



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

NAIARA SANTOS AMORIM LESSA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS DE
FABRICAÇÃO INFORMAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES
DO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, DF

2018

NAIARA SANTOS AMORIM LESSA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS DE
FABRICAÇÃO INFORMAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES
DO DISTRITO FEDERAL**

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

2018

NAIARA SANTOS AMORIM LESSA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS FRESCAIS DE
FABRICAÇÃO INFORMAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES
DO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Ms. Daniel Oliveira Freire
(Facudade LS/ Brasília)

BRASÍLIA, DF

2018

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por ter preparado a oportunidade de está concluindo essa etapa da minha vida e pela força que Ele tem me dado guiando os meus passos até chegar aqui.

Aos meus pais, Lázaro e Nair, que tiveram inteira confiança que eu conseguiria alcançar meus objetivos, mesmo com muitas dificuldades. Aos meus irmãos, Josias, Priscila e Saulo, que, mesmo de longe contribuíram no sucesso da minha vida acadêmica.

Ao meu esposo, Ualisson, que acompanhou de perto a minha trajetória nesses anos, e com todo seu amor e dedicação, esteve sempre me dando apoio na realização do meu sonho. Pelos conselhos e um sorriso que acalma meu coração mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do meu curso, em especial Danielly Rocha Nery, que me ajudou nos estudos e sempre me surpreendeu e alegrou com sua amizade verdadeira.

Aos docentes da Faculdade de Ceilândia que compartilharam um ensino valioso, que levarei pra toda vida profissional.

À orientadora deste trabalho, Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi, agradeço pelo incentivo e dedicação, pelos conhecimentos fornecidos a mim e pela compreensão das minhas limitações e a co-orientadora Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva agradeço pela ajuda para fazer todas as PCRs do meu trabalho.

Enfim, a todos que estiveram ao meu lado nessa caminhada, o meu sincero obrigada!

RESUMO

O queijo minas frescal é um produto tipicamente brasileiro, sendo muito consumido no país por se tratar de um produto de baixo custo e grande oferta no mercado. Este estudo avaliou a qualidade microbiológica de cinco amostras de queijos minas frescais de fabricação informal comercializados em uma feira permanente do Distrito Federal. As análises realizadas foram: determinação de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Salmonella* spp. e identificação molecular de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* por técnica de PCR. Os resultados revelaram que das cinco amostras analisadas quatro amostras estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira. Coliformes termotolerantes foram encontrados em todas as amostras, com númenos superiores ao permitido na legislação brasileira ($\geq 2,69 \log \text{NMP/g}$) em duas amostras (amostras 2 e 3). Após análise molecular, *E. coli* foi identificada nas cinco amostras analisadas. A amostra 2 que estava imprópria para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes, também apresentou *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente). *S. aureus* foi encontrada em quatro das cinco amostras analisadas, com populações superiores ao permitido na legislação brasileira ($\geq 2,69 \log \text{UFC/g}$) em três amostras (amostras 3, 4 e 5). E a região gênica *Nuc* identificada através de PCR indicou que as bactérias *S. aureus* provenientes dessas amostras eram produtoras de enterotoxinas. Estes resultados mostraram que os queijos minas frescais de fabricação informal expostos para o consumo nessa feira permanente do DF podem ser um veículo para a transmissão de bactérias patogênicas e indicaram a necessidade de melhorar a qualidade na cadeia de produção para garantir a vida útil e a segurança microbiológica desses produtos.

Palavras-chave: queijo fresco, análises microbiológicas, análises moleculares, PCR.

