



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESCAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA, DF**

**BRASÍLIA, DF
2016**

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESCAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA, DF**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF
2016

SABRINA LUNARA SANTOS PAVELQUESI

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESCAL COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BRASÍLIA, DF**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2016

Agradecimentos

Agradeço imensamente à instituição Universidade de Brasília, mais precisamente ao campus Ceilândia, onde eu pude vivenciar momentos de muito aprendizado, crescer pessoal e mentalmente, desenvolver e aperfeiçoar minhas habilidades, e ter uma base incrível para desenvolver meu trabalho final.

À minha orientadora Dra. Daniela Orsi, profissional preferida que conheci na universidade, me deu todo o suporte que até mesmo a universidade não pode me dar, corrigiu tudo com muita calma e perfeição, me deu toda a ajuda necessária para eu concluir esse trabalho. Sou muito grata por ter tido a oportunidade de viver esse último ano com você, aprendendo coisas, inclusive, alheias ao meu tema de TCC, e sendo provadora auxiliar de cerveja artesanal produzida no laboratório.

À minha co-orientadora Izabel Cristina, a mãe de todos os alunos, a mulher mais guerreira que tive a oportunidade de conhecer nesse lugar, meu muito obrigado pelas broncas, pelas palhaçadas, pelos gritos, você me fez feliz durante essa graduação e, quando eu achava que fosse concluir o curso sem aprender a fazer PCR, você foi lá e me ensinou a teoria e a técnica e, me ensinou também, a pessoa humana que podemos ser diante de tantos obstáculos.

Ao meu namorado, Wilker Mesquita, por ter vivenciado e lutado junto comigo todos esses anos de UnB, onde crescemos juntos e aprendemos juntos. Pelos dias de calma que ele me proporcionou quando eu não aguentava mais tanto estresse. Pelos seriados que assistimos em meio a tanta coisa para fazer, mas que eu conseguia me encher de serotonina. Pelas broncas e incentivos quando eu procrastinava, por ter dado o toque final na formatação. Por todo o amor de sempre.

À minha irmã, Karini Pavelquesi, que embora não participe tanto da minha vida acadêmica, mesmo porque advocacia foge completamente dos temas da farmácia, esteve presente em todos os momentos, me apoiando, me dando alegria em casa, me dando presente (porque universitário da UnB é pobre mesmo), me dando o carinho necessário de uma irmã que é, também, melhor amiga e, que sem isso, seria muito mais difícil ter a tranquilidade para concluir esse trabalho.

Aos meus pais e todos os meus familiares que me apoiaram e me deram espaço para que eu concluísse esse trabalho, mesmo diante de alguns episódios estressantes. Inclusive, me dando a regalia de estudar sem ter de trabalhar. Vocês são incríveis e eu serei eternamente grata!

RESUMO

O trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de queijo tipo minas frescal comercializados nos supermercados da cidade de Brasília, DF. Os resultados mostraram que em relação à microbiota deteriorativa, 5 amostras apresentaram quantidades elevadas de bactérias psicotróficas, com valores acima 10^7 UFC/g. A enumeração de coliformes totais ficou acima de $1,0 \times 10^3$ NMP/g em 40% das amostras e todas as amostras mostraram resultados positivos para a enumeração de coliformes termotolerantes. De acordo com a legislação brasileira, as amostras 1 e 3 de queijos tipo minas frescal estavam impróprias para o consumo humano, pelo excesso de coliformes termotolerantes (enumeração acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g) na amostra 1 e pelo excesso de bactérias *S. aureus* na amostra 3 (contagem de $4,6 \times 10^3$ UFC/g). As amostras 3 e 4 apresentaram enumeração considerável de coliformes termotolerantes ($3,9$ a $4,9 \times 10^2$ NMP/g), porém dentro limites estabelecidos pela legislação. E as amostras 4 e 6 apresentaram cepas de *S. aureus*, porém as contagens de $1,8$ a $3,7 \times 10^2$ UFC/g estavam dentro dos limites permitidos pela legislação. A presença de coliformes termotolerantes e de bactérias *S. aureus* nas amostras 1, 3, 4, e 6 indicam condições higiênicas inapropriadas. Os resultados desta pesquisa indicaram que as amostras 2, 7 e 8 mostraram boa qualidade microbiológica, as amostras 4, 5, 6, 9 e 10 (50% das amostras) estavam em condições higiênico-sanitárias aceitáveis para o consumo e as amostras 1 e 3 estavam impróprias para o consumo.

Palavras chave: queijo minas frescal, qualidade microbiológica, segurança alimentar.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of different brands of cheese “Minas Frescal” (Brazilian cheese) commercialized in supermarkets in the city of Brasília, DF. The results showed that in relation to the deteriorating microbiota, 5 samples presented high quantities of psychrotrophic bacteria, with values above 10^7 UFC/g. The enumeration of total coliforms was above $1,0 \times 10^3$ NMP/g in 40% of the samples and all the samples showed positive results for enumeration of thermotolerant coliforms. According to Brazilian legislation, the samples 1 and 3 were inappropriate for human consumption, due to the excess of thermotolerant coliforms (enumeration above $1,1 \times 10^3$ NMP/g) in sample 1 and due to the excess of *S. aureus* bacteria on the sample 3 (count of $4,6 \times 10^3$ UFC/g). Samples 3 and 4 showed substantial enumeration of thermotolerant coliforms ($3,9$ to $4,9 \times 10^2$ NMP/g), however, they were within the limits established by legislation. Finally, the samples 4 and 6 showed strains of *S. aureus*, however the counts of $1,8$ to $3,7 \times 10^2$ UFC/g were inside the limits allowed by the legislation. The presence of thermotolerant coliforms and of *S. aureus* bacteria in samples 1, 3, 4, and 6 indicated inappropriate hygienic conditions. These results indicated that the samples 2, 7 and 8 showed good microbiological quality; samples 4, 5, 6, 9 and 10 (50% of the samples) were in acceptable hygienic-sanitary conditions for consumption; and samples 1 and 3 were inappropriate for consumption.

Key words: cheese “Minas Frescal”, microbiologic quality, food safety.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
1.1	Queijo minas frescal: definição e consumo no Brasil	9
1.2	Produção e qualidade do queijo minas frescal	10
1.3	Contaminação microbiológica de queijos tipo minas frescal	11
1.4	Surtos de doenças transmitidas por alimentos.....	13
1.5	Legislação brasileira e queijos tipo minas frescal	15
1.6	Biologia molecular na identificação de micro-organismos em alimentos.....	15
2.	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos	17
3.	JUSTIFICATIVA.....	18
4.	METODOLOGIA.....	19
4.1	Coleta e preparo das amostras.....	19
4.2	Análises microbiológicas	19
4.2.1	Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas	20
4.2.2	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	20
4.2.3	Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i>	22
4.2.4	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	23
4.3	Análises moleculares e extração de DNA bacteriano	23
4.3.1	Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR	24
4.3.2	PCR qualitativo	26
4.3.3	Eletroforese em gel de agarose	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1	Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas.....	29
5.2	Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes	31
5.3	Determinação da presença de <i>Salmonella spp.</i>	33
5.4	Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	33
5.5	Análises moleculares	35
6.	CONCLUSÕES.....	40
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	21
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	26
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	26
Tabela 4. Reagentes utilizados para realização da reação de PCR.....	27
Tabela 5. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	30
Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	32
Tabela 7. Contagem das colônias no <i>Staphylococcus sp.</i> (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram), nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	34
Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias de <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de queijos tipo minas frescal comercializados em Brasília-DF.....	36
Tabela 9. Identificação por meio de PCR de bactérias de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas das amostras de queijos tipo minas frescal comercializados em Brasília-DF.....	37
Tabela 10. Classificação de amostras de queijo minas frescal impróprias, satisfatórias e aprovadas para consumo humano.....	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	23
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EutC de <i>E. coli</i>	36
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene entC de <i>S. aureus</i>	37

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Genoma completo de <i>E. coli</i>	48
Anexo 2. Sequência de Primer para <i>E. coli</i>	49
Anexo 3. Genoma completo de <i>S. aureus</i> precursor de enteroxina C3.....	50
Anexo 4. Sequência de Primer para <i>S. aureus</i>	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Queijo minas frescal: definição e consumo no Brasil

Entende-se por queijo minas frescal, o queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. Apresenta massa crua, coloração esbranquiçada e consistência mole. É tipicamente brasileiro, e é produzido com leite de vaca pasteurizado, tem pouca acidez e sua durabilidade gira em torno de nove dias, quando armazenado em temperatura correta de refrigeração. Esse queijo apresenta um alto teor de umidade, sendo >55% e, normalmente, é vendido em forma cilíndrica (BRASIL, 2004; SILVA, 2005; PERRY, 2004).

