

Qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal artesanais e industrializados**Microbiological quality assessment of house made and industrialized Minas Frescal cheese**

DOI:10.34117/bjdv6n10-696

Recebimento dos originais: 08/09/2020

Aceitação para publicação: 30/10/2020

Andressa Facci Villas Boas

Graduanda em Biomedicina - Universidade Federal de Alfenas - MG

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas - MG, CEP 37130-001

E-mail: andressa_facci@hotmail.com

Elis Lantelme Silva Belpiede

Bacharel em Biomedicina - Universidade Federal de Alfenas - MG

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas - MG, CEP 37130-001

E-mail: elisbelpiede96@gmail.com

Natália Roberto Faria da Silva

Graduanda em Biomedicina - Universidade Federal de Alfenas - MG

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas - MG, CEP 37130-001

E-mail: nataliafaria@live.com

Mariella Ferreira da Silva

Bacharel em Biomedicina - Universidade José do Rosário Vellano - MG

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas - MG, CEP 37130-001

E-mail: mariella.mfs@hotmail.com

Sandra Maria Oliveira Morais VeigaDr.^a

Doutora em Ciências dos Alimentos - Universidade Federal de Lavras - MG

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 - Centro, Alfenas - MG, CEP 37130-001

E-mail: sandra.veiga@unifal-mg.edu.br

RESUMO

O Queijo Minas Frescal é um alimento comum nos hábitos alimentares da população brasileira, sendo um produto indicado para várias dietas devido ao seu alto valor nutricional e baixo percentual de gordura e sódio. Todavia, por ser um queijo macio, apresentando alto teor de umidade e pH em torno de 6, torna-se um meio propício para o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, que podem diminuir a vida útil do alimento e/ou provocar toxinfecções alimentares. Deste modo, este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal artesanais e industrializados comercializados no Sul de Minas Gerais e verificar se os mesmos estavam em conformidade com a legislação vigente. Por meio de métodos oficiais, foram realizadas análises microbiológicas quantitativas para Coliformes a 45 °C (*E. coli*), Estafilococos coagulase positiva e Bactérias lácticas e qualitativas para *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*. Os queijos industrializados encontraram-se em conformidade com a legislação vigente. Por outro lado, os queijos artesanais não atenderam a referida legislação, uma vez que 80% das amostras analisadas

apresentaram Estafilococos coagulase positiva acima dos limites permitidos e 20% dos queijos analisados de produtores rurais apresentaram quantificações de Coliformes a 45 °C acima dos limites toleráveis. Ainda, detectou-se a presença de *Salmonella* sp. em 60% das amostras, com identificação de *Salmonella typhimurium* nas amostras de um dos produtores. Conclui-se que os queijos artesanais analisados estavam impróprios para consumo, oferecendo risco para a saúde da população.

Palavras-chave: Análise microbiológica, qualidade do queijo, bactérias lácticas, *Salmonella typhimurium*, PCR.

ABSTRACT

Minas Frescal Cheese is a vastly common dairy product present in Brazilian's dietary habit, recommended for various types of diets due to its high nutritional value and its low percentage of fat and sodium. However, as it is a fresh cheese with a high moisture content and pH around 6 the cheese becomes a medium conducive to the growth of deteriorating and pathogenic microorganisms, which can shorten its shelf life and/or cause food poisoning. Thus, this study aimed to evaluate the microbiological quality of artisanal and industrialized Minas Frescal cheeses marketed in the South of Minas Gerais State and to verify if the analyzed products were in compliance with the current legislation. Coliforms at 45 °C (*E. coli*), coagulase positive staphylococci and lactic acid bacteria were quantified and *Salmonella* sp and *Listeria monocytogenes* were investigated, using official methods. Industrialized cheeses were in compliance with current legislation. On the other hand, artisanal cheeses did not comply with the aforementioned legislation, 80% of the analyzed samples presented coagulase-positive staphylococci above the permitted limits and 20% of the analyzed cheeses from rural producers showed coliforms quantifications at 45 °C superior to the tolerable limits. In addition, 60% of the samples tested positive for *Salmonella* sp. And *Salmonella typhimurium* was detected in the samples of one of the producers. The study concluded that the artisanal cheeses analyzed were unfit for consumption, posing a risk to public health.

Keywords: Microbiological analysis, cheese quality, lactic acid bacteria, *Salmonella typhimurium*, PCR.

1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos produtos derivados do leite, o queijo se destaca por ser de grande importância nos hábitos de consumo da população brasileira, não só por seu agradável sabor, mas também por apresentar um alto valor nutricional, sendo excelente fonte de cálcio, proteínas e vitaminas. De acordo com a Associação Brasileira de Indústria de Queijos, estima-se que o consumo de queijo no Brasil é de 5,5 quilos por habitante ao ano (DCI, 2018).