ABSTRACT

The minas fresh cheese is a typical Brazilian product; it is much consumed in the country because it is low cost and has great offer in the market. This study evaluated the microbiological quality of five minas fresh cheeses samples marketed at a permanent fair in the Federal District. The analyzes performed were: determination of thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, search for *Salmonella* spp. and molecular identification of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* by PCR technique. The results revealed that of the five samples analyzed, four samples were unfit for consumption according to Brazilian legislation. Thermotolerant coliforms were found in all samples, with populations higher than allowed by Brazilian legislation (≥ 2.69 log MPN/g) in two samples (samples 2 and 3). After molecular analysis, *E. coli* was identified in the five samples analyzed. Sample 2 that was unfit for consumption by excess thermotolerant coliforms also showed *Salmonella* spp. (genetically confirmed). *S. aureus* was found in four of the five samples analyzed, with populations higher than allowed by Brazilian legislation (≥ 2.69 log CFU/g) in three samples (samples 3, 4 and 5). And the gene *Nuc* region identified by PCR indicated that the *S. aureus* bacteria from these samples were enterotoxin producers. These results showed that the artisanal minas fresh cheeses exposed to consumption at this permanent Federal District fair can be a vehicle for the transmission of pathogenic bacteria and indicated the need to improve the quality in the production chain to guarantee the shelf life and microbiological safety of these products.

Keywords: fresh cheese, microbiological analyzes, molecular analyzes, PCR.

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. As feiras permanentes do Distrito Federal.....	8
1.2. Produção e qualidade do queijo minas frescal.....	8
1.3. Contaminação microbiológica de queijos tipo minas frescal.....	10
1.4. Surtos de doenças transmitidas por alimentos.....	13
1.5. Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
3. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	17
4. CONCLUSÃO.....	27
5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes <i>Nuc</i>, <i>invA</i> e <i>MalB</i>.....	23
Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de queijos minas frescais artesanais.....	24
Tabela 3 - Análises moleculares das amostras de queijos minas frescais artesanais..	26

1. INTRODUÇÃO

1.1. As feiras permanentes do Distrito Federal

Como feiras populares destacam-se no DF, segundo a Lei Nº 4.748 de 02 de fevereiro de 2012, as feiras permanentes, *onde se “realizam atividades mercantis de caráter constante realizada em logradouro público destinado para esse fim, com instalações comerciais fixas e edificadas para comercialização dos produtos referidos para as feiras livres e produtos de bazar e agropecuários, refeições típicas regionais, jornais, revistas, além de prestação de pequenos serviços, na forma do regulamento”* (FEDERAL, 2012).

O DF é formado por 31 regiões administrativas. Brasília foi concebida como Plano Piloto, formada pelas Asa Sul e Asa Norte e o Eixo Central e localidades periféricas onde estão as demais regiões administrativas, historicamente denominadas de “Cidades Satélites” localizadas entre 6 e 60 km do Plano Piloto, sendo elas: Brazlândia, Candangolândia, Ceilândia, Cruzeiro, Gama, Guará, Lago Norte, Lago Sul, Núcleo Bandeirante, Paranoá, Planaltina, Recanto das Emas, Riacho Fundo I e II, Samambaia Santa Maria, São Sebastião Sobradinho, Taguatinga (MADEIRA, 2007).

As “Feiras Permanentes” existem somente fora do Plano Piloto e dos Lagos Sul e Norte, sendo identificadas atualmente 36 feiras em funcionamento, como as feiras do Núcleo Bandeirantes (a mais antiga, criada em 1959), a Feira do Cruzeiro (1962), a Feira Central de Ceilândia (1967) e a Feira do Guará (1969). Estas não são itinerantes e se constituíram com a realização do comércio e manifestações culturais variadas. A infraestrutura dessas feiras é bem diversa. Em geral, são construções de alvenaria com espaços caracterizados para a venda de produtos alimentícios frescos como queijos, verduras, frutas, carnes e temperos, entre outros itens (MADEIRA, 2007).

1.2. Produção e qualidade do queijo minas frescal

Devido a seu alto teor de umidade e por ser manipulado, o queijo minas frescal apresenta condições propícias à contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, podendo estas bactérias ser patogênicas e causar intoxicações e/ou

infecções alimentares nos seres humanos (MIRANDA et al., 2016). 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).

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 esteja isento de microrganismos contaminantes, deve-se iniciar o processo de produção do queijo pela pasteurização adequada do leite, processo térmico que tem como objetivo destruir os patógenos e reduzir o número de microrganismos em geral (SILVA, 2005; PERRY, 2004, VIEIRA et al., 2008).