O queijo minas frescal é um dos queijos mais consumidos no país por todas as camadas da população brasileira (SANGALETTI et al., 2009). O consumo desse alimento teve aumento significativo a partir década de 80, por se tratar de um produto de fácil elaboração e de baixo custo, além de apresentar alto rendimento de fabricação, atraindo o interesse das indústrias produtoras (BRIGIDO et al., 2004; VIEIRA et al., 2008).

No Brasil, a fabricação do queijo ocupa o sexto lugar entre os maiores produtores mundiais, confirmando dessa forma sua importância socioeconômica. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), no ano de 2010 a produção de queijos no Brasil foi de 745 mil toneladas (ABIQ, 2011). Estima-se que no Brasil, o consumo médio per capita de queijos aproxima-se de 5,1 quilos por ano, atrás de países como a Argentina com 11 quilos, França e Itália com 25 quilos, enquanto na América do Sul o consumo médio é de 20 quilos. Entre 2005 e 2013 observou-se um crescimento no consumo per capita de 76,0%, com um consumo anual de 8,0% a 9,0% de queijos nesses últimos anos, com destaque a 2013, em que alcançou 1,032 milhões de toneladas. Segundo a ABIQ, em 2030, o consumo per capita de queijo no país alcançará 11 quilos (ABIQ, 2014).

O queijo minas frescal por apresentar elevado teor de umidade, torna-se um produto altamente perecível que apresenta condições propícias para contaminação e multiplicação bacteriana. É de se esperar, portanto, uma alta preocupação acerca

da qualidade microbiológica do leite e do queijo minas frescal, de forma a garantir um produto seguro para o consumidor (SANTOS & HOFFMANN, 2010).

1.2 Produção e qualidade do queijo minas frescal

O leite é a principal matéria prima para fabricação de queijos e a qualidade do leite cru, é a primeira condição para que se obtenha um queijo de qualidade (PINTO et al., 2011). O leite cru de boa qualidade pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4 °C, no máximo 2 horas após a ordenha (PERRY, 2004).

Para garantir que o leite usado no preparo do queijo esteja isento de micro-organismos contaminantes, deve-se iniciar o processo de produção do queijo pela pasteurização adequada do leite cru, leite pós ordenha. A pasteurização é um processo térmico que tem como objetivo destruir os patógenos e reduzir o número de micro-organismos em geral (SILVA, 2005; PERRY, 2004, VIEIRA et al., 2008). Apesar disso, segundo VIEIRA et al. (2008), quando o número de bactérias deteriorativas ou patogênicas iniciais do leite é elevado, a pasteurização não é suficiente para a destruição desses micro-organismos. O leite com alta carga microbiana inicial é um problema para a indústria de laticínios, uma vez que se torna mais ácido, resultando em produtos de má qualidade e mais perecíveis. Ainda segundo VIEIRA et al. (2008), apesar de a legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo de queijo minas frescal, é bastante frequente a comercialização do queijo minas artesanal que não atende a essa especificação legal.

As etapas do processo de produção do queijo minas frescal incluem pasteurização do leite, adição de coalho, tratamento da massa com corte da coalhada e liberação do soro, enformagem, salga, embalagem e armazenamento, de forma que se obtenha um queijo fresco não maturado e pronto para o consumo (SILVA, 2005; PERRY, 2004). O processamento simples, alto rendimento e ausência de maturação no produto final, faz a produção do queijo minas frescal possuir retorno rápido de investimento para o produtor e permite um baixo custo de comercialização (APOLINÁRIO et al, 2014; GRANDI & ROSSI, 2006).

Após a pasteurização do leite é necessário à adição do coalho que provoca coagulação enzimática do leite, dando origem à massa. Com o fim da coagulação, procede ao tratamento de massa, onde a mesma sofre fragmentação, com o objetivo de promover a retirada do soro. Após o procedimento de enformagem, que promove forma cilíndrica ao queijo, como normalmente é comercializado, é realizada a salga em sua superfície, garantindo o sabor, controle da umidade e conservação do produto. Por fim, o produto é embalado, geralmente, em sacos plásticos e armazenado sob refrigeração, a fim de garantir o tempo de validade e retardar o crescimento de micro-organismos contaminantes (SILVA, 2005).

Caso não haja boas práticas de fabricação na produção do queijo, a matéria prima pode ser recontaminada após a pasteurização do leite. Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são essenciais para a garantia de um produto de qualidade (SANGALETTI et al., 2009).

Para o controle microbiológico dos queijos minas frescal, é essencial que se respeite a temperatura adequada de conservação no armazenamento, onde, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIC) é recomendado, que a temperatura não seja maior que 8°C. Porém, essa temperatura de conservação muitas vezes não é respeitada nos pontos de venda da mercadoria, como mostrou um estudo realizado pelo INMETRO (2006), onde 12 amostras de um total de 21 amostras de queijos minas, o que correspondeu a 57% das amostras, apresentaram temperaturas maiores que 8°C no momento da compra. Durante a comercialização dos queijos minas frescal, também é comum observar na embalagem o depósito de soro exsudado pelo produto, isso devido à sua alta umidade e esse líquido favorece o crescimento microbiano (PINTO et al., 2011).

Devido a esses diversos fatores, o queijo minas frescal é um produto bastante perecível, mesmo quando corretamente armazenado sob refrigeração, e de curta vida de prateleira, devendo ter sua comercialização imediata à fabricação e consumo nos primeiros quinze dias após a sua produção (GRANDI & ROSSI, 2006; ROCHA et al, 2006; SANGALETTI et al, 2009).

1.3 Contaminação microbiológica de queijos tipo minas frescal

Durante a fabricação do queijo minas frescal diversos fatores podem comprometer a qualidade do produto final, dentre eles destaca-se a contaminação

microbiológica da matéria-prima, isso porque, o leite é um ótimo meio de cultivo devido a suas características intrínsecas como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e riqueza de nutrientes, estando mais suscetível a contaminação microbiológica. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a adoção de técnicas higiênicas inadequadas na manufatura e o uso de temperaturas inadequadas na armazenagem contribuem, também de forma efetiva, para a má qualidade do produto final (APOLINÁRIO et al., 2014; PERRY, 2004; SANGALETTI et al., 2009; SILVA, 2005).

Queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. As bactérias do grupo coliforme em altas quantidades são consideradas as principais causadoras de deterioração de queijos, o que causa estufamento precoce dos produtos e fermentações anormais. Bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella sp.* também podem estar presentes nos queijos minas frescal de má qualidade (BRIGIDO et al., 2004; FERREIRA et al., 2011; GRANDI & ROSSI, 2006; PINTO et al, 2011; ROCHA et al., 2006; SANTOS & HOFFMANN, 2010).

O grupo de coliformes compreende os coliformes totais e termotolerantes, sendo que o grupo de coliformes totais é representado por todos os bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos que não formam esporos e que são capazes de fermentar lactose com produção de gás, quando incubados na temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Já os coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, compreendem o grupo de bactérias que vivem no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente. Os gêneros encontrados nesse grupo são *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, sendo *E. coli* o melhor e mais conhecido indicador de contaminação de origem fecal (FERREIRA et al, 2011; GRANDI & ROSSI, 2006; PINTO et al, 2011; SANGALETTI et al, 2009). Algumas cepas patogênicas de *E. coli*, ao serem ingeridas, multiplicam-se no intestino e produzem toxinas, sendo uma causa comum de diarreia (FERREIRA et al, 2011).

A contaminação por *Salmonella sp.* causa infecção alimentar a partir da ingestão de bactérias vivas presentes nos alimentos. *Salmonella sp.* é considerada uma das principais bactérias causadoras de DTA em vários países, inclusive no Brasil, sendo responsável por sérios problemas de saúde pública e perdas

econômicas. As prováveis fontes de contaminação por esta bactéria são águas contaminadas com fezes ou até mesmo o contato com animais silvestres infectados. *Salmonella* sp. tem como principal habitat o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As bactérias da espécie *S. aureus* também podem ser produtoras de toxinas termo resistentes causando intoxicação alimentar (PINTO et al., 2011; VIEIRA et al., 2008). A bactéria *S. aureus* tem como principal habitat a pele, as glândulas e mucosas do homem e dos animais (KOMATSU et al., 2010). A presença desse micro-organismo no leite e em seus produtos pode sugerir a utilização de matéria-prima proveniente de animais infectados (mastite) ou uma provável contaminação por manipuladores portadores assintomáticos (LEJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009).

Listeria monocytogenes é uma espécie patogênica que causa listeriose, uma enfermidade que pode ser grave em pessoas imunocomprometidas e apresenta como característica a sua capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e relativa resistência térmica. Apesar da importância da patogenicidade da bactéria *L. monocytogenes* em produtos lácticos, existem poucos estudos sobre sua incidência em queijos produzidos no Brasil (PINTO et al., 2011; VACONCELOS e MARIN, 2008).