O queijo Minas Frescal é o mais indicado em várias dietas alimentares, pois contém menos gordura e sódio, além de apresentar fácil digestibilidade. No mercado, o produto também se destaca por apresentar um ótimo rendimento na fabricação e facilidade de produção (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; MARTINS; MOURA, 2010).

Este queijo é branco, macio com consistência mole e textura fechada, apresentando de 12 a 18% de proteína e gordura de 20% até 30%. É classificado como queijo fresco, semi gordo, de alta

umidade (>55%) e baixo percentagem de sal (cerca de 30 mg de sódio). Ele é processado em temperaturas de 32-35 °C, tem pH em torno de 6 e não é submetido à cura (BRASIL, 1997; BRASIL, 2004; APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014).

A Portaria n° 146/1996, do ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define o queijo Minas Frescal como sendo resultado da coagulação enzimática do leite com coalho ou outras enzimas coagulantes, complementadas ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1996).

Por ser um produto obtido por processos simples de fabricação, com alto rendimento e não requerer maturação do produto final, o queijo Minas Frescal é fabricado em nível industrial e artesanal, tanto nos laticínios de grande quanto de pequeno porte, podendo, muitas vezes, ser fabricado sem as condições adequadas de higiene (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; VISOTTO *et al.*, 2011; ROSA, 2004; MACHADO *et al.* 2004; MARQUES; OLIVEIRA, 2004; SANGALETTI *et al.*, 2009).

Justamente por não ser maturado, se trata de um produto bastante perecível, com uma vida de prateleira curta, sendo necessário seu armazenamento em ambiente refrigerado e consumo rápido (SILVA; LEITÃO, 1980).

O produto deve ser fabricado a partir do leite pasteurizado, entretanto, mesmo assim, pode haver contaminação, dependendo das condições em que é manipulado e armazenado. Mas, deve-se destacar que a qualidade inicial do leite vai influenciar diretamente nas características do queijo a ser produzido. A legislação brasileira determina a utilização do leite pasteurizado na produção do queijo Minas Frescal; porém, muitas vezes, esse regulamento não é respeitado, principalmente no caso da fabricação de queijos artesanais. (VIEIRA *et al.*, 2008; ALEXANDRE *et al.*, 2002).

Os queijos frescos e macios apresentam fatores intrínsecos que contribuem para a multiplicação microbiana, como atividade de água (A_w), pH neutro e presença de nutrientes. O uso do leite cru pode implicar na contaminação por microrganismos deteriorantes e patogênicos, sendo os últimos responsáveis por surtos de intoxicações e/ou infecções alimentares, tais como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* patogênica e enterotoxigênica (CARVALHO; VIOTTO; KUAYE, 2007; APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; VISOTTO *et al.*, 2011; AZEREDO *et al.*, 2012).

A ingestão de queijos Minas Frescal contaminados com microrganismos patogênicos e seus metabólitos que podem ser leves, moderadas ou graves, dependendo da competência imunológica do grupo que consome o alimento. Para crianças, idosos, gestantes e imunocomprometidos, algumas doenças podem levar ao óbito. Torna-se, então, essencial o emprego das Boas Práticas de Fabricação

(BPF) e procedimentos Padrões Operacionais de Higiene (PPOH), desde o início da sua produção até o consumo, não apenas com a finalidade de cumprir a legislação, mas, principalmente, de objetivar o fornecimento de alimentos seguros. A inspeção e a avaliação higiênico-sanitária também são importantes fatores para assegurar a qualidade do leite e queijos, representando benefícios para o produtor, indústria, consumidor e o sistema de saúde (PINTO, 1996).