Segundo VIEIRA et al. (2008), quando o número de bactérias deteriorativas ou patogênicas iniciais do leite é elevada, a pasteurização não é suficiente para a destruição da maioria desses microrganismos. 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 ou informal 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).

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 microrganismos 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.

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).

Assim, as condições higiênico-sanitárias e vida útil do queijo minas frescal dependem de vários aspectos entre eles: ausência de um número elevado de microrganismos no leite *in natura*, pasteurização correta do leite, condições adequadas de fabricação e manutenção da refrigeração ao longo da cadeia produtiva. Tais condições diminuem o risco de o queijo ser um potencial veículo de transmissão de microrganismos patogênicos e conseqüentemente causar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) pelo seu consumo (LISITA 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).

Segundo Resende (2010), os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado problemas relacionados à qualidade microbiológica. As falhas na aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas são alguns dos fatores que comprometem a qualidade dos queijos artesanais.

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* spp. 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* spp. causa infecção alimentar a partir da ingestão de bactérias vivas presentes nos alimentos. *Salmonella* spp. 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. O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, mas 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). As prováveis fontes de contaminação por esta bactéria são águas contaminadas com fezes ou até mesmo o contato com animais silvestres infectados. *Salmonella* spp. tem como principal habitat o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As bactérias *S. aureus* 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 e membranas mucosas do homem e dos animais (KOMATSU et al., 2010). A presença desse microrganismo 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 ocorrência 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).

A legislação brasileira (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 UFC/g e *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g 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).

1.4. 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 doenças transmitidas por alimentos (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 doenças transmitidas por alimentos 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). 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 entérica*, causados pelo consumo de queijos (PASTORE et al., 2008). Em 2008, houve três surtos de salmonelose na Holanda e envolveram 152 consumidores (DOORDUYN et al., 2008).

Após a *Salmonella* spp., 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 microrganismos 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 (vomito 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. Biologia molecular na identificação de microrganismos 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 *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 microrganismos 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

Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos minas frescos de fabricação informal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.

2.2. Objetivos específicos

- Foram realizadas as análises bacteriológicas: determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Foi realizada genotipagem através da técnica de PCR para confirmação dos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp.

**3. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA
REVISTA HIGIENE ALIMENTAR**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS MINAS
FRESCAIS ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL**

Naiara Santos Amorim Lessa, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Daniela Castilho Orsi

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de
Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

danielacastilhoorsi@gmail.com

RESUMO

O queijo minas frescal é um produto tipicamente brasileiro, sendo muito consumido no país por se tratar de um produto de baixo custo e grande oferta no mercado. Este estudo avaliou a qualidade microbiológica de cinco amostras de queijos minas frescais artesanais comercializados em uma feira permanente do Distrito Federal. As análises realizadas foram: determinação de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus*, pesquisa de *Salmonella* spp. e identificação molecular de *E. coli*, *Salmonella* spp. e *S. aureus* por técnica de PCR. Os resultados revelaram que das cinco amostras analisadas quatro amostras estavam impróprias para o consumo de acordo com a legislação brasileira. Coliformes termotolerantes foram encontrados em todas as amostras, com populações superiores a 2,69 log NMP/g em duas amostras (amostras 2 e 3). Após análise molecular, *E. coli* foi identificada nas cinco amostras analisadas. A amostra 2 que estava imprópria para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes, também apresentou *Salmonella* spp. (confirmada geneticamente). *S. aureus* foi encontrada em quatro das cinco amostras analisadas, com populações superiores a 2,69 log UFC/g em três amostras (amostras 3, 4 e 5). Estes resultados mostraram que os queijos minas frescais artesanais expostos ao consumo nessa feira permanente do DF podem ser um veículo para a transmissão de bactérias patogênicas e indicaram a necessidade de melhorar a qualidade na cadeia de produção para garantir a vida útil e a segurança microbiológica desses produtos.

Palavras-chave: queijo fresco, análises microbiológicas, análises moleculares, PCR.