1.4 Surtos de doenças transmitidas por alimentos

O Ministério da Saúde considera surto de origem alimentar, um episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem. Leite e derivados representaram 2,6% das fontes de DTA no Brasil entre os anos 2000 e 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). De acordo com VACONCELOS e MARIN (2008), os relatórios anuais de vários países sobre DTA mostram que leite e derivados são fontes de 1-5% de surtos bacterianos.

No Brasil, a maioria dos casos de surtos alimentares causadores de gastroenterite humana é atribuída à bactéria patogênica *Salmonella spp.* (7,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; VIEIRA et al., 2008). O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, e não fermentadores de lactose.

Sua temperatura ótima de crescimento é em média 38°C, sendo destruída acima de 60°C e não apresentando crescimento em temperaturas abaixo de 5°C, e sua forma de transmissão mais comum é pela via oral-fecal (BORGES et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010). Surtos de salmonelose atribuídos ao consumo de leite e produtos lácteos têm sido relatados na literatura. Na Suíça, no período de 2006 a 2007, foram relatados dois surtos de *Salmonella enterica*, causados pelo consumo de queijos (PASTORE et al., 2008). Em 2008, houve três surtos de salmonelose na Holanda, sendo um atribuído ao consumo de queijo contaminado pelo sorotipo *Typhimurium* e envolveu 152 consumidores (DOORDUYN et al., 2008).

Após a *Salmonella sp.*, as espécies patogênicas de *E. coli* representam o segundo agente etiológico responsável pelos surtos alimentares no Brasil, compreendendo 7,2% dos casos e a bactéria *S. aureus* ocupa o terceiro lugar, representando 5,8% dos surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O grande problema da espécie *S. aureus* é a produção de enterotoxinas em alimentos contaminados por esse patógeno, quando estes permanecem por tempo variável nas condições de temperaturas entre 10 a 46°C, com o ótimo entre 40 e 45°C. Essas toxinas são as causadoras de surtos de intoxicação alimentar, quando há ingestão dos alimentos contaminados (FRANCO & LANDGRAF, 2008). APOLINÁRIO et al (2014) afirmou que o processo de pasteurização diminui a população de micro-organismos presentes no leite, porém toxinas, como a enterotoxina estafilocócica, não são inativadas, podendo causar intoxicações alimentares nos consumidores.

No Estado de Minas Gerais, no ano de 1999, 50 pessoas foram intoxicadas após ingerir queijo minas frescal contaminado por *S. aureus*. Os sintomas de intoxicação alimentar (vômito e diarreia) apareceram 1-2 horas após consumo do queijo contaminado. As análises dos queijos mostraram contagens de *S. aureus* entre $2,4 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^8$ UFC/g (CARMO et al., 2002). Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA), entre 1993 e 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos com acometimento de 4.247 pessoas em 11 países dessa região. Há 16 relatos de surtos causados por queijos ocorridos no Brasil, com 86 pessoas acometidas (BORGES et al., 2008; INPPAZ/OPS/OMS, 2006; SANTANA et al., 2010).

Surtos de listeriose relacionados ao consumo de queijos também já foram relatados na literatura (BARANCELLI et al., 2011). Surtos associados ao consumo de queijos contaminados ocorreram na Suécia (CARRIQUE-MAS et al., 2003), no Japão (MAKINO et al., 2005) e na Suíça (BILLE et al., 2006). Surtos recentes de listeriose na Áustria e Alemanha, atribuídos ao consumo de queijo tipo “Quargel”, resultaram em 4 mortes (FRETZ et al., 2010).

1.5 Legislação brasileira e queijos tipo minas frescal

A RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos determina os parâmetros microbiológicos para queijo minas frescal. De acordo com a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, a quantidade limite para coliformes a 45°C é de 5×10^2 NMP/g, para *Staphylococcus* coagulase positiva é de 5×10^2 /g, e *Salmonella* sp. deve estar ausente em 25g do produto (BRASIL, 2001).

Embora a legislação estabeleça os parâmetros microbiológicos para queijos, ainda há uma grande comercialização do produto em desacordo com os padrões vigentes, pois é comum observar a comercialização do “leite informal”, sem inspeção, e sem garantia de pasteurização (FERREIRA et al., 2011; QUINTANA & CARNEIRO, 2007; VIEIRA et al, 2008).

1.6 Biologia molecular na identificação de micro-organismos em alimentos

Os testes tradicionais de microbiologia de alimentos para fins de identificação bacteriana compreendem as técnicas realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos e são complementadas por testes bioquímicos em conjunto com testes sorológicos. Entretanto, apesar dessas técnicas serem relativamente baratas, sensíveis e de fácil padronização, são também, bastante demoradas quando o objetivo é chegar na confirmação do agente patogênico, além disso, podem apresentar variabilidade nos resultados, em razão de fatores ambientais sobre a expressão gênica e podem apresentar riscos de interpretações errôneas. Com isso, fez-se necessário a utilização de técnicas baseadas na amplificação de DNA, como

é o caso da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (GANDRA et al, 2008; MENDONÇA, 2016).

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, a qual proporciona enzimaticamente ampliações *in vitro* em milhões de cópias das sequências iniciais de DNA ou RNA (GANDRA et al, 2008). De acordo com ANDRADE et al (2010), a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pelas técnicas microbiológicas. GRANDA et al (2008) exaltam maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com espécies de bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados.

A técnica da PCR é realizada por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores, os chamados *primers*, sobre um DNA molde, visando a produção de milhões de cópias desta sequência. É uma técnica automatizada, onde um aparelho denominado termociclador é capaz de alternar repetidamente entre temperaturas ótimas para cada etapa específica do ciclo de amplificação: desnaturação, anelamento e extensão (GANDRA et al, 2008; SCHEIDEGGER, 2009).

ZOCHE & SILVA (2012) relataram que em diversos trabalhos tem sido reportado o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção de patógenos diretamente em alimentos. Porém, embora essa técnica molecular traga resultados rápidos, principalmente frente a surtos alimentares, sua eficácia depende da extração do DNA puro, o que nem sempre é possível, principalmente em alimentos ricos em gorduras e proteínas, como é o caso dos queijos.

No estudo de ZOCHE & SILVA (2012), a PCR foi capaz de detectar em amostras de queijos minas artificialmente contaminadas, contaminação por *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* presentes em concentrações $\geq 10^2$ unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC g-1). Apesar disso, foi relatado que poucos trabalhos descrevem técnicas moleculares para diagnóstico desses micro-organismos diretamente em queijos e, que em queijos tipo minas frescal, produto típico brasileiro, não há nenhum relato da literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de queijo tipo minas frescal comercializados na cidade de Brasília e, assim, determinar se esses produtos estão sendo distribuídos com qualidade, de forma a garantir a segurança alimentar do consumidor.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar nas amostras de queijos as análises bacteriológicas: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* sp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

3. JUSTIFICATIVA

A manipulação dos alimentos no âmbito da produção e comercialização deve ser realizada dentro dos padrões higiênico-sanitários, pois, quando contrário, os alimentos se tornam expostos à elevada contaminação microbiana, podendo inclusive apresentar micro-organismos patogênicos. O queijo tipo minas frescal, por se tratar de um alimento altamente perecível, é um alvo importante de contaminação microbiológica, ainda que seja armazenado em condições adequadas. O queijo, ao ser fracionado, ou seja, ao passar por manipulação em estabelecimentos previamente a sua comercialização, tende a oferecer condições para multiplicação de micro-organismos deteriorantes. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo minas frescal comercializados no Distrito Federal, de forma a verificar a qualidade e segurança alimentar desses produtos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas 10 amostras de diferentes marcas de queijos tipo minas frescal comercializados em supermercados na cidade de Brasília-DF. Todas as amostras eram industrializadas, possuindo rótulo contendo as devidas informações e sendo inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal, e encontravam-se em embalagens fechadas, dentro do prazo de validade e foram mantidas sob refrigeração até o início das análises.

As coletas tiveram início no mês de abril de 2016 e foram finalizadas no mês de setembro de 2016. As amostras não tiveram sua marca divulgada, sendo, portanto, identificadas de 1 a 10. As amostras coletadas foram levadas imediatamente para o laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, UnB, não excedendo uma hora entre o período de coleta e o início das análises das mesmas.

Para o preparo das amostras, em condições de assepsia, foram pesadas 25g da amostra em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril e, em seguida homogeneizado por 20 minutos, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais, seriadas em água peptonada 0,1% (p/v) até a diluição 10^{-5} .

4.2 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas realizadas foram: contagem total dos micro-organismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus sp.* e pesquisa de *Salmonella sp* e *E. coli*. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média e desvio padrão.