Deve-se destacar que, se por um lado, preocupa-se com o controle de patógenos e deteriorantes; por outro, existe o interesse na preservação da microbiota natural do leite, representada pelas bactérias lácticas, pois elas produzem bacteriocinas com amplo espectro de ação, principalmente contra microrganismos Gram positivos patogênicos e deteriorantes, sendo inclusive utilizadas como probióticos (ALVES *et al.*, 2011; NAIDU; CLEMENS, 2000; MOTTA; GOMES, 2015). Em estudo feito por Chioda *et al* (2007), foi demonstrada a atividade inibitória de *L. acidophilus* frente a *Escherichia coli* por meio da produção de substâncias antimicrobianas e a ação antagonista diretamente ligada com a capacidade dessas bactérias em produzir e tolerar quantidades elevadas de ácido lático, favorecendo a competição com outros microrganismos presentes no meio e a sua ação inibitória. Ortolani (2009) descreveu ação semelhante de bactérias lácticas naturalmente presentes em queijos com inibição de *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal artesanais e industrializados, comercializados no Sul de Minas Gerais, com o intuito de verificar se os produtos estavam em conformidade com a legislação vigente e comparar a qualidade microbiológica dos mesmos. Ainda, quantificar as bactérias lácticas e avaliar a sua correlação com a presença/ausência de patógenos nos produtos analisados (BRASIL, 2001).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Foram processadas 30 amostras de queijos Minas Frescal, comercializados no Sul de Minas Gerais, sendo 15 amostras oriundas de cinco indústrias queijeiras e 15, oriundas de cinco produtores artesanais. Desta forma, analisaram-se três amostras por indústria ou produtor artesanal.

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG no período de Março/2019 a Fevereiro/2020.

Todos os ensaios foram fundamentados em metodologias disponíveis no Manual de Métodos de Análise Microbiológicas de Alimentos e Água (SILVA *et al.*, 2017). Realizaram-se as pesquisas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp, bem como sua identificação por *Polymerase Chain Reaction* (PCR), quando presentes; quantificações de *Estafilococos* coagulase positiva e de

Coliformes à 35 °C e 45 °C, onde os resultados foram comparados com o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos do Ministério da Saúde (RDC nº 12, ANVISA, 2001). Paralelamente, realizou-se também a quantificação de bactérias lácticas.

2.2 AQUISIÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de queijos artesanais foram adquiridas por doações de produtores rurais da cidade de Alfenas e Poços de Caldas e os queijos industrializados foram adquiridos em diferentes supermercados e laticínios do Sul de Minas Gerais. As marcas foram escolhidas ao acaso, de acordo com a disponibilidade local e interesse do produtor em conhecer a qualidade microbiológica de seu produto. Após as análises, foram emitidos os laudos, cujos resultados foram discutidos com os interessados, com as orientações necessárias.

Realizou-se o quarteamento das amostras para a obtenção das alíquotas de 25 g de cada amostra de queijo para as análises propostas. Cada alíquota foi homogeneizada com 225 mL de diluente apropriado, utilizando um triturador *Waring* blender. O diluente foi escolhido de acordo com os microrganismos a serem analisados. Para os *Estafilococos* coagulase positiva, Coliformes totais e Bactérias lácticas, empregou-se como diluente, água peptonada 0,1%, sendo posteriormente obtida a diluição 10^{-1} , e a partir desta, as diluições subsequentes, 10^{-2} e 10^{-3} , empregando-se tubos contendo 9 mL de solução salina estéril. Para a *Salmonella* sp, utilizou-se Solução Salina Peptonada 1% Tamponada (STP); e para a *Listeria monocytogenes*, empregou-se o Caldo *Listeria Enrichment Broth* (LEB).

A metodologia para cada microrganismo segue abaixo descrita.

2.3 METODOLOGIAS ESPECÍFICAS

2.3.1 Metodologia para Coliformes a 35 °C e 45 °C

A análise quantitativa para coliformes a 35 °C e 45 °C, foi realizada por meio da fermentação dos tubos múltiplos (colimetria).

a) Prova presuntiva: utilizou-se uma bateria com três séries de três tubos cada, contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (CLST) como meio de cultura. Em cada série, adicionou-se 1,0 mL das referidas diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). O conjunto foi incubado a 35 °C por 24-48 horas, e posteriormente, foi feita a observação em relação ao crescimento e a produção de gás capturados pelos tubos de Durhan.

b) Prova confirmativa para coliformes totais: a partir dos tubos de caldo CLST positivos, foi feita a quantificação dos coliformes totais (35 °C), transferindo-se 10 µL da cultura para os tubos contendo Caldo Lactosado Biliado Verde Brilhante (CLBVB). Estes foram incubados a 35 °C por 24-48 horas, observando crescimento e produção de gás.

c) Prova confirmativa para coliformes termotolerantes: a partir dos tubos de caldo CLST positivos, foi feita a quantificação dos coliformes termotolerantes (45 °C), transferindo-se 10 µL da cultura para os tubos de caldo *E.coli* (EC). Estes foram incubados em Banho-Maria a 45 °C por 24 horas, observando crescimento e produção de gás.