ABSTRACT

The minas fresh cheese is a typical Brazilian product; it is much consumed in the country because it is low cost and has great offer in the market. This study evaluated the microbiological quality of five minas fresh cheeses samples marketed at a permanent fair in the Federal District. The analyzes performed were: determination of thermotolerant coliforms, *Staphylococcus aureus* count, search for *Salmonella* spp. and molecular identification of *E. coli*, *Salmonella* spp. and *S. aureus* by PCR technique. The results revealed that of the five samples analyzed, four samples were unfit for consumption according to Brazilian legislation. Thermotolerant coliforms were found in all samples, with populations greater than 2.69 log MPN/g in two samples (samples 2 and 3). After molecular analysis, *E. coli* was identified in the five samples analyzed. Sample 2 that was unfit for consumption by excess thermotolerant coliforms also showed *Salmonella* spp. (genetically confirmed). *S. aureus* was found in four of the five samples analyzed, with populations greater than 2.69 log CFU/g in three samples (samples 3, 4 and 5). These results showed that the artisanal minas fresh cheeses exposed to consumption at this permanent Federal District fair can be a vehicle for the transmission of pathogenic bacteria and indicated the need to improve the quality in the production chain to guarantee the shelf life and microbiological safety of these products.

Keywords: fresh cheese, microbiological analyzes, molecular analyzes, PCR.

INTRODUÇÃO

O queijo minas frescal é um produto tipicamente brasileiro, sendo muito consumido no país por se tratar de um produto de baixo custo e grande oferta no mercado (PASSOS et al., 2009). 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 pela ação de bactérias lácticas específicas. Apresenta massa crua coalhada, dessorada, salgada e não maturada, coloração esbranquiçada e consistência mole (BRASIL, 2004; BRASIL, 1997).

O queijo minas frescal deve ser produzido a partir de leite tratado termicamente. A legislação brasileira não permite a comercialização de queijos minas frescal produzidos com leite cru, pois estes não passam por nenhum tipo de processo de maturação (BRASIL, 2004; BRASIL, 1997). O queijo minas frescal tem pouca acidez e pelo fato de não ser maturado e ter alta umidade (>55%) deve ser armazenado em temperatura correta de refrigeração (não superior a 8°C) e apresenta curta vida de prateleira (em média de 15 dias) (BRASIL, 1997; SANGALETTI et al., 2009; VISOTTO et al., 2011).

O queijo minas frescal industrializado é elaborado a partir de leite pasteurizado, em indústria de laticínio, acompanhada pelo selo do serviço de inspeção federal (BRASIL, 1996). Porém também existem os queijos artesanais, de fabricação caseira, que não passam por controle de qualidade, não são inspecionados e comumente são comercializados em feiras, apresentando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante sua produção e conservação. Esses queijos vendidos informalmente não possuem características que estabelecem padrões mínimos de segurança alimentar, como: data de validade e fabricação, descrição da origem do produto e selos de inspeção. Em feiras é comum esses queijos serem expostos em prateleiras sem nenhum tipo de refrigeração (KOMATSU et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; SILVA, 2015; VISOTTO et al., 2011).

Devido a seu alto teor de umidade e por ser manipulado, o queijo minas frescal apresenta condições propícias à contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, podendo estas bactérias ser patogênicas e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (KOMATSU et al., 2010; VISOTTO et al.,

2011). Dessa forma, bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. podem estar presentes nos queijos minas frescal de má qualidade (BARANCELLI et al., 2011; FERREIRA et al., 2011; PINTO et al., 2011; SANTOS, HOFFMANN, 2010).

