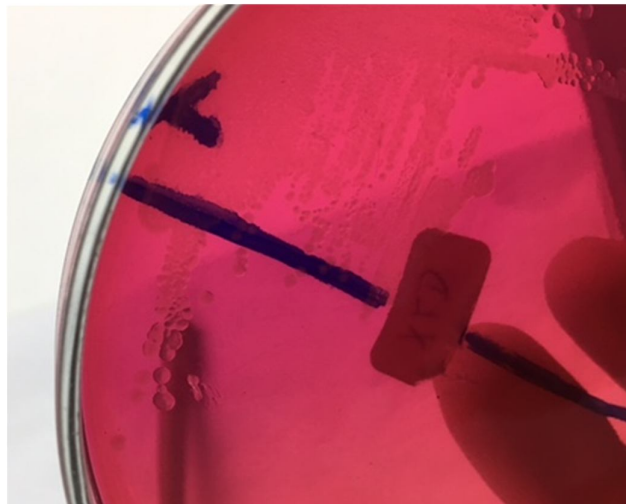
3.3.3 *Salmonella* spp

São pequenos bastonetes Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e oxidase negativo. São da família Enterobacteriaceae e representam o principal agente de

graves infecções alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (SHINOHARA et al., 2008)

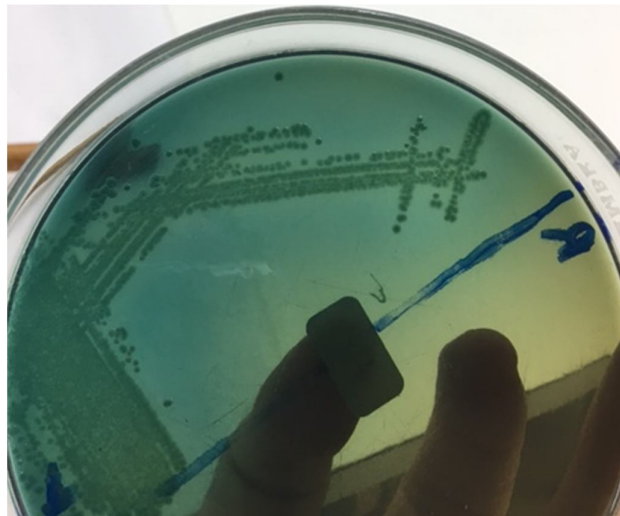
A Figura 5 e 6 mostra o crescimento de *Salmonella* spp em ágar XLD e HE respectivamente.

Figura 5 -Crescimento de colônias suspeitas de *Salmonella* spp em Ágar XLD



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6- Crescimento de colônias suspeitas de *Salmonella* spp em Ágar He.



Fonte: Elaborado pela autora

A salmonelose, doença causada pela ingestão da *Salmonella SP*, é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo. Além da importância das medidas preventivas para evitar o risco de infecção da salmonelose na população humana, o controle desta doença é de grande interesse para a economia dos países em que ocorrem esses surtos (SHINOHARA et al., 2008)

A grande maioria dos sorotipos de salmonelas são patogênicas para o homem, de forma que os sintomas clínicos podem ser divididos em três grupos: febre tifoide (causada pela *S.typhi*), onde os sintomas são graves e incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos; febre entérica (causada pela *S. paratyphi* A, B e C) e seus sintomas clínicos são mais brandos em relação a febre tifoide, podendo eventualmente evoluir para uma septicemia e frequentemente desenvolver um quadro de gastroenterite, febre e vômitos; e as infecções entéricas em decorrência de outras salmonelas, também conhecidas como salmoneloses, desenvolvem um quadro de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômitos (CARDOSO; CARVALHO, 2006)

3.3.4 *Bacillus cereus*

O *Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete e produtora de esporos responsáveis por oferecer resistência à grandes temperaturas e toxinas, e tem sido reconhecida como agente etiológico de doenças de origem alimentar há mais de 40 anos (MENDES et al., 2004).

A bactéria tem uma resistência fisiológica a qual esta aliada em sua habilidade de produzir uma vasta gama de enzimas que degradam diversos substratos orgânicos, possibilitando assim que a bactéria esteja amplamente distribuída no meio ambiente, sendo o solo seu reservatório natural (VIDAL-MARTINS et al., 2005).