De acordo com o número de tubos positivos em cada prova confirmativa e com o auxílio da tabela de Hoskins, foram feitas as estimativas de Coliformes totais e Coliformes termotolerantes em NMP/g de produto (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 2017).

d) Testes Bioquímicos: os tubos de EC que apresentaram crescimento e produção de gás, foram analisados para a Confirmação de *E. coli*. Para tanto, por meio da técnica de esgotamento em placa, a cultura foi semeada em Ágar Levine Eosina Azul de Metileno (Teague ou L-EMB), sendo as placas incubadas a 35 °C por 24 horas. As colônias típicas, escuras esverdeadas metálicas, foram repicadas para os tubos Agar BHI e incubados a 35 °C por 24 horas. A partir dos tubos de Agar BHI foram feitos os inóculos em Ágar Citrato de Simmons; Caldo Clark Lubs (Caldo VM e VP) e no Caldo triptona (Indol e H₂S), sendo os mesmos incubados a 35 °C por 96 horas para a realização das provas bioquímicas pertinentes.

2.3.2 Metodologia para contagem de Estafilococos coagulase positiva

A quantificação de Estafilococos coagulase positiva foi realizada por meio do plaqueamento em superfície. A partir das diluições acima preparadas, foi inoculado 0,1 mL de cada diluição, em triplicata, na superfície da respectiva placa de Ágar *Baird-Parker* (BP). Em seguida, o inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalski e as placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas.

Para a quantificação de *Estafilococcus coagulase positiva*, foram consideradas colônias que apresentaram cor negra e duplo halo transparente, sendo que para a confirmação das colônias típicas, foram realizadas as Provas de Coagulase e Catalase (SILVA *et al.*, 2017).

2.3.3 Metodologia de isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*

a) Enriquecimento seletivo primário: como o ensaio é qualitativo e o padrão é ausência em 25 gramas do produto, realizou-se um pool para as três amostras de queijo de cada produtor ou fabricante. Do pool das três amostras foram retirados 25 gramas para homogeneização em o Caldo LEB, sendo o conjunto incubado a 30 °C por 24 horas.

b) Enriquecimento secundário em Caldo Fraser: após a incubação foi retirada uma alíquota de 0,1 mL do frasco de enriquecimento seletivo primário (Caldo LEB), transferindo-se a mesma para um tubo contendo 10 mL de Caldo Fraser, o qual foi incubado a 30 °C/24-48 h.

c) Plaqueamento seletivo diferencial: foi feita a agitação do frasco de enriquecimento seletivo primário e em seguida, foi feita a transferência do material, com auxílio da alça de platina, para uma placa de ágar Oxford (OXA) e para uma placa de Ágar Palcam, pela técnica de estrias em placa, com esgotamento. Estas placas foram incubadas a 35 °C por 24 h. Posteriormente, foi observada a possível existência de colônias típicas, em caso negativo, as placas foram reincubadas, para nova observação com 48 horas. O mesmo foi realizado com as placas obtidas a partir do Caldo Fraser.

e) Para a identificação foram utilizadas as provas bioquímicas de Reação em Ágar tríplice Açúcar Ferro (TSI); teste de fermentação da xilose, raminose, manita e glicose e teste de CAMP.

2.3.4 Metodologia de isolamento e identificação de *Salmonella sp*

a) Pré-enriquecimento em caldo não seletivo: este ensaio também é qualitativo e o padrão é ausência em 25 gramas do produto. Assim, realizou-se um pool para as três amostras de queijo de cada produtor ou fabricante. Do pool das três amostras foram retirados 25 gramas para juntar ao Diluente, Salina Peptonada Tamponada (SPT). Após a homogeneização, incubou-se o conjunto a 35 °C/18-24 horas.

b) Enriquecimento em caldo seletivo: foram utilizados os Caldos Rappaport-Vassiliadis (RV) e Tetrionato (TT). Transferindo-se 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento primário (STP), em um tubo contendo 9 mL de Caldo RV e 1,0 ml em um tubo contendo 9 mL de Caldo TT. O tubo de RV foi incubado em Banho-Maria a 42 °C por 24 horas e o tubo de TT incubado a 35 °C por 24 horas.

c) Plaqueamento seletivo diferencial: após a agitação dos tubos de enriquecimento seletivo foi estriada uma alçada de cada tubo, pela técnica de esgotamento em placa, para as placas de Ágar Salmonella Shiguella (SS), Ágar Rajhans (RJ) e Ágar Hecktoen (HK). Em seguida, as placas foram incubadas a 35 °C/24 h e posteriormente observadas.

d) Identificação presuntiva: foram utilizadas as provas bioquímicas de Ágar Lisina Ferro (LIA); Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI); Caldo Uréia e Ágar Citrato de Simmons.

e) Caracterização antigênica com a detecção de *Salmonella typhimurium* por PCR em tempo real: para as amostras positivas para *Salmonella* sp pelas provas bioquímicas, para a presença de *Salmonella* foram levadas para identificação de *S. typhimurium* por meio da Técnica de *Polymerase Chain Reaction* em tempo real (qPCR). As análises foram realizadas no Laboratório de Parasitologia da Unifal-MG.