4.2.1 Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

Para contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, inoculou-se 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.2.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

A técnica de Número Mais Provável (NMP) é um método que estima a densidade de micro-organismos viáveis presentes em uma amostra. A determinação do NMP de micro-organismos é baseada no princípio de que, numa amostra líquida as bactérias podem ser separadas por agitação, resultando numa suspensão em que as células estejam uniformemente distribuídas. A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos micro-organismos na amostra (FENG et al., 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 mL de cada diluição em uma série de 3 tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v)) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes totais (FENG et al., 2002).

Alíquotas de 1 mL dos tubos positivos no caldo lactosado foram transferidas, concomitantemente, para o caldo verde brilhante bile lactose 2% (caldo VB, para a confirmação de coliformes totais) e para o caldo *Escherichia coli* (caldo EC, para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo VB foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória

positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo EC foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

Tabela 1. Número Mais Provável (NMP) e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade, para diversas combinações de tubos positivos em série de três tubos.

Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)		Combinação de tubos +	NMP/g ou ml	Intervalo de confiança (95%)	
		Mínimo	Máximo			Mínimo	Máximo
0-0-0	<3,0	-	9,5	2-2-0	21	4,5	42
0-0-1	3,0	0,15	9,6	2-2-1	28	8,7	94
0-1-0	3,0	0,15	11	2-2-2	35	8,7	94
0-1-1	6,1	1,2	18	2-3-0	29	8,7	94
0-2-0	6,2	1,2	18	2-3-1	36	8,7	94
0-3-0	9,4	3,6	38	3-0-0	23	4,6	94
1-0-0	3,6	0,17	18	3-0-1	38	8,7	110
1-0-1	7,2	1,3	18	3-0-2	64	17	180
1-0-2	11	3,6	38	3-1-0	43	9	180
1-1-0	7,4	1,3	20	3-1-1	75	17	200
1-1-1	11	3,6	38	3-1-2	120	37	420
1-2-0	11	3,6	42	3-1-3	160	40	420
1-2-1	15	4,5	42	3-2-0	93	18	420
1-3-0	16	4,5	42	3-2-1	150	37	420
2-0-0	9,2	1,4	38	3-2-2	210	40	430
2-0-1	14	3,6	42	3-2-3	290	90	1.000
2-0-2	20	4,5	42	3-3-0	240	42	1.000
2-1-0	15	3,7	42	3-3-1	460	90	2.000
2-1-1	20	4,5	42	3-3-2	1.100	180	4.100
2-1-2	27	8,7	94	3-3-3	>1.100	420	-

Fonte: *Bacteriological Analytical Manual* (Blodgett, 2003).

4.2.3 Pesquisa de *Salmonella sp.*

Para a pesquisa de *Salmonella sp.*, a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 mL foram transferidas para caldo de enriquecimento selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em esgotamento em estrias para isolamento em placas de Petri, contendo o meio ágar *Salmonella Shigella* (Ágar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em ágar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo ágar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o micro-organismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No ágar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO_2) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os micro-organismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 1). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

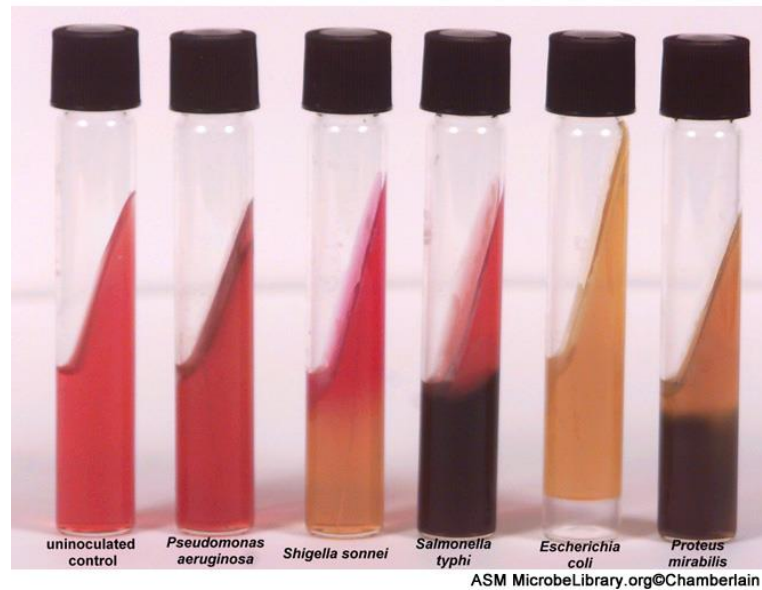


Figura 1. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI

Fonte: ASM microbelibrary.org

4.2.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em ágar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

4.3 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes, materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de queijo suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h. em caldo Luria Bertani (LB), meio rico em nutrientes para o crescimento de bactérias recombinantes.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações. Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no

tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®).

4.3.1 Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas a serem analisadas para *E. coli* e *S. aureus* foram realizadas conforme busca na literatura e optou-se por duas regiões gênicas

específicas, para os quais os oligonucleotídeos foram desenhados no presente estudo.

Para identificar *E. coli* optou-se pela região gênica específica *EutC* (anotação descrita para região gênica que codifica a etanolamina amônia liase em *E. coli*). Esta enzima pertence as vias dependentes de vitamina B12 em bactérias. A utilização de etanolamina como fonte única de carbono e energia requer vitamina B12 para ambas as funções: indutor da via catabólica e cofator da enzima etanolamina amônia liase. Etanolamina amônia liase é a primeira enzima da via que converte etanolamina a acetaldeído e amônia; acetaldeído serve como fonte de carbono e energia ao ser convertido em acetil-coA e a amônia serve como fonte de nitrogênio. A etanolamina facilmente encontrada na natureza, pois está presente nos fosfolipídios das membranas celulares a fosfatidiletanolamina e fosfatidilcolina (PAIVA, 2010). Nossa sequência é específica para detecção de *E.coli*, porém referenciado na literatura como região promotora do gene malB (sistema de maltose) por Wang e colaboradores em 1997 e adotado para identificar qualquer sorotipo desta espécie. Adotamos aqui a anotação fornecida pelo GeneBank em 2012.

Já para identificar *S. aureus*, optou-se pela região gênica específica *entC* (anotação descrita para região gênica que codifica enterotoxina C do *S. aureus*). O gene *entC* mostrou correlação forte com a produção de enterotoxina, e foi proposto para estudo por Tamarapu e colaboradores em 2001.

As enterotoxinas estafilocócicas são consideradas superantígenos, que se caracterizam por ligações simultâneas ao Complexo Maior de Histocompatibilidade (CMH) de classe II na célula apresentadora de antígeno e aos receptores de células T, sem a presença de antígenos específicos. Com essa ligação, ocorrem efeitos sistêmicos como febre alta, vômito, diarreia e disfunções hepáticas e renais. O grupo da toxina C (SEC) é formado por três subtipos antigenicamente distintos e denominados de SEC1, SEC2 e SEC. A enterotoxina C é heterogênea e apresenta variações antigênicas e em sua sequência molecular, ocorrendo ainda, as variantes SEC bovina e SEC ovina, cuja classificação é baseada em diferenças antigênicas e no animal hospedeiro da qual foi isolada.

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, ANEXO 2), foram desenhados

oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
Tm do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e ΔG de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5'→3')	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		

4.3.2 PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem

foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído (2,5ng/µL) da amostra bacteriana (Tabela 4).

Tabela 4. Reagentes utilizados para realização da reação de PCR

Reagente (quantidade/ concentração do estoque)	Volume
DNA molde 10 ng(2,5ng/µL)	4 µL
Tampão Taq 10 x	2,5 µL
MgCl ₂ 50mM	0,7 µL
Mistura dos 4 nucleotídeos- dNTP 2,5 Mm	1,25 µL
Oligo F 10µM	1,5 µL
Oligo R 10µM	1,5 µL
Taq DNA polimerase 5U/µL	0,5 µL
Água Miliq	qsp 25 µL
	25 µL

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou 50pb DNAI/HindIII (JENA ®).

4.3.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel foi de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pB (pares de

bases). Foi adicionado 3 μ L de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7 μ L de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas

A contagem total de bactérias é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Esse método não diferencia os tipos de bactérias, sendo, portanto, realizado para avaliar a qualidade geral dos alimentos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2001; SANGALETTI et al., 2009).

Para compor os resultados das análises deste estudo, foi feita a leitura das placas em diluições de 10^{-4} e 10^{-5} , pois as placas com amostras menos diluídas encontravam-se impossibilitadas de serem lidas, devido à alta quantidade de colônias crescidas. A tabela 5 apresenta os resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal, expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão. Observou-se um crescimento entre 10^4 e 10^7 de bactérias mesófilas e psicotróficas.