Os surtos de intoxicação alimentar geralmente estão associados à falhas na conservação dos produtos mediante exposição a tempos e temperaturas inadequadas (PAIVA et al., 2009)

As doenças que resultam da contaminação do *B. cereus* são associadas a ingestão de suas toxinas, que ocasionam a síndrome diarréica, que em até certo ponto é considerada suave em relação a síndrome emética que também é ocasionada por suas toxinas (JAY, 2005)

A síndrome diarréica é caracterizada por dores abdominais e diarreia, com um período de incubação de 8 a 16 horas e início dos sintomas entre 12 a 24 horas, e é

provocada pela toxina diarréica, a qual é uma proteína termossensível e inativada por aquecimento a 56°C (SILVA et al., 2010)

A forma de síndrome emética é considerada a mais grave e aguda e é causada pela toxina emética que é caracterizada por náuseas e vômitos, com período de incubação de 1 a 6 horas. (JAY, 2005)

Os alimentos mais frequentemente implicados em surtos são produtos cozidos, ricos em amido e proteínas, como arroz, massas, sopas, vegetais e carnes (SILVA et al., 2010; JAY, 2005)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras quatro amostras de queijo minas frescal foram adquiridas em supermercados e feiras abertas da cidade de Bauru-SP e região.

Foram coletadas 2 amostras de queijo minas frescal industrializado, sendo que 1 amostra foi de queijo ultrafiltrado. Já as 2 amostras adquiridas em feiras abertas foram fabricadas artesanalmente.

4.2 MÉTODOS

Os métodos utilizados para o presente estudo foram seguidos de acordo com Silva et al, (2010).

Todos os parâmetros utilizados para as análises microbiológicas foram seguidos de acordo com a Resolução RDC Nº 12 de 2 de Janeiro de 2001.

4.2.1 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

Foram realizadas três diferentes diluições para a contagem, onde em um erlenmeyer com 225 mL de água peptonada foi colocado 25g do alimento e homogeneizado pelo Stomacher®, correspondendo a diluição 10^{-1} .

Para a diluição 10^{-2} foi retirado 1 mL da diluição 10^{-1} e colocado em 9 mL de salina e homogeneizado novamente; e para a diluição 10^{-3} foi retirado 1 mL da diluição 10^{-2} e colocado em outro tubo com 9 mL de salina e homogeneizado, obtendo então a diluição 10^{-3} .

Para a realização da contagem de coliformes totais e termotolerantes foi utilizado o método clássico NMP (Número Mais Provável) que inclui as seguintes etapas:

1º) Teste presuntivo, em que três alíquotas de três diluições da amostra são inoculadas em uma série de três tubos de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) por diluição. Por conter lactose no caldo LST, pode-se observar o crescimento de gás através da fermentação da lactose e turvação do meio, e após 24-48 horas de incubação a 35-37°C, é considerada suspeita da presença de coliformes.

2º) Teste confirmatório, após o crescimento de gás em determinados tubos do caldo LST, foi retirada uma alçada de cada tubo suspeito e transferida para tubos de Caldo Verde Brillante Bile 2% (VB) e Caldo *E. coli* (EC), ambos meios seletivos que contém lactose.

A confirmação de crescimento de gás nos tubos VB após 24-48 horas de incubação à 35-37°C, foi confirmado a presença de coliformes totais na amostra, e a confirmação de crescimento de gás nos tubos EC após 24-48 horas de incubação à 44-45°C, foi considerado a confirmação de coliformes termotolerantes.

3º) Confirmação para a presença de *E. coli*, após a confirmação de presença de coliformes termotolerantes nos tubos positivos de EC, uma alçada de cada tubo positivo foi estriado em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (L-EMB), o qual é um meio seletivo diferencial para distinguir *E. coli* dos demais coliformes termotolerantes.

4º) Testes bioquímicos, foram isoladas duas colônias de cada amostra positiva no L-EMB para a realização das provas bioquímicas de indol, VM, VP e citrato.

Foram consideradas confirmadas as culturas com os perfis : + + - - (Biotipo 1) e - + - - (Biotipo 2).

A Figura 7 mostra o esquema da análise de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* em alimentos.

O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas invertidas a 35-37°C.

Foi considerado positivo para o crescimento de colônias pretas ou cinzas escuras, com 2-3mm de diâmetro, lisas, convexas, com bordas perfeitas, rodeadas por um halo transparente ao redor.

As colônias foram contadas e os resultados foram expressos em UFC/g.

4.2.3 Pesquisa de *Bacillus cereus*

Com as diluições realizadas para a identificação de coliformes totais, foi selecionado a diluição 10^{-1} e foi inoculado 0,5 mL em duas placas de Ágar *Bacillus cereus* (BC), previamente preparadas e secadas.