Os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado problemas relacionados à qualidade microbiológica. As falhas na aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas são alguns dos fatores que comprometem a qualidade desses queijos (KOMATSU et al., 2010; FERREIRA et al., 2011; SILVA, 2015; VISOTTO et al., 2011). Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos minas frescais artesanais comercializados no Distrito Federal.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas

Para as análises foram coletadas cinco amostras dos queijos minas frescal artesanais em uma feira permanente do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas da cada embalagem e os resultados foram expressos como média. Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (acima de 10^{-3}).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes, as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durhan. Alíquotas dos tubos positivos no teste

presuntivo foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo *Escherichia coli* para a confirmação de coliformes termotolerantes. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em NMP/g. Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, cada uma das diluições das amostras foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Sal Manitol. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10⁻¹ das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, pipetou-se 1 ml das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo selenito cistina ou tetrionato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semearam-se placas de Petri contendo o meio de cultivo Agar Salmonella Shigella (SS) ou Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). Os tubos de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* foram submetidos à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Análises moleculares

As bactérias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *E. coli* foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi selecionada a região gênica *Nuc* com o fragmento de 105 pares de base para identificar *S. aureus*. Para a identificação de *Salmonella* spp. foi utilizado o fragmento de 445 pares de base referente ao gene *invA*. E para a identificação de *E. coli* foi utilizado o fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. Os primers construídos para este estudo estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados na PCR para identificação dos genes *Nuc*, *invA* e *MalB*

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>Nuc</i> foward	TGTTTGTGATGCATTTGCTG		
<i>Nuc</i> reverse	AAAGGGCAATACGCAAAGAG	105 pb	<i>S. aureus</i>
<i>invA</i> foward	GCTGATGCCGGTGAAATTAT		
<i>invA</i> reverse	CGACAAGACCATCACCAATG	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>MalB</i> foward	TCTATGGGCTGTGACTGCTG		
<i>MalB</i> reverse	GGCATCCCCATGATGTAGTT	113 pb	<i>E. coli</i>

As colônias isoladas suspeitas de serem *S. aureus*, *Salmonella* spp. ou *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. 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®). 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 50°C por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos foward 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 da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 2 apresenta os resultados das análises microbiológicas das amostras de queijos minas frescais artesanais realizadas neste estudo. Para queijos frescos, a legislação brasileira (BRASIL, 2001), estabelece o limite máximo de 2,69 log NMP/g para coliformes termotolerantes, 2,69 UFC/g para *Staphylococcus aureus* e ausência do gênero *Salmonella* spp. em 25 g da amostra. No presente estudo somente a amostra 1 estava própria para o consumo, apresentando baixa quantidade de coliformes termotolerantes, ausência de *Salmonella* e de *S. aureus*.

As outras 4 amostras deste estudo estavam impróprias para o consumo. As amostras de queijos 2 e 3 apresentaram 3,04 NMP/g de coliformes termotolerantes. A amostra 2 além do excesso de coliformes termotolerantes, também apresentou *Salmonella* spp. E a amostra 3 além do excesso de coliformes termotolerantes, também apresentou excesso de bactérias *S. aureus*. E as amostras de queijos 4 e 5 apresentaram contagens de *S. aureus* bem acima do permitido pela legislação brasileira (3,64-3,94 log UFC/g).

Tabela 2 - Análises microbiológicas das amostras de queijos minas frescais artesanais

Amostras	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)
1	0,53 ± 0,52	Ausência	ND
2	3,04 ± 0,00	Presença	2,00 ± 1,73
3	3,04 ± 0,00	Ausência	3,94 ± 0,15
4	1,62 ± 0,25	Ausência	3,94 ± 0,17
5	1,69 ± 0,87	Ausência	3,64 ± 0,15

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições, ND = não detectado.

Essas análises mostraram que todas as amostras estavam contaminadas por coliformes termotolerantes. Populações elevadas de coliformes termotolerantes no

produto final sugerem que o queijo pode ter sido produzido com matéria prima de má qualidade ou que houve falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do mesmo (LISITA et al, 2009).

SALOTTI et al. (2006), analisaram 30 amostras de queijos minas frescais produzidos artesanalmente e 30 amostras produzidas industrialmente, comercializadas na cidade de Jaboticabal, SP. Os autores observaram maiores índices de contaminação em amostras artesanais em relação às amostras industrializadas, sendo que 83,4% das amostras artesanais e 66,7% das amostras industriais apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira. FERREIRA et al. (2011) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de Uberlândia, MG e encontraram populações de coliformes termotolerantes acima do permitido em 65% das 20 amostras avaliadas.

A amostra 2 deste estudo apresentou *Salmonella* spp. 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).