- Purificação de DNA: transferiu-se para um eppendorf 500 µg de BHI contendo as colônias suspeitas e realizou-se centrifugação a 2.000 rpm/5 min. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado. Adicionou-se 20 µl de Proteinase K e 200 µl de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer, feita a homogeneização, o mesmo foi incubado a 55 °C por 10 minutos em Banho Maria. Posteriormente, adicionou-se 200 µl de etanol (96-100%) e realizou-se a homogeneização. Em seguida, a solução foi transferida para uma PureLink™ Spin e centrifugada a 8.000 rpm/1 min, transferiu-se a coluna para um novo tubo de 2 mL e adicionou-se, com cuidado, 500 µl de Wash Buffer I e levou-se a centrifuga a 8.000 rpm/1 min. Foi feita então, a transferência para um tubo de 2 mL novamente, adicionado 500 µl de Wash Buffer II e nova centrifugação a 10.000 rpm/ 3 minutos. Colocou-se a coluna em um tubo de 1,5 mL, e adicionou-se 100 µl de PureLink™ Genomic Elution Buffer, incubando-se a temperatura ambiente por 5 minutos. Após este tempo, centrifugou-se o material a 8.000 rpm/1 minuto. A solução final foi congelada a -20 °C até a realização do PCR.
- PCR Real Time: adicionou-se 1 µL de solução contendo sonda do tipo TaqMan marcada com FAM e quencher NFQ, iniciador forward e reverse. Em seguida, foi preparado e adicionado um mix contendo 5 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*, 3,5 µL de água livre de DNase e RNase e 1 µL de DNA da amostra. Foi utilizado um controle

negativo e uma alíquota de cepa de *Salmonella Typhimurium* como o controle positivo. Para a amplificação, foi realizado ciclo inicial de 2 minutos a 50 °C; a segunda etapa constou de um ciclo de 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos por 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. As reações foram realizadas no equipamento *Step One™ Real Time PCR System* (Applied Biosystems).

2.3.5 Metodologia Para Contagem De Bactérias Lácticas

A partir das diluições preparadas em água peptonada para a quantificação de Coliformes, foi inoculado 0,1 mL de cada diluição na superfície da respectiva placa de Ágar de Man, Rogosa & Sharp (MRS); o procedimento foi realizado em triplicata. Em seguida, o inóculo foi espalhado com o auxílio de alça de Drigalski e posteriormente, adicionou-se uma sobrecamada de MRS. As placas foram incubadas por 72h a 32 °C. Para as colônias típicas, preparam-se lâminas que foram coradas pelo método de Gram, confirmando-se assim, as características morfotintoriais das bactérias lácticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os queijos Minas Frescal artesanais foram oriundos de 5 diferentes produtores (03 unidades amostrais de cada), sendo estas identificadas neste trabalho, como “A”, “B”, “C”, “D” e “E”. Para os queijos Minas Frescal industrializados, as amostras também foram provenientes de 5 diferentes marcas (03 unidades amostrais de cada), representadas por “F”, “G”, “H”, “I” e “J”.

No Brasil, a Resolução – RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS, de 02 de janeiro de 2001 estabelece os padrões microbiológicos sanitários para queijos de alta umidade (>55%), como o Minas Frescal. Essa legislação determina a ausência de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* em 25 gramas do produto; limites de $5,0 \times 10^2$ NMP/g para coliformes termotolerantes e $5,0 \times 10^2$ UFC/g para Estafilococos coagulase positiva (BRASIL, 2001).

Abaixo, está inserida a tabela apresentando os resultados encontrados nos ensaios microbiológicos:

Tabela 1: Média do padrão microbiológico de queijos Minas Frescal comercializados no Sul de Minas Gerais e limite microbiológico conforme RDC n° 12/2001.