O inóculo foi espalhado com uma alça de Drigalski, e as placas foram incubadas invertidas a 35-37°C por 24 horas.

Foi considerado positivo o crescimento de colônias grandes, esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo de precipitação e com o meio ao redor das colônias com coloração rósea leitosa.

4.2.4 Pesquisa de *Salmonella* spp

A metodologia utilizada para a pesquisa de *Salmonella* spp, foi o método BAM/FDA (*Food and Drug Administration*), modificado pelo autor.

A primeira etapa realizada para a pesquisa de *Salmonella* spp foi a etapa de pré-enriquecimento em caldo não seletivo, com o objetivo de recuperar células injuriadas. O meio escolhido foi a água peptonada tamponada 1% (BPW)

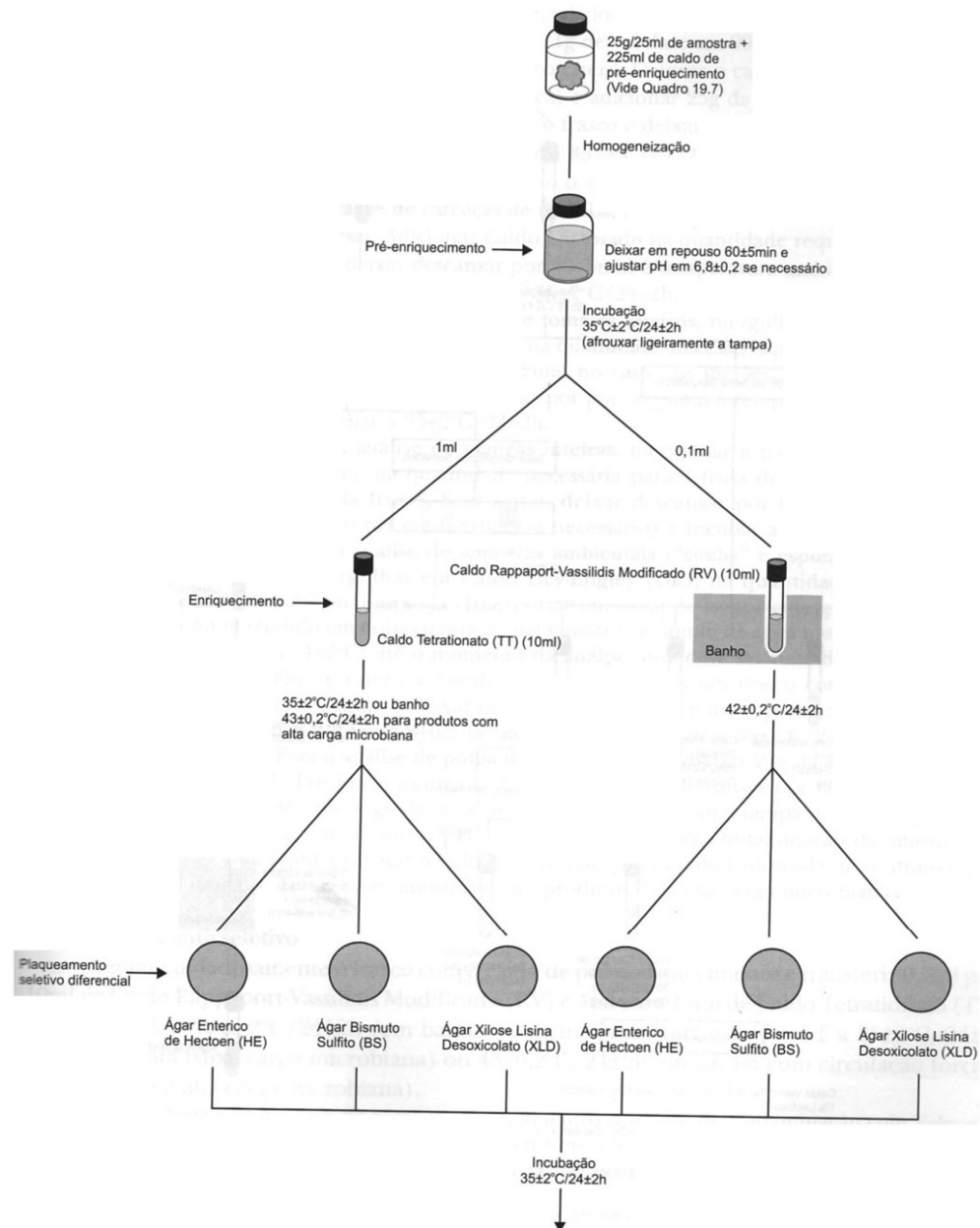
O meio foi incubado a 35-37°C por 24 horas.