Tabela 5. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicrotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	$7,5 \times 10^5$	$5,59 \pm 0,60$	$7,6 \times 10^5$	$5,85 \pm 0,21$
Amostra 2	$6,0 \times 10^4$	$4,68 \pm 0,36$	$1,0 \times 10^4$	$3,97 \pm 0,24$
Amostra 3	$2,0 \times 10^6$	*	$3,7 \times 10^6$	$6,55 \pm 0,13$
Amostra 4	$8,5 \times 10^6$	$6,82 \pm 0,37$	$3,5 \times 10^7$	$7,51 \pm 0,23$
Amostra 5	$3,5 \times 10^7$	$6,75 \pm 1,54$	$1,7 \times 10^7$	$7,15 \pm 0,34$
Amostra 6	$1,3 \times 10^7$	$7,09 \pm 0,22$	$9,8 \times 10^7$	$7,93 \pm 0,27$
Amostra 7	$5,3 \times 10^6$	$6,07 \pm 1,16$	$7,5 \times 10^6$	$6,86 \pm 0,16$
Amostra 8	$2,0 \times 10^5$	$5,29 \pm 0,18$	$5,4 \times 10^6$	$6,73 \pm 0,07$
Amostra 9	$2,5 \times 10^7$	$7,26 \pm 0,47$	$6,6 \times 10^7$	$7,81 \pm 0,10$
Amostra 10	$3,0 \times 10^5$	$5,26 \pm 0,55$	$3,3 \times 10^7$	$7,47 \pm 0,25$

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata

DP = desvio padrão

* = não foi possível calcular a média de medidas em triplicata, pois uma placa estava contável e as outras placas apresentaram-se com quantidades incontáveis de colônias.

Apesar de a legislação brasileira não estabelecer limites para contagem total de micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, há uma especificação para essa contagem dada pela Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002), onde se permite uma contagem máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de micro-organismos totais para os alimentos em geral.

A contagem de micro-organismos psicrotróficos apresentou-se com número elevado, acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g, em 50% das amostras, podendo indicar deficiência na sanitização, falha no controle dos ingredientes ou do processo, e ainda, más condições de armazenamento nas prateleiras dos supermercados com abuso de temperatura (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2001).

As bactérias psicotróficas são micro-organismos que crescem em alimentos refrigerados e em número elevado são responsáveis pela diminuição da vida de prateleira desses alimentos (APHA, 2001). Dentre as bactérias psicotróficas, as *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Lactobacillus* são as principais deteriorantes de produtos lácteos, sendo as mais comumente encontradas nesse tipo de alimento (SILVA, et al., 2001).

Segundo SANGALETTI et al. (2009), o aumento da população de micro-organismos psicotróficos é justificado pela característica desses micro-organismos crescerem em temperaturas de 2 a 7°C. Um alto número de bactérias psicotróficas nas amostras de queijo pode refletir a presença de enzimas extracelulares (lipases e proteases) produzidas por estas bactérias, podendo ocasionar alterações físico-químicas e alterações das suas características organolépticas.

No estudo de SANGALETTI et al. (2009), foram coletadas 3 marcas de queijos tipo minas frescal diretamente dos laticínios e avaliou-se o prazo de vida útil desses queijos armazenados a 4°C por 30 dias, através de análises microbiológicas. Observou-se um aumento gradativo da população bacteriana durante o tempo de armazenamento, sendo que após 10 dias de estocagem a contagem de mesófilos foi de 6,48 a 7,29 log de UFC/g e a contagem de psicotróficos foi de 7,19 a 8,09, resultados similares às amostras com altas contagens deste presente estudo.

5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

Os resultados obtidos nas análises de determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal deste estudo estão demonstrados na tabela 6.

Tabela 6. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	Coliformes Totais		Coliformes Termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g \pm DP	NMP/g	Log NMP/g \pm DP
Amostra 1	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$
Amostra 2	$0,7 \times 10^1$	$0,77 \pm 0,26$	$<0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 3	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$3,9 \times 10^2$	$2,05 \pm 0,86$
Amostra 4	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$4,9 \times 10^2$	$2,46 \pm 0,58$
Amostra 5	$1,5 \times 10^1$	$1,10 \pm 0,34$	$<0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 6	$>1,1 \times 10^3$	$3,04 \pm 0,00$	$0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 7	$1,1 \times 10^1$	$1,00 \pm 0,19$	$0,4 \times 10^1$	$0,58 \pm 0,18$
Amostra 8	$<0,3 \times 10^1$	$0,50 \pm 0,05$	$<0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 9	$<0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$	$<0,3 \times 10^1$	$0,48 \pm 0,00$
Amostra 10	$1,7 \times 10^2$	$1,89 \pm 0,67$	$0,5 \times 10^1$	$0,74 \pm 0,23$

Os resultados foram expressos como média de medidas em triplicata

DP = desvio padrão

Do total de amostras de queijos analisadas, observou-se que 4 amostras apresentaram populações de coliformes totais acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g, refletindo falta de condições higiênico-sanitárias. No estudo de VISOTTO et al. (2011), a maioria dos queijos avaliados (27 de 30 amostras, 90%) apresentou populações de coliformes totais acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g, sugerindo que os queijos podem ter sido produzidos com matéria prima de má qualidade ou que houve falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento dos mesmos.

Para queijos de muito alta umidade ($>55\%$), como os tipos minas frescal, elaborados por coagulação enzimática e sem ação de bactérias lácticas, a legislação brasileira (BRASIL, 2001), delimita uma tolerância de $5,0 \times 10^2$ NMP/g para coliformes termotolerantes. A amostra 1 estava imprópria para o consumo, com enumeração de coliformes termotolerantes acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g. Já as amostras 3 e 4

apresentaram enumeração considerável de coliformes termotolerantes ($3,9$ a $4,9 \times 10^2$ NMP/g), mas ainda dentro limites estabelecidos pela legislação.

No Brasil vários trabalhos têm relatado a presença de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação em amostras de queijos tipo minas frescal. No estudo de APOLINARIO et al. (2014), do total de 31 amostras de queijos minas tipo frescal analisadas, 14 amostras (54,8%) apresentaram coliformes termotolerantes superiores ao estabelecido pela legislação. No estudo de PINTO et al. (2011), foi verificado que 11 amostras (55%) do total 20 de amostras de queijos minas tipo frescal industrializados continham coliformes termotolerantes acima do permitido. E no estudo de VISOTO et al. (2011), 63,4% das amostras apresentaram coliformes termotolerantes acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g.

5.3 Determinação da presença de *Salmonella* spp.

Neste trabalho não houve detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de queijos tipo minas frescal. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que o gênero *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g da amostra.

Resultados similares foram encontrados nos estudos de PINTO et al. (2011) e VISOTTO et al. (2011), onde também não foram detectadas bactérias *Salmonella* spp. nas amostras de queijos tipo minas frescal analisadas. Segundo BRANT et al. (2007), a ausência de *Salmonella* spp. pode ser determinada pela menor capacidade de competição dessas espécies em relação aos coliformes.

Já no estudo de GRANDI & ROSSI (2006), realizado com 20 amostras de queijos tipo minas frescal, foi verificado uma amostra positiva para *Salmonella* spp., que estava imprópria para consumo. Essa contaminação pode estar relacionada à pasteurização inadequada do leite ou recontaminação pós-pasteurização (ROCHA et al., 2006).

5.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Micrococcaceae. São mesófilas, anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias. Dentre as espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, o *S. aureus* é a de maior importância clínica, no que tange

doenças estafilocócicas, sejam elas de origem alimentar ou não (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

Neste estudo, as colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram semeadas em ágar Sal Manitol a 37°C e incubadas por 48 horas. As colônias fermentadoras de manitol foram submetidas à coloração de Gram. Após a coloração de gram e recontagem das colônias, obteve-se o resultado de *Staphylococcus aureus*. Este resultado está expresso na tabela 7.

Tabela 7. Contagem de *S. aureus* em ágar Sal Manitol e após coloração de gram nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	Colônias fermentadoras de manitol, após coloração de Gram (<i>Staphylococcus aureus</i>)	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	ND	ND
Amostra 2	ND	ND
Amostra 3	4,6 x 10 ³	3,59 ± 0,25
Amostra 4	3,7 x 10 ²	2,62 ± 0,28
Amostra 5	ND	ND
Amostra 6	1,8 x 10 ²	2,50 ± 0,70
Amostra 7	ND	ND
Amostra 8	ND	ND
Amostra 9	ND	ND
Amostra 10	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de medidas em duplicata ou triplicata

DP = desvio padrão

ND = não detectado, não houve o crescimento de colônias

Para queijos de muito alta umidade (>55%), como os tipos minas frescal, elaborados por coagulação enzimática e sem ação de bactérias lácticas, a legislação brasileira (BRASIL, 2001), delimita uma tolerância de 5,0x10² UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva. No presente estudo, 30% das amostras analisadas apresentaram resultados positivos para *S. aureus*, porém apenas a amostra 3 estava imprópria para consumo, com valor de 4,6x10³ UFC/g. A bactéria

S. aureus tem como principal habitat a pele, as glândulas e membranas mucosas do homem e dos animais (KOMATSU et al., 2010). A presença desse micro-organismo no leite e em seus produtos pode sugerir a utilização de matéria-prima proveniente de animais infectados (mastite) ou uma provável contaminação por manipuladores portadores assintomáticos (LEJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009).