Produtores/ Marcas	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25 g)	<i>Salmonella</i> sp. (25 g)	Coliformes a 35 °C (NMP/g)	Coliformes a 45 °C (NMP/g)	Estafilococos coagulase positiva (UFC/g)	Bactérias láticas (NMP/g)
A	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	$9,0 \times 10^1$	$1,7 \times 10^3$	1×10^2
B	Ausente	Presente	$\geq 1,1 \times 10^3$	$8,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$3,8 \times 10^2$
C	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$6,1 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$
D	Ausente	Presente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$2,8 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$
E	Ausente	Presente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$< 1,0 \times 10^2$	$1,8 \times 10^4$
F	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$< 1,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^4$
G	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	$9,2 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^2$	$3,9 \times 10^3$
H	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	3,0	$< 1,0 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
I	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$< 1,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^6$
J	Ausente	Ausente	$\geq 1,1 \times 10^3$	<3,0	$< 1,0 \times 10^2$	8×10^6
RDC n° 12/2001	Ausência	Ausência	–	5×10^2	5×10^2	–

Fonte: Das autoras.

A-E: Produtor rural

F-J: Marca industrializada

NMP: Número Mais Provável

UFC.: Unidades Formadoras de Colônia

Ref.: ANVISA. RDC n.º 12/2001.

Várias etapas do processamento apresentam risco de contaminação, podendo ser de origem microbiológica, no pós-processamento da matéria-prima, a recontaminação do leite pós-pasteurizado e inadequadas temperaturas e formas de armazenamentos (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014; SANGALETTI *et al.*, 2009).

Os queijos industrializados apresentaram melhor qualidade higiênico sanitária dos que os queijos artesanais, já que são processados com leite pasteurizado o que diminui as chances de contaminações por patógenos na matéria prima do queijo, e precisam se adequar ao regulamento da vigilância sanitária para sua comercialização.

Observa-se a necessidade da implantação de melhorias do controle da produção e na qualidade higiênico sanitária dos alimentos, por meio da orientação e treinamento dos fabricantes em relação às boas práticas de higiene e de fabricação, além da fiscalização efetiva e constante do produto e da matéria-prima, pelos órgãos competentes e vigilância sanitária, visando assim, garantir a qualidade e segurança do produto comercializado.

A *Listeria Monocytogenes* não foi detectada em nenhuma das 30 amostras analisadas. Tendo em vista que a ANVISA estabelece ausência desses microrganismos em 25 g deste alimento, nesse aspecto todos os queijos analisados contemplaram a legislação vigente (BRASIL, 2001).

No entanto, através de testes bioquímicos foi possível identificar a presença da *Salmonella* sp. em 60% das amostras fabricadas pelos produtores rurais, identificadas como “B”, “D” e “E”, como demonstrado na Tabela 1. Com a realização do PCR foi possível confirmar a presença da *Salmonella typhimurium* nas amostras produzidas pelo produtor “E”. A presença desse microrganismo torna o produto impróprio para consumo.

A ocorrência de *Salmonella* sp. nas amostras de produtores rurais sugere a formação de biofilmes verificado por Borges *et al.* em 2018, esta que está parcialmente associada com o sorovar indicando que a produção de biofilmes é dependente da cepa. A formação de biofilmes nos equipamentos e superfícies da linha de produção do queijo advém da falta de procedimentos adequados de limpeza e sanitização, facilitando a contaminação da amostra por este patógeno. Os biofilmes representam uma preocupação para a indústria de alimentos, pois geralmente os microrganismos aderidos apresentam maior capacidade de resistir aos tratamentos antimicrobianos (REZENDE *et al.*, 2012).

Em estudo realizado por Souza *et al.* (2017), foi encontrada a presença de *Salmonella* sp. em 40% amostras avaliadas (50), sugerindo grande necessidade de aperfeiçoamento no processamento, armazenamento e/ou distribuição dos queijos, de modo a garantir a qualidade microbiológica desses produtos.

Segundo Brant, Fonseca e Silva (2007), a ausência de *Salmonella* sp. e de *L. monocytogenes* pode ser causada pela menor capacidade de competição dessas espécies em relação aos coliformes e aos Estafilococos. Entretanto, para Melo, Alves e Costa (2009), a ausência desses microrganismos em amostras de alimentos também pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas no produto

que podem dificultar a sobrevivência desses patógenos em função de metabólitos antimicrobianos liberados no meio.

Quanto aos Coliformes a 35 °C, apesar da RDC n° 12/2001 da ANVISA não determinar um limite máximo permitido para esses microrganismos, quando presentes em números muito elevados são considerados importantes indicadores de higiene do processamento e armazenamento do queijo Minas Frescal (MARTINS; REIS, 2012).

Todas as amostras de queijos analisadas, tanto as artesanais como as industrializadas, apresentaram altas contagens de Coliformes a 35°C, sendo esses microrganismos importantes indicadores de higiene. A presença destes pode estar relacionada a ausência de patógenos, como por exemplo a *Listeria monocytogenes*, por constituírem uma microbiota competidora.