Após a etapa de pré-enriquecimento foi realizado a etapa de enriquecimento em caldo seletivo, utilizando então dois diferentes meios de enriquecimento, que foram o caldo Rappaport-Vassiliadis Modificado (RV) e caldo Tetracionato, onde foi colocado 1mL do caldo pré-enriquecido em cada meio e incubados por 24 horas à 35-37°C.

Para o plaqueamento seletivo diferencial foi utilizado os meios Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Entérico de Hectoen (HE) e incubados à 35-37°C por 24 horas.

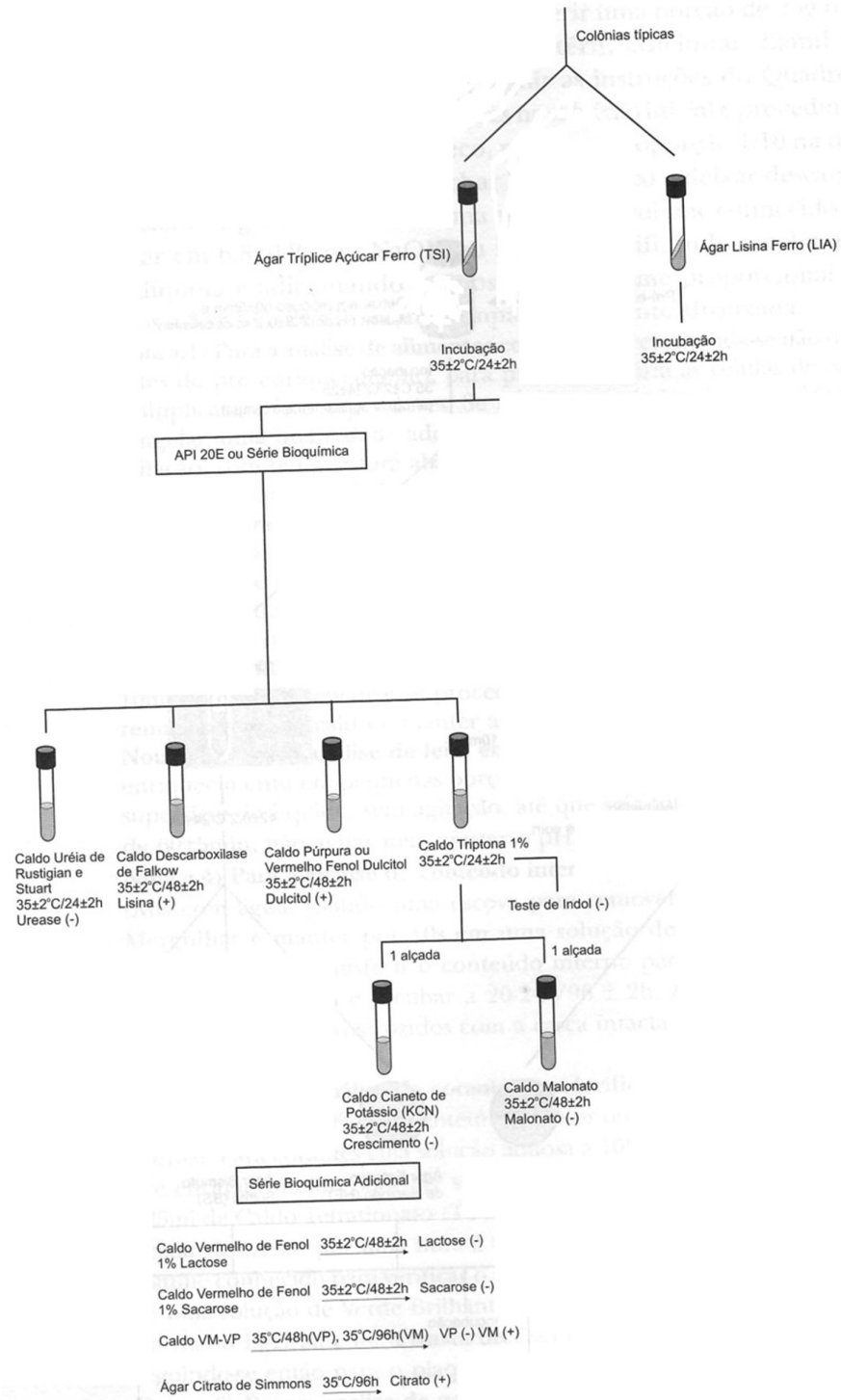
A Figura 8 ilustram a metodologia de acordo com a legislação Resolução RDC Nº 12 de 2 de Janeiro de 2001.