No estudo de APOLINARIO et al. (2014), do total 31 de amostras de queijos minas tipo frescal analisadas, 5 amostras (16,12%) apresentaram contagens de *S. aureus* superiores ao estabelecido pela legislação. No estudo de VISOTTO et al. (2011), foi verificado que 4 amostras do total 30 de amostras de queijos minas tipo frescal analisadas continham populações de estafilococos coagulase positiva acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Esse resultado é preocupante, uma vez que a intoxicação estafilocócica pode ocorrer com a ingestão de alimento contaminado com menos de 1,0 µg de toxina produzida por *Staphylococcus aureus*. Essa quantidade de toxina é produzida quando a população desse patógeno é maior ou igual a $1,0 \times 10^5$ UFC/g do alimento e em um meio com atividade de água igual ou superior a 0,86, como é o caso do queijo tipo minas frescal.

5.5 Análises moleculares

No presente estudo, algumas colônias suspeitas de serem *E. coli* provenientes das amostras de queijos minas frescal 1, 3, 4, 6 e 10 foram analisadas molecularmente, sendo que após as análises, todas as amostras foram geneticamente confirmadas como *E. coli* (Figura 2). As colônias suspeitas de serem *S. aureus* provenientes das amostras 3, 4 e 6 de queijos minas frescal foram geneticamente confirmadas em todas amostras como *S. aureus* produtora de enterotoxina C e apenas uma colônia da amostra do queijo 6 apresentou resultado negativo (Figura 3). As Tabelas 8 e 9 apresentam a identificação das colônias de *E. coli* e *S. aureus* isoladas por meio de PCR e as amostras de queijos de onde essas bactérias foram isoladas.

Tabela 8. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Escherichia coli* isoladas das amostras de queijos minas frescal comercializados em Brasília - DF.

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
SA26	4	<i>Escherichia coli</i> +
SA27	1	<i>Escherichia coli</i> +
AS28	1	<i>Escherichia coli</i> +
SA30	3	<i>Escherichia coli</i> +
SA31	3	<i>Escherichia coli</i> +
AS32	3	<i>Escherichia coli</i> +
SA34	6	<i>Escherichia coli</i> +
SA60	10	<i>Escherichia coli</i> +
CP	Controle positivo <i>E. coli</i> ATCC 29213	<i>Escherichia coli</i> +
CN	Controle negativo <i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> –

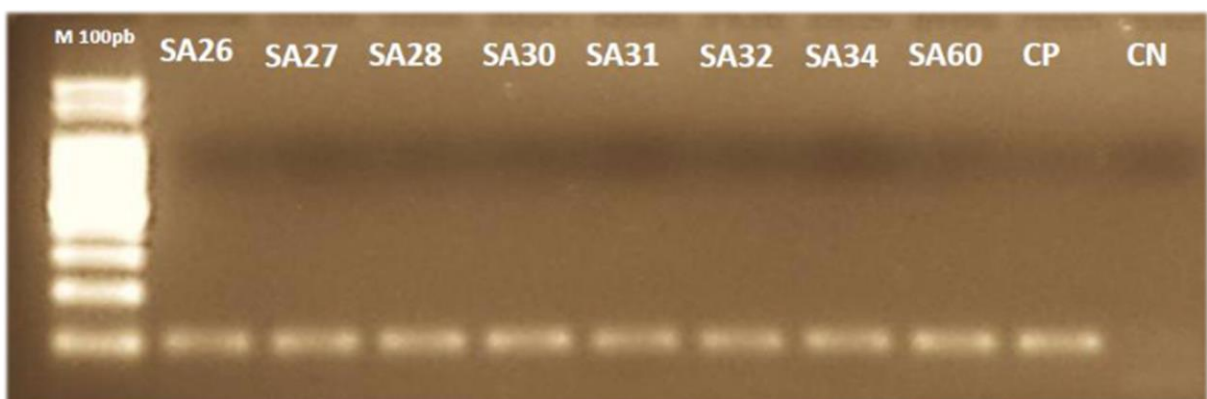


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; SA26 a SA60 = amostras deste estudo com amplicons de *EutC* (113 pb); CN = Controle Negativo; CP = Controle positivo de *E. coli*. ATCC 29213.

Tabela 9. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de queijos minas frescal comercializados em Brasília – DF.

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
SA12	3	<i>S. aureus</i> +
SA14	6	<i>S. aureus</i> +
SA15	6	<i>S. aureus</i> -
SA16	4	<i>S. aureus</i> +
SA17	4	<i>S. aureus</i> +
CP1	Controle Positivo <i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +
CP2	Controle Positivo <i>S. aureus</i> isolado em amostra vegetal	<i>S. aureus</i> +
CP3	Controle Positivo <i>S. aureus</i> isolado em amostra vegetal	<i>S. aureus</i> +
CN	Controle negativo <i>S. aureus</i> -	<i>S. aureus</i> -

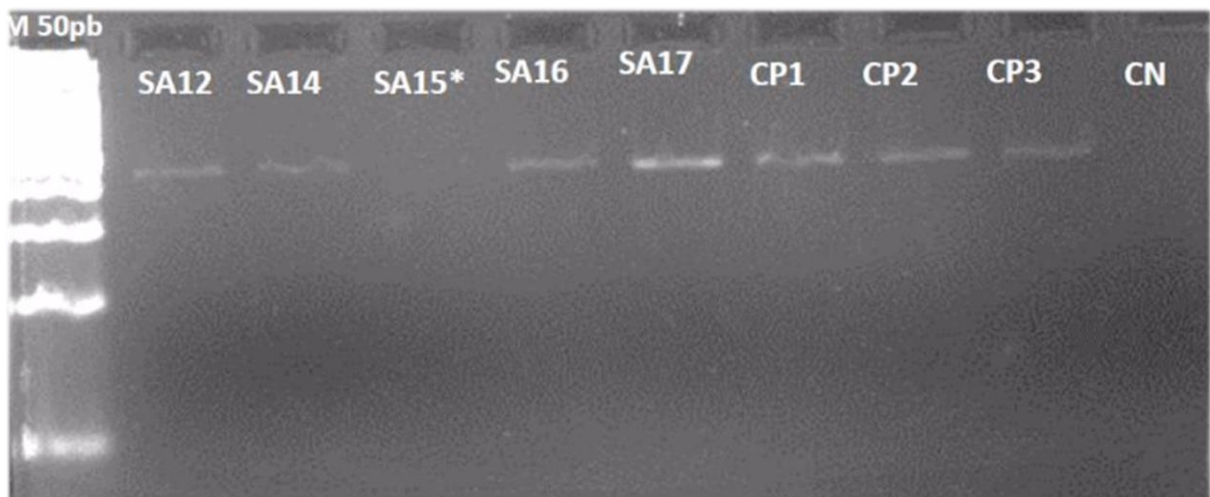


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene EntC de *S. aureus*. 50pb = marcador de 50 pb; SA12 a SA17 = amostras deste estudo com amplicons de EntC (401 pb); CN = Controle Negativo; CP = Controle positivo ATCC 33862.

A tabela a seguir apresenta todos os resultados desse estudo, a fim de classificar quais amostras apresentaram resultados impróprios, satisfatórios e aprovados com boa qualidade microbiológica para o consumo humano.

Tabela 10. Classificação de amostras de queijo minas frescal como impróprias, satisfatórias e aprovadas para consumo humano.

Amostra	Micro-organismos encontrados em quantidade significativa	Micro-organismos encontrados acima do limite permitido na legislação	Resultados
1	Coliformes totais	Coliformes termotolerantes	I
2	-----	-----	A
3	Coliformes totais e termotolerantes	<i>S. aureus</i>	I
4	Coliformes totais e termotolerantes/ <i>S. aureus</i> / Bactérias psicotróficas	-----	S
5	Bactérias mesófilas e psicotróficas	-----	S
6	<i>S. aureus</i> / Bactérias mesófilas e psicotróficas/ Coliformes totais	-----	S
7	-----	-----	A
8	-----	-----	A
9	Bactérias mesófilas e psicotróficas	-----	S
10	Bactérias psicotróficas	-----	S

I = Imprópria para consumo; S = Satisfatória para consumo; A = Aprovada para consumo.

