

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO  
JEQUITINHONHA E MUCURI**

**ALINE SILVA SANTOS**

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO SERRO-MG:  
EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE A MICROBIOTA DO LEITE CRU E  
COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO DURANTE A MATURAÇÃO**

**DIAMANTINA - MG  
2010**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ALINE SILVA SANTOS

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO SERRO-MG: EFEITO DA  
SAZONALIDADE SOBRE A MICROBIOTA DO LEITE CRU E  
COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO DURANTE A MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Christiano Vieira Pires  
Coorientador: Paulo de Souza Costa Sobrinho

DIAMANTINA - MG  
2010

Ficha Catalográfica - Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecária Viviane Pedrosa de Melo CRB6 2641

S235q  
2010

Santos, Aline Silva

Queijo minas artesanal da microrregião do serro-mg: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação / Aline Silva Santos. – Diamantina: UFVJM, 2010.

67p.

Dissertação (Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação Stricto Sensu em Produção Animal) -Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

Orientador: Prof. Dr. Christiano Vieira Pires

Coorientador: Prof. Dr. Paulo de Souza Costa Sobrinho

1.Escherichia coli 2. Listeria monocytogenes 3. maturação 4. mesófilos 5. Salmonella spp I. Título

**CDD 637.127**

ALINE SILVA SANTOS

**QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO SERRO – MG: EFEITO DA SAZONALIDADE NA MICROBIOTA DO LEITE CRU E COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO DURANTE A MATURAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

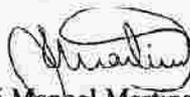
APROVADA EM 30/ 08/ 2010



Prof. Christiano Vieira Pires – UFVJM  
Orientador



Prof. Paulo de Souza Costa Sobrinho – UFVJM  
Co-Orientador



Prof. José Manoel Martins – IF-Sudeste/MG



Prof. Cleube Andrade Boari – UFVJM



Prof. Roseli Aparecida dos Santos – UFVJM

DIAMANTINA – MG  
2010

## AGRADECIMENTO

A Deus, pela minha existência e pela presença sempre!!!

Aos meus pais, pelos ensinamentos e amor incondicional, ao meu irmão, pela força e confiança.

Ao Gleidson, pelo amor, compreensão e companhia em todos os momentos bons e difíceis.

À minha grande amiga e irmã Janaína, por sempre estar disposta a me ajudar.

À minha tia Madá e à tia Alice, meu muito obrigada!!!

A Salete e Chico, por me acolherem e fazerem me sentir em casa.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela oportunidade.

Ao professor Christiano Vieira Pires, elaborador deste projeto, pela orientação.

Ao professor Paulo de Souza Costa Sobrinho, pela coorientação, disponibilidade e pelos conhecimentos repassados.

Aos amigos do Laboratório - Jakline, Raquel, Bruno e Igor, pela ajuda e, principalmente, pelos bons momentos vividos.

A todos os produtores de queijo Minas Artesanal do Serro.

Ao Geraldo Aparecido Rodrigues, pelas viagens e pela disponibilidade em todos os momentos em que precisei.

Aos amigos de Desembargador Otoni, pelos bons momentos compartilhados juntos...

Meus sinceros agradecimentos...

## RESUMO

SANTOS, Aline Silva. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, agosto de 2010. 66p. **Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação.** Orientador: Christiano Vieira Pires. Coorientador: Paulo de Souza Costa Sobrinho. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Zootecnia).

O objetivo deste trabalho foi verificar a qualidade microbiológica do leite cru e da água utilizados na fabricação do queijo e a qualidade microbiológica do queijo Minas Artesanal do Serro em temperatura ambiente e sob refrigeração (8°C), durante 63 dias de maturação, e sua comparação com os critérios microbiológicos exigidos pela Lei Estadual n.º 14.185, de 31 de janeiro de 2002, específica para queijos artesanais. Todas as amostras de água apresentaram contaminação por coliformes totais acima do valor máximo permitido. Nenhuma amostra de água apresentou contaminação por coliformes fecais. Para duas amostras de leite cru a contagem de mesófilos apresentou-se acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. As contagens de *Staphylococcus aureus* no leite variaram entre 0 log UFC/mL e 3,46 log UFC/mL. *Escherichia coli* esteve ausente em todas as amostras de leite analisadas. A contagem de células somáticas variou entre 13.500 células/mL e 260.500 células/mL e somente uma amostra estava fora dos padrões para acidez. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* não foram encontradas em nenhuma das amostras de queijo analisadas nos diferentes tempos e temperaturas de maturação e não houve efeito significativo das condições de maturação em seus parâmetros microbiológicos.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, maturação, mesófilos, *Salmonella spp*