Neste estudo, 3 amostras mostraram altas contagens de bactérias *S. aureus*. Alguns trabalhos na literatura observaram maiores índices de contaminação com *S. aureus* em amostras artesanais em relação às amostras industrializadas. SALOTTI et al. (2006) constataram que 20% das amostras artesanais e 10% das amostras industrializadas apresentaram *S. aureus* acima dos valores aceitos pela legislação. No estudo de PASSOS et al. (2009) foi avaliada a qualidade microbiológica de queijos minas frescais, sendo 30 amostras com fiscalização do serviço de inspeção federal (formais) e 15 amostras sem inspeção fiscal (informais), comercializados nas cidades de Londrina e Arapongas, PR. Os autores reportaram que 36,6% das amostras formais e 56,6% das amostras informais apresentaram contagens de *S. aureus* maiores que o permitido pela legislação.

A intoxicação alimentar estafilocócica causada pela ingestão de derivados lácteos é comum, sendo frequentemente reportada (BORGES et al., 2008; INPPAZ/OPS/OMS, 2006; SANTANA et al., 2010). Um dos fatores responsáveis é o fácil acesso das bactérias *S. aureus* ao leite, uma vez que esse microrganismo é o agente mais comum de mastite bovina (ZSCHÖCK et al., 2005). Além disso, *S.*

aureus pode ser veiculado ao leite pasteurizado ou ao queijo, através de contaminação por meio de práticas deficientes de higiene e manipulação (ZOCHE e SILVA, 2012).

Por meio das análises moleculares foram confirmadas as colônias de *S. aureus*, *Salmonella spp.* e *E. coli* em algumas das amostras analisadas, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Análises moleculares das amostras de queijos minas frescais artesanais

Amostras	Bactéria e gene amplificado na PCR		
	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>E. coli</i>
1	-	-	<i>MalB</i>
2	<i>Nuc</i>	<i>invA</i>	<i>MalB</i>
3	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>
4	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>
5	<i>Nuc</i>	-	<i>MalB</i>

Neste estudo as bactérias *S. aureus* encontradas nas quatro amostras de queijos artesanais eram prováveis produtoras de enterotoxinas, pois a região gênica *Nuc* identificada nessas bactérias mostra forte correlação com a produção de enterotoxinas e no estudo de TAMARAPU et al. (2001) foi proposto usar a região gênica *Nuc* para identificar *S. aureus* produtores de enterotoxinas.

Após análise molecular, *E. coli* foi identificada nas cinco amostras de queijos artesanais analisadas. A região gênica *MalB* codifica a enzima etanolamina amônia liase em *E. coli*. A sequência utilizada nesse estudo é específica para detecção de *E. coli* e referenciada na literatura por WANG et al. (1997) como uma região promotora do gene *malB* (sistema de maltose) e pode ser adotada para identificar qualquer sorotipo desta espécie.

E a amostra de queijo artesanal dois teve a bactéria *Salmonella spp.* confirmada através da amplificação do gene *invA*. O gene *invA* está relacionado com invasão celular de *Salmonella*, um componente essencial para a patogênese da doença. O gene *invA* está presente na maioria das salmonelas e ausente na região correspondente de *E. coli*, sendo considerado capaz de distinguir entre *Salmonella* de outras espécies bacterianas por meio de PCR (KUMAR et al., 2006).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas dos queijos minas frescais artesanais deste estudo mostraram falta de qualidade higiênico-sanitária destes alimentos, sendo que das cinco amostras analisadas somente uma amostra estava dentro dos padrões de qualidade da legislação e, portanto própria para o consumo.

Tais dados sugerem que as amostras podem ter sido processadas utilizando matéria-prima de baixa qualidade. Os queijos minas frescais artesanais também podem ter sido contaminados no processamento e manipulação inadequados, além de serem mantidos à temperatura ambiente (inadequada) no comércio.

Com os resultados deste estudo, fica evidente a necessidade de fiscalização nos locais de venda dos produtos, assim como nos locais onde ocorre o manuseio e a fabricação dos queijos. Dessa forma, seria possível diminuir o risco de contaminação microbiológica e melhorar as condições de fabricação dos queijos frescos, gerando alimentos seguros e de qualidade para o consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

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**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

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.