Entretanto, os Coliformes a 45°C, em especial, a *Escherichia coli* é considerada um importante indicador para aferir a qualidade higiênico-sanitária de alimentos e as boas práticas de higiene e de fabricação, por serem consideradas indicadores específicos de contaminação fecal (PINTO, 1996; MAGALHÃES *et al.*, 2004).

Das 15 amostras de queijos artesanais, três (20%), ou seja, um produtor rural (20%), apresentou coliformes termotolerantes acima dos limites toleráveis pela legislação vigente; enquanto para os queijos industrializados, todas as 15 amostras (100%) se encontraram dentro do limite estabelecido pela RDC n° 12/2001 (BRASIL, 2001).

A partir das culturas com presença de coliformes termotolerantes, foi feita a pesquisa para detecção qualitativa através das provas bioquímicas, sendo confirmada a presença de *E. coli* em amostras de dois produtores rurais (A e B), sendo que somente o produtor B apresentou estes microrganismos em quantidades acima do permitido pela ANVISA. Nas amostras dos produtores industriais (G e H) foram isolados microrganismos do gênero *Enterobacter* e *Klebsiella*.

Das quinze amostras analisadas provenientes de produtores rurais, doze apresentaram valores acima dos limites toleráveis para Estafilococos coagulase positiva, ou seja, 80% das amostras provenientes de produtores artesanais estavam impróprias para consumo, visto que esses microrganismos podem causar intoxicações alimentares quando presentes em elevadas quantidades. No entanto, as amostras industrializadas apresentaram-se em conformidade com a legislação vigente, por não apresentarem colônias sugestivas desses microrganismos, sugerindo condições satisfatórias de higiene por parte dos manipuladores e do ambiente industrial (BRASIL, 2001).

Vários estudos mostram a presença de Estafilococos coagulase positiva em queijos, principalmente oriundos de produtores artesanais. Esses microrganismos são comumente encontrados nas fossas nasais, na boca, nas mãos e no trato gastrointestinal, podendo contaminar o

alimento diretamente ou indiretamente. Assim, a quantificação desses microrganismos também é bom indicador do controle higiênico-sanitário no processo de produção desses alimentos (SANGALETTI *et al.*, 2009 e MAGALHÃES *et al.*, 2004).

Outro fator importante a ser analisado é a contaminação que pode estar presente na matéria prima utilizada no processo de fabricação desses queijos, ou seja, no leite cru; isso pode ocorrer devido às infecções estafilocócicas na glândula mamária bovina (mastites) ou por contaminação do ordenhador, dos utensílios, do maquinário e até mesmo, por falta de higienização adequada das tetas do animal (SANGALETTI *et al.*, 2009 e MAGALHÃES *et al.*, 2004).

No presente estudo também foi feita a quantificação de Bactérias lácticas, realizada com o intuito de analisar se amostras com um alto índice desses microrganismos apresentavam uma menor incidência de microrganismos patogênicos.

Em relação à quantificação das Bactérias lácticas vale ressaltar que é muito comum a utilização do coalho comercial para realização da coagulação enzimática, processo primordial na fabricação do queijo Minas Frescal. Assim, as Bactérias lácticas não são empregadas no processo de fabricação e conseqüentemente, as contagens desses microrganismos foram baixas.

Neste estudo, não foi possível correlacionar os resultados analisados da quantificação das Bactérias lácticas com a ausência/presença de patógenos alimentares. Possivelmente, isso ocorreu devido à baixa acidez detectada nos queijos Minas Frescal (AMMOR; MAYO, 2007).

4 CONCLUSÃO

Os queijos industrializados apresentaram qualidade microbiológica satisfatória, portanto, estavam próprios para consumo.

Por outro lado, os queijos artesanais não atenderam a RDC nº 12, 2001 da ANVISA, uma vez que, todas as amostras analisadas apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória. Os Estafilococos coagulase positiva apresentaram acima dos limites permitidos em 80% das amostras artesanais e a quantificações de Coliformes a 45 °C em 20% das amostras.

Ainda, detectou-se *Salmonella* sp. em amostras de três produtores artesanais (60% das amostras), com confirmação de presença de *Salmonella typhimurium* nas amostras produzidas pelo produtor “E”.

Conclui-se que os queijos artesanais analisados estavam impróprios para consumo, oferecendo risco para a saúde da população.