## ABSTRACT

SANTOS, Aline Silva. Federal University of the Jequitinhonha and Mucuri Valleys, Diamantina, August, 2010. 66p. **Handmade Minas Cheese of a Serro-MG microregion: seasonality effect on the raw milk microflora and microbiological behavior during maturation.** Advisor: Christiano Vieira Pires. Co-advisor: Paulo de Souza Costa Sobrinho. Course Conclusion Work (Post-Graduation *Stricto Sensu* in Animal Science).

The aim of this study was to assess the microbiological quality of raw milk and water used in cheese production and the microbiological quality of handmade Minas Cheese produced in Serro-MG at room temperature and under refrigeration (8°C) during 63 days of maturation and its comparison with the microbiological criteria required by the State Law N° 14,185 of January 31, 2002, specifically to handmade cheeses. All of the water samples showed total coliform count above the maximum allowed. No water sample showed contamination by fecal coliforms. For two raw milk samples the mesophilic count presented above the allowed limits according to the Brazilian law. *Staphylococcus aureus* counts ranged from 0 log CFU/mL and 3.46 log CFU/mL. No *Escherichia coli* was observed in the analyzed milk samples. The counted somatic cell ranged from 13,500 cells/mL to 26 000 cells/mL and only one sample was out of the standards for acidity. No *Listeria monocytogenes* or *Salmonella spp* were found in the analyzed cheese samples at different times and temperatures of maturation and there were no significant effect of maturation conditions on their microbiological parameters.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, maturation, mesophilic, *Salmonella spp*

## SUMÁRIO

|   |  |    |
|---|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL.....  | 9  |
| 2 | CAPÍTULOS  |    |
|   | CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....  | 11 |
|   | 1 Queijo artesanal do Serro.....   | 12 |
|   | 2 Fabricação do queijo do Serro.....   | 13 |
|   | 3 Legislações do queijo Minas Artesanal.....   | 14 |
|   | 4 Microrganismos presentes em queijos.....   | 15 |
|   | 4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....  | 16 |
|   | 4.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 17 |
|   | 4.3 Coliformes a 30°C e Coliformes 45°C.....   | 18 |
|   | 4.4 <i>Salmonella sp.</i> .....  | 20 |
|   | 4.5 Bactérias Lácticas.....  | 21 |
|   | 5 O processo de maturação dos queijos.....   | 23 |
|   | 5.1 Lipólise.....  | 23 |
|   | 5.2 Proteólise.....  | 24 |
|   | Referências.....   | 25 |
|   | <br>   |    |
|   | CAPÍTULO II -. Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro-MG: efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru..... | 33 |
|   | RESUMO.....  | 34 |
|   | ABSTRACT.....  | 35 |
|   | Introdução.....  | 36 |
|   | Material e Métodos.....  | 37 |
|   | Coleta e manutenção das amostras.....  | 37 |
|   | Preparo das amostras.....  | 37 |
|   | Análises microbiológicas.....  | 37 |
|   | Contagem total de mesófilos aeróbios.....  | 38 |
|   | Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....   | 38 |
|   | Contagem de <i>Escherichia coli</i> .....  | 38 |
|   | Pesquisa de <i>Listeria monocytógenes</i> .....  | 38 |
|   | Análises físico-químicas.....  | 39 |
|   | Determinação da contagem de células somáticas.....   | 39 |
|   | Determinação da acidez em Graus Dornic (D°c).....  | 39 |
|   | Resultados e Discussão.....  | 40 |
|   | Conclusões.....  | 43 |
|   | Referências.....   | 44 |
|   | <br>   |    |
|   | CAPÍTULO III -. Queijo Minas Artesanal da microrregião do Serro-MG: comportamento microbiológico durante a maturação .....     | 46 |
|   | RESUMO.....  | 47 |
|   | ABSTRACT.....  | 48 |
|   | Introdução.....  | 49 |
|   | Material e Métodos.....  | 51 |
|   | Coleta e manutenção das amostras.....  | 51 |
|   | Preparo das amostras de queijo.....  | 51 |
|   | Preparo das amostras de leite e pingo.....   | 51 |
|   | Preparo das amostras de água.....  | 52 |