Das dez amostras analisadas neste estudo, duas amostras estavam impróprias para o consumo humano, cinco amostras foram consideradas

satisfatórias para o consumo, pois apresentaram quantidade considerável de bactérias mesófilas ou psicrotróficas ou coliformes totais e/ou *S. aureus*, e somente três amostras foram consideradas aprovadas para o consumo com boa qualidade microbiológica.

6. CONCLUSÕES

Nessa pesquisa foi possível avaliar a qualidade microbiológica de diferentes marcas de queijos tipo minas frescal comercializados em Brasília – DF. De acordo com os resultados obtidos, das 10 amostras de queijo minas frescal analisadas, apenas três amostras (30%) encontravam-se em boas condições microbiológicas para consumo humano. Assim, 70% das amostras apresentaram quantidades elevadas de bactérias, dentre elas, duas amostras (20%) estavam impróprias para o consumo por excesso de coliformes termotolerantes na amostra 1 e pelo excesso de bactérias *S. aureus* na amostra 3.

A presença de bactérias *S. aureus* em três amostras indicou condições higiênicas inadequadas desses queijos, mostrando que esses alimentos quando manipulados sem condições adequadas de higiene ou quando a matéria prima é adquirida de um gado com mastite, ocorre a contaminação com bactérias *S. aureus*. Além disso, a PCR indicou que essas cepas eram produtoras de enterotoxina C, ou seja, toxina estafilocócica passível de causar intoxicação alimentar.

A presença de coliformes termotolerantes e de bactérias *E. coli* em 50% das amostras também indicou deficiência na qualidade higiênico-sanitária, já que essa bactéria é proveniente de contaminação fecal.

O queijo minas frescal, por ser um alimento amplamente consumido pela população brasileira, deveria apresentar melhores condições higiênicas, exigindo, para isso, um maior controle microbiológico e aplicação das Boas Práticas de Fabricação no processo de fabricação do produto, e ainda, higiene de excelência dos manipuladores e dos utensílios e equipamentos utilizados.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. 2011.** Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_ler.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros. 2014.** Disponível em: <http://www.abiq.com.br/imprensa/namidia/Valor%20Economico%20%20Fabio%20Scarcelli%20%20Mercado%20de%20queijos%20cresce%20no%20pa%C3%ADs%20e%20atrai%20estrangeiros.pdf>>.

ANDRADE, R. B. et al. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *Campylobacter sp.*, *Salmonella sp.* e *Listeria monocytogenes*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.741-750, 2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

APHA – American Public Health Association. Committee on Microbiological for Foods. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4.ed. Washington: American Public Health Association, 676p, 2001.

APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BILLE, J. et al. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.91-93, 2006.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C.; MACHADO, T. F. **Salmonelose associada ao consumo de leite e produtos lácteos**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010. 26 p.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão, **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1 570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aditivos no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal**. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 5 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S.; MAZON, E. M. A.; PISANI, B.; PRANDI, M. A. G.; PASSOS, M. H. C. R. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 177-85, 2004.

CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

CARRIQUE-MAS, J.J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese - an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, v.130, n.1, p.79-86, 2003.

DOORDUYN, Y.; HOFHUIS, A.; JAGER, C. M. de; van der ZWALUW, W. K.; NOTERMANS, D. W.; van PELT, W. *Salmonella* Typhimurium outbreaks in the netherlands in 2008. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 44, p. 1-3, 2008.

FAGUNDES H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul-ago, 2004.

FENG, P; WEAGENT, SD; GRANT, MA. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005213953/unrestricted/etd.pdf.

FERREIRA, R. M. et al. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 5, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel' Austria and Germany 2009. **Euro Surveillance**, v.15, n.5, p.1-2, 2010.

GANDRA, E. A., GANDRA, T. K. V., MELLO, W. S., GODOI, H. S. G. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia-MG**. In: ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6, 2006, Uberlândia-MG. *Anais*. Uberlândia, 2006.

ICMSF – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002.

INMETRO. **Queijo Tipo Minas Frescal e Padrão**. SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda, São Paulo, 2006. Disponível em: http://infoconsumo.gov.br/consumidor/produtos/queijo_Minas.asp#nor.

INPPAZ/OPS/OMS. Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis / Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Epidemiológica. **Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]**. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>.

KOMATSU R. S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

LAMAITA, H. C. Contagem de *Staphylococcus sp.* e detecção de enterotoxinas estafilocócica e toxina da síndrome do choque em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized milk: a continued public health threat. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, n. 1, p. 93–100, 2009.

MAKINO, S.I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, n.2, p.189-196, 2005.

MENDONÇA, J. F. M. **Detecção de células viáveis de *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real**. Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>

PASTORE, R.; SCHMID, H.; ALTPETER, E.; BAUMGARTNER, A.; HÄCHLER, H.; IMHOF, R.; SUDRE, P.; BOUBAKER, K. Outbreak of *salmonella* serovar Stanley infections in switzerland linked to locally produced soft cheese, september 2006 – february 2007. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 37, p. 1-6, 2008.

PERRY, K. S. P., Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINTO, F. G. S. et al., Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

QUINTANA R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos – GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p. 205-211, 2007.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijos minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38-46, 2010.

SCHEIDEGGER, E. M. D. **Identificação de espécies de *Enterococcus* isoladas de queijo tipo minas frescal através da análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição de parte do gene 16s rRNA amplificado pela PCR**. Tese (Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2009.

SILVA, M. A.; MARVULO, M. F. V.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 573-580, 2010.

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 50 p. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/11884/2/00076200.pdf>.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 3ª Ed. São Paulo: Logomarca Varela, 2001. 105 p.

TAMARAPU, Sudhir; MCKILLIP, John L.; DRAKE, Maryanne. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection®**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

VASCONCELOS, R. M.; MARIN, V. A. *Listeria monocytogenes* em Queijo Minas Frescal e Critérios para a Avaliação de Risco. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 15 n. 2, p. 32-45, 2008.

VIEIRA, K. P. et al., Contaminação do queijo minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **Conscientiae Saúde**, v. 7, n. 2, p. 201-206, 2008.

VISOTTO, R. G.; OLIVEIRA, M. A.; PRADO, S. P. T.; BERGAMINI, A. M. M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727 - 736, 1997.

ZOCHE F., SILVA, W. P. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara v. 23, n. 2, p. 187-193, 2012.

ANEXOS

Anexo 1. Genoma completo de *Escherichia coli*.

Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome

GenBank: CP015138.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

```

LOCUS       CP015138             388 bp    DNA     linear   BCT 08-APR-2016
DEFINITION  Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome.
ACCESSION   CP015138 REGION: 3347690..3347997
VERSION     CP015138.1  GI:1016298593
DBLINK      BioProject: PRJNA316786
             BioSample: SAMN04621897
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
  ORGANISM  Escherichia coli
             Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
             Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 388)
  AUTHORS   Stoesser,N., Sheppard,A., Peirano,G., Sebra,R., Lynch,T., Anson,L.,
             Kasarskis,A., Motyl,M., Kazmierczak,K., Crook,D. and Pitout,J.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (07-APR-2016) Department of Microbiology (Research), John
             Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headley Way, Oxford OX3
             9DU, United Kingdom
COMMENT     Bacteria available from Johann Pitout, University of Calgary
             Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada, or Nicole Stoesser,
             Department of Microbiology, John Radcliffe Hospital, Headley Way,
             Oxford, UK.
             Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
             Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be
             found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method      :: HGAP v. 2.2.0
Genome Coverage      :: 1x
Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider   :: NCBI
Annotation Date       :: 04/08/2016 11:05:46
Annotation Pipeline   :: NCBI Prokaryotic Genome
                       Annotation Pipeline
Annotation Method     :: Best-placed reference protein
                       set; GeneMarkS+
Annotation Software revision :: 3.1
Features Annotated    :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
                       repeat_region
Genes (total)         :: 5,476
CDS (total)           :: 5,363

    Genes (coding)    :: 5,243
    CDS (coding)      :: 5,243
    Genes (RNA)       :: 113
    rRNAs             :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
    complete rRNAs    :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
    tRNAs             :: 86
    ncRNAs            :: 5
    Pseudo Genes (total) :: 120
    Pseudo Genes (ambiguous residues) :: 0 of 120
    Pseudo Genes (frameshifted) :: 52 of 120
    Pseudo Genes (incomplete) :: 63 of 120
    Pseudo Genes (internal stop) :: 19 of 120
    Pseudo Genes (multiple problems) :: 12 of 120
##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..388
                       /organism="Escherichia coli"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /strain="Ecol_732"
                       /host="Homo sapiens"
                       /db_xref="taxon:562"
                       /country="Thailand: Bangkok"
                       /lat_lon="13.76 N 100.50 E"
                       /collection_date="2012"
                       /collected_by="Merck Study for Monitoring of Antimicrobial
                       Resistance Trends (SMART)"
     gene              <1..>388
                       /locus_tag="A4X18_16425"
     CDS               <1..>388