Figura 8 -Ilustração da metodologia para pesquisa de *Salmonella*



Fonte: Silva et al (2010)

Figura 8 - Ilustração da metodologia para pesquisa de *Salmonella* (Continuação)



Fonte: Modificado a partir de Silva et al (2010).

Foram consideradas suspeitas as colônias da cor do meio com ou sem centro preto.

As colônias suspeitas foram transferidas com uma alça para o Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e para o Ágar Lisina Ferro (LIA) e foram incubados a 35°C por 24 horas.

As provas bioquímicas realizadas foram: Caldo Uréia de Rustigian e Stuart, Caldo Descarboxilase de Falkow, Caldo vermelho fenol dulcitol, Caldo Triptona 1%, Caldo KCN (cianeto de potássio) e Caldo Malonato.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas das quatro amostras de queijo minas frescal obtidas na região de Bauru-SP.

Tabela 2 - Resultados das análises microbiológicas

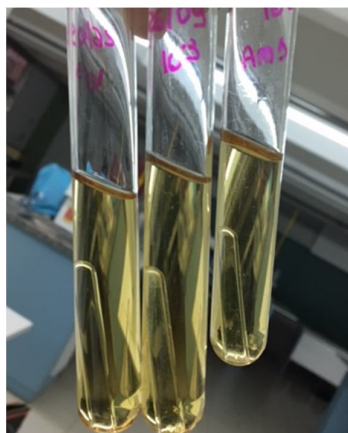
Amostras	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)	<i>Salmonella_s</i> (25g)	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Estafilococos coagulase positiva</i>
1	< 3,0	< 3,0	Ausência	Ausência em 0,1g	Ausência em 0,1g
2	> 1.100	< 3,0	Ausência	Ausência em 0,1g	Ausência em 0,1g
3	>1.100	< 3,0	Ausência	Ausência em 0,1g	Ausência em 0,1g
4	>1.100	3,0	Ausência	Ausência em 0,1g	Ausência em 0,1g

Fonte: Elaborado pela autora

Nota: (1) Amostra de queijo minas frescal ultrafiltrado, (2) Amostra de queijo minas frescal industrializado, (3) Amostra de queijo minas frescal artesanal, (4) Amostra de queijo minas frescal artesanal.

Os resultados obtidos para a análise de coliformes totais para a amostra número 1 (queijo minas frescal ultrafiltrado) pelo método presuntivo foi de < 3,0 NMP/g indicando que todos os tubos de LST de todas as diluições utilizadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram negativos, não havendo nenhum indício de gás ou bolhas no tubo, como indica a Figura 9.

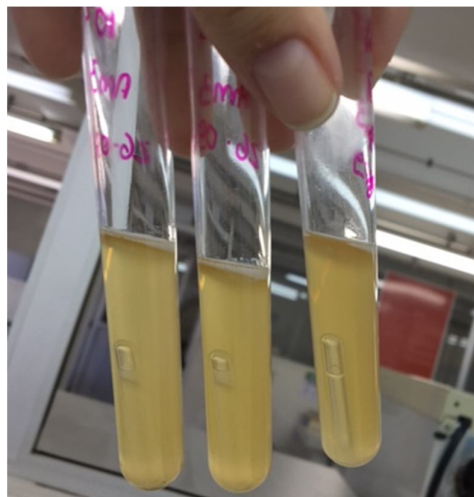
Figura 9 -Tubos de LST sem formação de gás



Fonte: Elaborado pela autora

Já para as amostras 2, 3 e 4 o resultado foi de > 1.100 NMP/g, indicando que todos os tubos de LST de todas as diluições indicaram o crescimento no meio, através de bolhas e gás no tubo com turvação do meio, como mostra a Figura 10.

Figura 10 -Tubos de LST com produção de gás com turvação



Fonte: Elaborado pela autora

Também observou-se que nos tubos com o meio de cultura VB, as amostras 2, 3 e 4 apresentaram o resultado de > 1.1000 NMP/g. A Figura 11 mostra os tubos VB.