As contagens de bactérias lácticas não apresentaram correlação com a presença/ausência de patógenos alimentares nas amostras estudadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG pela possibilidade de realização deste trabalho. A Patrícia Lunardelli Negreiros, o professor Fabio Antonio Colombo e a Juliana Barbosa Nunes pela colaboração na realização do trabalho. A Flávia Andrade Ribeiro pela doação do material do PCR.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, D. P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- ALVES, C. C. C. et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de Minas Frescal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, Dec. 2011.
- AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, v. 76, n. 1, p. 138-146, 2007.
- APOLINÁRIO, T.; SANTOS, G.; LAVORATO, J. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.
- AZEREDO, H. M. C. et al. Alterações microbiológicas em alimentos durante a estocagem. In: AZEREDO, H. M. C. *Fundamentos de estabilidade de alimentos*. Brasília: Embrapa, 2012.
- BORGES, K. A. et al. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 71-76, Jan. 2018.
- 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*, Belo Horizonte v.59, n.6, p.1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 11 mar. 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Portaria nº 352 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, Seção1, p. 19684, 08 set. 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aditivos no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*. Brasília, Instrução Normativa nº 4, de 05 março, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível: <<http://www.ANVISA.gov.br/legis/resol/12:01rdc.htm>>.
- CARVALHO, J. D. G.; VIOTTO, W. H., KUAYE, A. Y. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, v. 18, n. 3, p. 262-267, 2007.
- CHIODA, T.P. et al. Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo "Minas Frescal" por *Lactobacillus acidophilus*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 2, p. 583-585, Apr. 2007.

DCI – Diário de Comércio Indústria e Serviço. Produção de queijo deve crescer 2,5% neste ano com aumento do consumo. Publicado em 12/04/18. Disponível em:< <https://www.dci.com.br/industria/producao-de-queijo-deve-crescer-2-5-neste-ano-com-aumento-do-consumo-1.69857>> Acesso em: 26/11/2018.

LEROY, F.; VERLUYTEN, J.; VUYST, L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 106, n. 3, p.270-285, 2006.

MACHADO, E. C. et al. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 516-521, out./dez. 2004.

MAGALHÃES, M. et al. Avaliação Microbiológica do queijo tipo Minas Frescal comercializado em Juiz de Fora e Região no ano de 2004. Departamento de Alimentos e Toxicologia FFB/UFJF, Juiz de Fora, 2004.

MARQUES, M. C.; OLIVEIRA, C. A. F. Avaliação das características físico-químicas do queijo Minas frescal produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. Pirassununga: FZEA/USP, 2004. 15 p. (Iniciação Científica).

MARTINS, E.; MOURA, C. Manual técnico na arte e princípios da fabricação de queijos. Alto Piquiri: Campana, 2. ed., p. 14-16, 65, 2010.

MARTINS, E. S.; REIS, N. E. V. Determinação de Coliformes e Staphylococcus Coagulase Positiva em Queijos Minas Frescal. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 6, n. 2, p. 842-851, 16 ago. 2012.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas Padrão comercializado na Cidade de São Luís, MA. *Arquivos do Instituto de Biológico, São Paulo*, v.76, n.4, p.547-551, 2009.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S M.. Propriedades tecnológicas e funcionais de bactérias lácticas: A importância destes microrganismos para alimentos. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 70, n. 3, p. 172-184, Jun. 2015.

NAIDU, A. S; CLEMENS, R. A. Probiotics. In: *Natural food antimicrobial systems*. CRC press, p. 444-475, 2000.

ORTOLANI, M. B. T. et al. Microbiological Quality and Safety of Raw Milk and Soft Cheese and Detection of Autochthonous Lactic Acid Bacteria with Antagonistic Activity Against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Spp.*, and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathogens and Disease*, Viçosa, v. 7, n. 2, 2009.

PINTO, A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Millenium*, p. 91-100, 1996.

REZENDE, C. et al. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em sorvetes comercializados em um município do noroeste paulista. *Rev. Higiene Alimentar, São Paulo*, v.26, p. 210-211, jul./ago. 2012.

ROSA, V. P. Efeitos da atmosfera modificada e da irradiação sobre as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do queijo Minas frescal. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, abr. 2004.

SANGALETTI, N. et al. Estudo da vida útil de queijo Minas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 29, n. 2, p.262-269, abr.-jun. 2009.

SILVA, N. et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 5. ed. São Paulo: Bluncher, 2017.

SILVA, C. A. M.; LEITÃO, MF de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo Minas Frescal. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro, v.4, p. 186, 1980.

SOUZA, I. A et al. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal na Zona da Mata Mineira. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 72, n. 3, p. 152-162, jul/set 2017.

VIEIRA, K.P. et al. Contaminação de queijo Minas Frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. *ConScientiae Saúde*, v. 7, n. 2, 2008.

VISOTTO, R. G. et al. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da rotulagem. *Rev Inst Adolfo Lutz, Ribeirão Preto*, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.