```

```

/locus_tag="A4X18_16425"
/inference="EXISTENCE: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_080769998.1"
/note="with EutC catalyzes the formation of acetaldehyde
and ammonia from ethanolamine; Derived by automated
computational analysis using gene prediction method:
Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ethanolamine ammonia-lyase"
/protein_id="AMX14968.1"
/db_xref="GI:1816381681"
/translation="MKLKTTLFGNVYQFKDVKEVLAKANELRSGDVLGVAASSQER
VAAKQVLEMTVADIRNMPVIAYEDDCVTRLIQDOVNETAYNQIKNWSISELREYVLS
DETSVDDIAFTRKGLTSEVVAQVAKICSNADLIYGAKMPVIKANTTIGIPGTF SAR
LQPNDRDDVQSIAAQIYEGLSFGVGDVIGVNPVTDVENVLSRVLDTIYGVIDKFN
PTQGCILAHVTTQIEAIRRGAPGGLIFQSIGSEKGLKEFGVELAMLDEARAVGAEFN
RLAGENCLYFETGQSSALSAGANFGADQVTHEARNYGLARHYDFFIVNTVVGFIGPEY
LYNDRQIIRAGLEDHFMGKLSGISMGDCCCYTNHADADQNLNENLMILLATAGCNVIM
GHPLGDDIMLVQTTAFHDTATVRQLLNLRPSPEFERINLESIMGIHANGRLTKRAGDPS
LFF"
ORIGIN
    1 tatctctaca acgaccgcca gattatccgc gcaggcttag aagatcactt tatgggcaaa
    61 ctgagcggca tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca accacgctga cgctgaccag
    121 aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc gccaccgca gctgcaacta catcatgggg
    181 atgccgctgg gcgatgacat catgctcaac tatcagacca ccgattcca cgacactgcc
    241 actgtgcgct agttactgaa tctgcgcccg tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaaagc
    301 atgggcat
//

```

Anexo 2. Sequência de Primer para E. coli.

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
WARNING: Numbers in input sequence were deleted.			
< Back			
Pair 1:			
<input checked="" type="checkbox"/> Left Primer 1:	Primer_F		
Sequence:	tctatgggctgtgactgctg		
Start: 73	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input checked="" type="checkbox"/> Right Primer 1:	Primer_R		
Sequence:	ggc atccc atgatgtagtt		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 113 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	tatctctaca	acgaccgcca	gattatccgc gcaggcttag aagatcactt
51	tatgggcaaa	ctgagcggca	tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca
101	accacgctga	cgctgaccag	aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc
151	gccaccgca	gctgcaacta	catcatgggg atgccgctgg gcgatgacat
201	catgctcaac	tatcagacca	ccgattcca cgacactgcc actgtgcgctc
251	agttactgaa	tctgcgcccg	tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaaagc
301	atgggcat		
<input type="checkbox"/>	Select all Primers		

Anexo 3. Genoma completo de *S. aureus* precursor da enterotoxina C3.

Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C variant v4 (sec) gene, complete cds

GenBank: KX168615.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS       KX168615                801 bp    DNA     linear   BCT 08-JUN-2016
DEFINITION   Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C
              variant v4 (sec) gene, complete cds.
ACCESSION   KX168615
VERSION     KX168615.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Staphylococcus aureus
  ORGANISM  Staphylococcus aureus
            Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;
            Staphylococcus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 801)
  AUTHORS   Jöhler,S., Sihto,H.M., Macori,G. and Stephan,R.
  TITLE     Sequence Variability in Staphylococcal Enterotoxin Genes seb, sec,
            and sed
  JOURNAL   Toxins (Basel) 8 (6) (2016)
  PUBMED   27258311
  REMARK    Publication Status: Online-Only
REFERENCE   2 (bases 1 to 801)
  AUTHORS   Jöhler,S., Sihto,H.-M., Macori,G. and Stephan,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-MAY-2016) Institute for Food Safety and Hygiene,
            University of Zurich, Winterthurenstrasse 272, Zurich, Zurich 8057,
            Switzerland
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..801
                     /organism="Staphylococcus aureus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="SAI48"
                     /isolation_source="human (infection)"
                     /db_xref="taxon:12208"
                     /country="Switzerland"
                     /collection_date="2010"
     gene             1..801
                     /gene="sec"
     CDS              1..801
                     /gene="sec"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="staphylococcal enterotoxin C variant v4"
                     /protein_id="AN116442.1"
                     /translation="MNKSRFISCVILIFALILVLFIPNVLAE SQDPTDELHKSSEF
            TGTMGNMKYLVDHYVSATKVMVDKFLAHDLIYNISOKKLNKYDKVKTELLNEDLAK
            KYKDEVVDVYGSNYYVNCYFSSKDNVGVKVTGGKTCMYGGITKHEGNHFPONGNLQNVLI
            RVYENKRNITISFEVQTDKKSVAQELDIKARNFLINKNLYEFNSSPYETGYIKPIEN
            NGNTFWYDMMHPAPGDKFDQSKYLMHYNDKNTVDSKSVKIEVHLTTKNG"
ORIGIN
1 atgaataaga gtcgatttat ttcatgcgta attttgatat tcgcacttat actagttcctt
61 ttacaccca acgtatttagc agagagccaa ccagacccta cgccagatga gttgcacaaa
121 tcaagtgagt ttactggtac gatgggtaat atgaaatatt tatatgatga tcattatgta
181 tcagcaacta aagttatgtc ttagataaaa tttttggcac atgatttaat ttataacatt
241 agtgataaaa aactaaaaaa ttatgacaaa gtgaaaacag agttattaaa tgaagatta
301 gcaaaagaagt acaaaagatga agtagttgat gtgtatggat caaattacta tgtaaaactgc
361 ttttttcat ccaaagataa ttagtgataa gttacagggt gtaaaaactg tatgtatgga
421 ggaataacaa aacatgaagg aaaccacttt gataatggga acttaacaaa tgtacttata
481 agagtttatg aaaaataaag aaacacaatt tcttttgaag tgcaaaactga taagaaaagt
541 gtaacagctc aagaactaga cataaaaagct aggaattttt taattaataa aaaaaattg
601 tatgagttha acagttcacc atatgaaaca ggatatataa aatttattga aaataacggc
661 aatacttttt ggtatgatat gatgcctgca ccaggcgata agtttgacca atcctaatat
721 ttaatgatgt acaacgacaa taaaacagtt gattctaaaa gtgtgaagat agaagtccac
781 cttacaacaa agaatggata a

```

//

Anexo 4. Sequência de Primer para *S. aureus*.

Primer3Plus

[Primer3Manager](#) [Help](#)
[About](#) [Source Code](#)

pick primers from a DNA sequence

Unrecognized base in input sequence

[< Back](#)

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 60 Length: 24 bp Tm: 60.0 °C GC: 37.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 401 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

[Send to Primer3Manager](#)
[Reset Form](#)

1	atgaataaga	gtcgatttat	ttcatgcgta	atdddgatat	tgcacttat
51	actagttcct	tttacaccca	acgtattagc	agagagccaa	ccagacccta
101	cgccagatga	gttgacacaaa	tcaagtgagt	ttaactggta	gatgggtaat
151	atgaaatatt	tatatgatga	tcattatgta	tcagcaacta	aagttatgtc
201	tgtagataaa	tttttggcac	atgatttaat	ttataacatt	agtgataaaa
251	aactaaaaaa	ttatgacaaa	gtgaaaacag	agttattaaa	tgaagattta
301	gcaaagaagt	acaaagatga	agtagttgat	gtgtatggat	caaattacta
351	tgtaaaactgc	tatttttcat	ccaaagataa	tgtaggtaaa	gttacaggtg
401	gtaaaacttg	tatgtatgga	ggaataacaa	aacatgaagg	aaaccacttt
451	gataatggga	acttacaaaa	tgtacttata	agagtttatg	aaaataaaaag
501	aaacacaatt	tcttttgaag	tgcaaactga	taagaaaagt	gtaacagctc
551	aagaactaga	cataaaaagct	aggaattttt	taattaataa	aaaaaatttg
601	tatgagttta	acagttcacc	atatgaaaca	ggatatataa	aatttattga
651	aaataacggc	aatacttttt	ggtatgatat	gatgcotgca	ccaggcgata
701	agtttgacca	atctaaatat	ttaatgatgt	acaacgacaa	taaaacagtt
751	gattctaaaa	gtgtgaagat	agaagtccac	cttacaacaa	agaatggata
801	a//				

Select all Primers