Figura 11 -Tubos VB com formação de gás e turvação

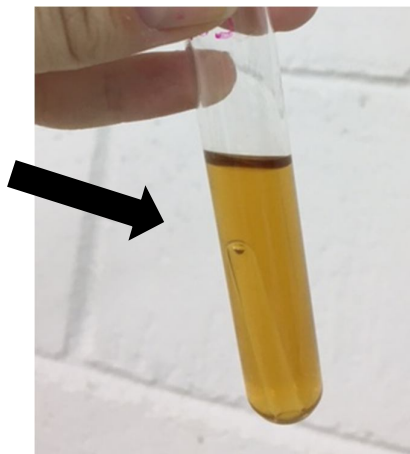


Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Figura 11 houve a turvação e produção de gás no meio, indicando a presença de coliformes totais, os quais possivelmente não são capazes de ser patogênicos para o ser humano.

Já para os tubos com meio de cultura EC, os resultados para as amostras 2 e 3 foram de $< 3,0$ NMP/g indicando que não havia a presença de coliformes termotolerantes. Já para a amostra 4 o resultado foi de $3,0$ NMP/g, sendo que somente um tubo da diluição 10^{-2} foi positivo, como mostra a Figura 12.

Figura 12-Tubo EC com produção de gás



Fonte: Elaborado pela autora

Entretanto, não se observou o crescimento de colônias típicas de *E.coli* em meio EMB.

Na pesquisa de *Salmonella* spp notou-se que nenhuma das amostras foram positivas. Entretanto, nas amostras 1, 2, 3 e 4 houve suspeita e foram feitos todos os testes bioquímicos para a identificação da bactéria, onde nesses foi possível confirmar que não havia a presença da mesma nas amostras.

Também pode-se notar que todas as amostras apresentaram ausência de *Bacillus cereus* e *S. aureus*.

Os valores exigidos pela ANVISA segundo a Resolução RDC Nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, para padrões microbiológicos sanitários para o queijo minas frescal estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Valores máximo aceitado pela legislação brasileira

Micro-organismo	Tolerância para amostra indicativa
Coliformes a 45°C	5x10 ²
Estaf.coag.positiva/g	5x10 ²
<i>Salmonella</i> sp/25g	Ausência
<i>L. monocytogenes</i> /25g	Ausência

Fonte: BRASIL (2001).

Nota-se pela comparação de dados das Tabelas 2 e 3, que todas as amostras do queijo minas frescal obtidas na cidade de Bauru-SP, se encontram dentro dos limites dos parâmetros microbiológicos e sanitários, podendo classifica-los segundo a Resolução RDC Nº 12, como produto em condições higiênicas sanitárias satisfatórias para o consumo humano.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* não foi realizada neste presente estudo por motivos técnicos, onde não havia laboratórios capacitados para tal análises, sendo substituída então pela pesquisa de *Bacillus cereus*, onde neste, o objetivo foi avaliar a qualidade de armazenamento das amostras.

Mesmo obtendo resultados que indicam a não contaminação de organismos patogênicos, não se pode assegurar que há frequentemente boas condutas higiênicas na fabricação dos produtos artesanais, pois a quantidade de amostra analisada não é suficiente para se afirmar que esses queijos possuam a mesma qualidade dos queijos produzidos industrialmente.

Contudo, pode-se esperar que os queijos artesanais tenham sido produzidos sob condições básicas de higiene, devido a conscientização dos seus manipuladores.

Para o queijo minas frescal ultrafiltrado, o resultado obtido foi o esperado, já que no processo de ultrafiltração, as chances de que bactérias sejam acrescentadas ao produto final são mínimas, pois a membrana de filtração retém somente proteínas, vitaminas e gordura, e os eventuais micro-organismos passam por essa membrana.

Estudos realizados por Loguercio e Aleixo (2001) na cidade de Cuiabá-MT, verificou-se que 93,33% das amostras obtidas em pontos tradicionais da cidade apresentaram quantidades elevadas de coliformes termotolerantes. Já em 96,67% verificaram valores superiores ao padrão aceitável para *S. aureus*. Sendo que, dessas

amostras 43,33% foram classificadas como potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar.

Segundo Balbani (2001), uma pesquisa baseada em laudos oficiais de análises microbiológicas de derivados do leite realizados em Brasília-DF revelou que dentre 1.030 amostras coletadas, 34,7% apresentavam algum tipo de contaminação microbiana, e dentre essas amostras, 67% do queijo minas frescal estavam em condições insatisfatória para o consumo, apresentando números elevados de coliformes termotolerantes e *S. aureus* (o principal causador de DTA's), ou seja, os valores encontrados estavam acima dos permitidos pela legislação.