|   |    |
|---|----|
| Análises Microbiológicas.....   | 52 |
| Contagem de Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i> .....           | 52 |
| Contagem total de mesófilos aeróbios.....                               | 52 |
| Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> .....                          | 52 |
| Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva.....        | 52 |
| Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....                         | 53 |
| Pesquisa de <i>Salmonella sp.</i> .....                                 | 53 |
| Contagem de Bactérias Ácido Lácticas.....                               | 53 |
| Determinação da contagem de células somáticas em amostras de leite..... | 53 |
| Determinação da acidez em Graus Dornic (D <sup>o</sup> c).....          | 53 |
| Resultados e Discussão.....   | 54 |
| Conclusões.....   | 62 |
| Referências.....  | 63 |

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A produção de queijo artesanal a partir de leite cru é uma atividade tradicional em vários municípios de Minas Gerais. Essa atividade, além de ser a principal atividade geradora de renda dessas regiões, caracteriza a identidade sócio-cultural do Estado (FURTADO, 1980).

A fabricação tradicional do Queijo Minas Artesanal do Serro se caracteriza pela adição ao leite cru, recém-ordenhado, de um fermento endógeno (“pingo”), coletado e adicionado para direcionar a fermentação. Hoje, os queijos artesanais ainda são produzidos pela mesma técnica de fabricação usada pelos antepassados, mas vê-se a necessidade de adaptações para adequar esse importante produto às normas higiênicas e sanitárias estabelecidas pela legislação. Por ser um produto bastante manipulado e produzido com leite cru, o queijo Minas Artesanal pode gerar consequências graves à saúde pública pela possibilidade de veiculação de micro-organismos patogênicos e/ou suas toxinas.

Na tentativa de evitar possíveis intoxicações através seu consumo, a legislação brasileira (BRASIL, 2000 (Resolução nº7)) permite a comercialização do queijo produzido com leite cru, desde que maturado por 60 dias a uma temperatura superior a 5°C. No entanto, esse longo período de maturação inviabiliza a comercialização do produto, quanto a aspectos econômicos, pelo pequeno produtor, assim como influencia a descaracterização sensorial do queijo. Já o produto comercializado fresco e refrigerado, como ocorre na maioria das vezes, geralmente não atinge os limites microbiológicos estabelecidos pela legislação (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004; MARTINS, 2006).

Martins (2006) avaliou o efeito da maturação sobre as características microbiológicas do queijo do Serro armazenado a duas temperaturas, ambiente e sob refrigeração, por um período de 64 dias e constatou que, em média, um período de 17 dias a temperatura ambiente (25°C) foi suficiente para enquadrar os queijos nos parâmetros da Legislação Estadual nº14.185, MINAS GERAIS (2002), específica para queijos artesanais, produzidos no Estado de Minas Gerais. No entanto, para as mesmas características, no queijo mantido a temperatura de refrigeração, a adequação só foi observada com 63 dias de maturação. Resultados semelhantes foram encontrados por Dorez (2007), ao estudar o efeito da maturação sobre as características microbiológicas do queijo Minas Artesanal da Canastra, cujos resultados mostraram que os queijos mantidos à temperatura ambiente atingiram mais rapidamente os padrões mínimos exigidos pela legislação vigente, sendo que a espécie *Staphylococcus aureus* foi a que permaneceu por mais tempo em contagens mais altas, fato que definiu o tempo mínimo de 22 dias necessário para a maturação dos queijos. Por sua vez, os

queijos maturados sob refrigeração só atingiram os padrões permitidos pela legislação aos 35 dias.