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 Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352/97 de 04 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e

qualidade de queijo Minas Frescal. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 4 set. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 07 mar. 1996.

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

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.

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.; RODRIGUES, M. A. M.; LORENO, W. B. N.; SANTOS, K. A. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v.26, n.2, p.316-321, 2010.

KUMAR, S.; BALAKRISHNA, K.; BATRA, H .V. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format. **Letters Applied in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 149-154, 2006.

LISITA, M. O.; PORTO, E.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SANT'ANA, A. S. Monitoramento Microbiológico no Processamento do Queijo Minas Frescal. **Revista Leite & Derivados**, v. 110, n. 17, p. 82-9, 2009.

PASSOS, A.D.; FERREIRA, G.K.L.; JULIANI, G.L.; SANTANA, E.H.W.; ALEGRO, L.C.A. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.64, n.369, p.48-54, 2009.

PINTO, F.G.S.; SOUZA, M.; MOURA, A.C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.2, p.191-198, 2011.

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.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.73, n.2, p.171-175, 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**, Campinas, 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.

SILVA, L.M. Perfil microbiológico de queijo minas frescal industrializado e artesanal comercializado em Goiânia, *Goiás*. 2015. 82 f. Tese (Mestrado em Nutrição e Saúde), Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Goiás, 2015.

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

TAMARAPU, S. MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. 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.

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.

ZSCHÖCK, M. et al. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 243-249, 2005.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

AMORIN, A. L. B. **Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo Minas Padrão de fabricação industrial, artesanal e informal**. 2013. 53 p. Monografia – Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2013.

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.

BRASIL. Resolução n. 7, de 28 de novembro de 2000. **Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal**. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2dejaneiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº ° 146 de 07 de março de 1996. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 07 mar. 1996.

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.

CENCI-GOGA, B.T. et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **J. Food Prot.**, v. 66, p. 1693-1696, 2003.

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.

FEDERAL, Câmara Legislativa do Distrito. *Lei nº 4.748, de 2 de fevereiro de 2012 - Dispõe sobre a regularização, a organização e o funcionamento das feiras livres e permanentes no Distrito Federal*. Conteúdo Jurídico, Brasília-DF: 02 fev. 2012. Disponível em: <<http://www.conteudojuridico.com.br/?artigos&ver=712.41552&seo=1>>.

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.

LEITE JÚNIOR, A. F. S. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande-PB. **Higiene Alimentar**, v. 14, n.73, p. 53-59. 2000.

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.

LISITA, M. O.; PORTO, E.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SANT'ANA, A. S. Monitoramento Microbiológico no Processamento do Queijo Minas Frescal. **Revista Leite & Derivados**, v. 110, n. 17, p. 82-9, 2009.

MADEIRA, A. M. V. A cidade e suas feiras. Um estudo sobre as feiras permanentes de Brasília. Brasília: DF: IPHAN/15ª Superintendência Regional, 2007.

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>

MIRANDA, G. R.; SOUZA, A. M.; MARTINS, A. D. O.; COCARO, E. S.; MARTINS, J. M. Queijos artesanais: qualidade físico-química e microbiológica e avaliação das

condições higiênico-sanitárias dos manipuladores e ambiente de produção, **Extensão Rural, DEAR – CCR – UFSM, Santa Maria**, v.23, n.1, p. 78-92, 2016.

PASSOS, A. D. et al. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados nas cidades de Arapongas e Londrina – PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 369, p. 48-54, 2009.

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.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.73, n.2, p.171-175, 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, L. M. **Perfil microbiológico de queijo minas frescal industrializado e artesanal comercializado em Goiânia, Goiás**, Tese (Mestrado), UFG, 982 p., 2015.

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, S. MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. 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.

ZSCHÖCK, M. et al. Pattern of enterotoxin genes *seg*, *seh*, *sei* and *sej* positive *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. **Vet. Microbiol.**, v. 108, p. 243-249, 2005.