Diversos surtos descritos na literatura foram resultantes do consumo de queijo minas frescal contaminados. Segundo Carmo et al. (2002), foram relatados surtos ocorridos na cidade de Manhuaçu-MG, envolvendo 50 indivíduos que consumiram o queijo minas frescal caseiro contaminado com *S. aureus*, e Cerqueira et al. (1994) também relatou a ocorrência de um surto por *Salmonella* spp e por toxina estafilocócica ocasionado pelo consumo do queijo minas caseiro, no município de Pará de Minas-MG.

Segundo Marchi et al. (2011), no Brasil no período de 1999 e 2008 foram notificados 6.062 surtos de DTA, e no período de 1999 e 2004 os Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná foram os que lideraram o número de notificações, com 928, 663 e 625 registros, respectivamente. No período do estudo, os surtos de DTA levaram a adoecer 117.330 brasileiros, dos quais 63 foram a óbito. A autora conclui que na maioria dos casos de DTA, as notificações não ocorrem devido aos sintomas serem brandos, e por essa razão as vítimas não buscam auxílio médico.

Em um estudo realizado na cidade de Chapecó-SC no período de 1995 a 2007 por Marchi et al. (2011) foram registrados 61 surtos de DTA, e nesse período a *Salmonella* spp foi o micro-organismo encontrado com maior frequência, representando 54,0% dos surtos, seguido do *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*.

Sendo assim, observou-se que os queijos minas frescal adquiridos no município de Bauru-SP obtiveram resultados satisfatórios perante a qualidade microbiológica, destacando que a presença elevada de coliformes totais indica presença de organismos deteriorantes devido a má higienização.

Mesmo não havendo a identificação de bactérias patogênicas, principalmente, nas amostras de queijo minas frescal artesanal, não é possível excluir as possibilidades de que outros produtos provenientes da mesma região de coleta se encontrem nas mesmas

condições satisfatórias ou que haja um padrão microbiológico, pois a quantidade de amostras adquiridas para o trabalho não são suficientes para garantir a qualidade microbiológica dos mesmos.

6 CONCLUSÃO

Foi concluído no presente estudo que as amostras de queijo minas frescal estavam em condições higiênico-sanitárias satisfatórias de acordo com os parâmetros da RDC Nº 12 de 2 de Janeiro de 2001, onde a ausência de coliformes termotolerantes, e dos patógenos *S. aureus*, *B.cereus* e *Salmonella* spp excluíram quaisquer possibilidades de que o consumo dos produtos analisados poderia causar danos ao consumidor. Contudo a presença elevada de coliformes totais nas amostras de queijo minas frescal artesanal, indicou uma possível contaminação na amostra por má higienização, como por exemplo dos materiais que são utilizados durante a produção do produto, má descontaminação de recipientes que armazenam o leite pós pasteurização e local de armazenamento do produto final com temperatura inadequada, o que poderia diminuir a vida de prateleira do produto, ocasionando um prejuízo para o consumidor e para o produtor.

Para se evitar qualquer tipo de contaminação, seja ela por patógenos ou por bactérias degradadoras da matéria, o local de fabricação deve seguir as normas boas práticas de fabricação, conscientização pessoal de higienização, utilização de luvas, máscaras e toucas ao manusear qualquer tipo de ingrediente e material.

Órgãos de fiscalização como a Vigilância Sanitária devem sempre estar fiscalizando e controlando os produtos alimentícios que são oferecidos à população, para que cada vez mais diminua os índices de surtos e DTAs.

7 REFERÊNCIAS

ABIQ. **Associação brasileira das indústrias de queijo**. Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp&codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_sucategoria=17. Acesso: 31/10/2016 às 00:30

BALBANI, A. P. S.; BUTUGAN, O. Contaminação biológica de alimentos. **Pediatria**, v.23, n.4, p.320-328, 2001

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 10. ed. São Paulo: Livraria Nobel, 1980

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 4. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984.

BORGES, M. DE F. et al. Micro-organismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho no estado do Ceará, Brasil. **B. Ceppa**, Curitiba v.21., n 1, p.31-40, 2003.

BRASIL, Ministério da Agricultura e do Abastecimento e da Reforma Agrária. **Portaria 146 de 7 de março de 1996**: Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos queijos. Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, 1996. p.3977.

BRASIL. Leis, Decretos, etc. **Resolução RDC 12 de 02 de Janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília – DF, n.7 – E, seção 1, p. 45-53, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade do leite e produtos lácteos. **Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997**. Diário Oficial da União de 08/09/1997, seção 01, p.19684. Brasília, 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, da Pecuária e do Abastecimento. Instrução **Normativa nº51 de 18 de setembro de 2002**: Aprova os regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel. Diário Oficial da União, Brasília, n.183, seção 1, 2002. p.13.

CARDOSO, A. L. S.P., TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Biológico**, v70, n1, p. 11-13, 2008.

CARDOSO, L. & ARAÚJO, W.M.C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997-2001, São Paulo: **Revista Higiene Alimentar**, v. 18, n.123, p. 49-53 agosto, 2004

CARVALHO, A. F.; MAUBOUI, J. L. Applications of membrane technologies in the dairy industry. In: COIMBRA, J. S. R.; TEIXEIRA, J. A. **Engineering aspects of milk and dairy products**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 3, p. 33-57.

CARVALHO, J.D.G **Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP**. 2003. Campinas, 2003. Dissertação (Mestre em tecnologia de alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2003.

CARVALHO, M.P. **Milk Point Indústria** o ponto de encontro das indústrias de laticínios. As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx> . Acesso: 31/10/2016 às 23:23

CHAVES, J. B. P. **Métodos de diferença em avaliação sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Editora UFV, 2001. 91p. (caderno 33).

COBUCCI, J. A. et al. Curva de lactação na raça Guzerá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1332-1339, 2000.

DO CARMO, L. S. et al. Outbreak of Staphylococcal food poisoning in the municipality of Passos, Mg, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.581-586, 2003.

FLOWERS, R. S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C. W. et al. Pathogens in milk and milk products. In: MARSHALL, R. T. (Ed.). Standard methods for the examination of dairy products. 16. ed. Washington, DC: **American Public Health Association**. 1992, p. 103-212

FONSECA, L. F. L. da, PEREIRA, C. C. Importância, fatores determinantes e métodos de controle da qualidade microbiológica do leite. **Revista Raça Jersey**, n. 24, ab. 1999
FOX et al. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen Publisher Inc, 2000. p. 298-340

FRAZIER, W.C., WESHOFF, D.C **Microbiologia dos alimentos**. 4.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.677p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Sidra banco de dados agregados. Brasília: **IBGE.2016**. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Fasciculo_Indicadores_IBGE/abate-leite-couro-ovos_201602caderno.pdf. Acesso 31/10/2016 às 23:11

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.
LOGUERCIO, A.P. & ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**. Santa Maria v. 31, n.6, p. 1063-1067, 2001.

MARCHI, Débora Melyna et al . Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília , v. 20, n. 3, p. 401-407, set. 2011 . Disponível em <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-49742011000300015&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 05 dez. 2016. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742011000300015>

MAUBOIS, J. L., MOCQUOT, G.; VASSAL, L. **Procédé de traitement du lait et de**

sous produits laitiers. Patente Française, FR 2052121, 18 jul. 1969

MENDES, R. A. et al. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 255-261, 2004.

MILANI, Marcell P. **Qualidade do leite em diferentes sistemas de produção, anos e estações climáticas no Noroeste do Rio Grande do Sul**. 2011. 67 f. [Dissertação (Mestrado)]. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2011.

PAIVA, E. P. DE et al. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. **Higiene alimentar**, v. 23, n. 170, p. 87-92, 2009.

PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 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 de Alimentos**, Campinas, v.26, n. 1, p. 64-69, 2006.

ROSA, V.P.da.; PORTO, E.; SPOTO, M.H.F. Avaliação microbiológica e sensorial de queijos Minas frescal embalados sob atmosfera modificada. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n.132, p. 58-64, jun. 2005

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.63, 2001, p.91-98.

SANTOS, D. O. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p.413-423, 2007.

SANTOS, F. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; CUNHA, G. M. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza – CE. **Boletim Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 13, n. 1, p. 31-36, jan./jun. 1995.

SHINOHARA S.; et.; *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 13, n.5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, et al., **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010.

SILVA, Z.N. et al.; Isolamento e identificação sorológica de *Escherichia coli* enteropatogênica em leite pasteurizado. **Rev. Saúde Pública**. São Paulo, v.35, n.4, p. 375-379, 2001.

SIMIONATO, J. I. **Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**. 2008. 132f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, 2008.

VIDAL-MARTINS, A.M.C., ROSSI, O.D., REZENDE L. N. C. Micro-organismos

heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 396-400, 2005.