É de interesse de todos os envolvidos na cadeia produtiva do queijo artesanal conhecer os efeitos da maturação sobre a modulação da microbiota patogênica, para que melhorias na sua qualidade sejam alcançadas, através do direcionamento das adequações necessárias nas propriedades rurais, bem como a capacitação dos produtores tendo como objetivo a legalização do comércio.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características microbiológicas do queijo Minas Artesanal do município do Serro durante a sua maturação.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 Queijo artesanal do Serro

Minas Gerais se destaca como o mais importante Estado produtor de queijos artesanais do Brasil. É uma atividade que acrescenta 70 mil toneladas/ano à oferta nacional e mantém em torno de 27 mil produtores envolvidos. Desses, 9.445 são produtores rurais de quatro regiões (Serro, Cerrado, Serra da Canastra e Araxá) caracterizadas que produzem, anualmente, 29.005 mil toneladas de queijo/ano (EMATER, 2009), em 46 municípios, gerando 26.792 empregos diretos (EMATER, 2004b). A presença do queijo artesanal se espalha por 519 dos 853 municípios mineiros (CERRI, 2002).

Na região do Serro, 881 produtores colocam anualmente no mercado 3.106 toneladas de queijo artesanal, o qual se constitui o principal produto da região. Essa atividade gera 2.290 empregos diretos (EMATER, 2003).

A cidade do Serro irradiou a produção de queijo que leva o seu nome para as regiões vizinhas. Fica localizada numa região montanhosa, na vertente oriental da Serra do Espinhaço, entre os paralelos 18° e 19° de latitude Sul na região do Alto do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais (EMATER, 2002). O início de fabricação do queijo típico da região do Serro remonta ao período colonial, quando os mineiros começaram a colocar em prática uma herança portuguesa. Na época do garimpo (Século XVIII), garimpeiros vindos de Portugal em busca do ouro, passaram a fabricar o queijo com o mesmo processamento do queijo da Serra da Estrela, feito a partir de leite de ovelha. Em Minas, passou a ser produzido com leite de vaca para consumo próprio. Em razão da dificuldade de acesso, os produtores tinham que conservar o fermento, estabelecendo-se assim a prática da utilização do pingo (MUNDO DO LEITE, 2003).

O pingo é uma porção de soro fermentado originado do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior e que é coletado em vasilhames para ser utilizado como fermento, sendo, portanto, responsável pelas características sensoriais tradicionais e peculiares do queijo Minas Artesanal (LEITE, 1993). A fabricação do queijo Minas Artesanal do Serro é doméstica e desprovida de mecanização, sendo o local de produção chamado de casa de queijo ou quarto de queijo e, geralmente, localiza-se ao lado do curral, ligado a ele por uma janela.

Como o queijo Minas Artesanal do Serro é fabricado a partir de leite cru e não é submetido a tratamento térmico, o risco de ser veiculador de microrganismos patogênicos resulta em importante questão de saúde pública (PINTO et al., 1996; LOGUERCIO & ALEIXO, 2001). A Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro comercial 50% da

produção de queijo Minas Artesanal do Serro que, além do mercado local, mantém um entreposto de distribuição do produto na CEASA, em Belo Horizonte, e os outros 50% são entregues pelos produtores a intermediários, que podem destinar o produto ao mercado da capital, como a outros municípios ou, ainda, ao comércio varejista do Serro (BORELLI, 2006).

Através de acordo entre produtores e poder público, garante-se a adoção de cuidados em relação à sanidade dos rebanhos, adequações na estrutura e práticas de higiene na ordenha e nas queijarias, além da utilização de água abundante e potável durante a produção do queijo. Os critérios relativos aos cuidados mencionados são estabelecidos por Leis Estaduais, aprovadas no ano de 2002 que, associadas a processos de formação dos produtores e atenção redobrada à sanidade dos rebanhos, garantem a qualidade sanitária dos queijos. Nesse sistema, ao invés de adotar um processo térmico, como a pasteurização do leite, que elimina não só possíveis bactérias patogênicas, mas também as bactérias lácticas que conferem as características organolépticas desejáveis aos queijos, adota-se a postura responsável de prevenção através de cuidados com o rebanho e com as práticas e procedimentos de ordenha adotados desde o manejo do gado, passando pela ordenha e produção, até a maturação do queijo. Dessa forma, atende-se ao objetivo de conjugar a tradição da produção com as práticas produtivas que visem à segurança alimentar dos consumidores de queijo artesanal de Minas (MENESES, 2006).

## **2 Fabricação do queijo do Serro**

O processo de fabricação do queijo do Serro é artesanal e segue normas regulamentadas que abrangem a produção de queijos artesanais produzidos a partir de leite cru, beneficiados nas queijarias das propriedades rurais, sem utilização de técnicas industriais (Lei Estadual n.º 4.185/2002). Cada produtor segue o caderno de normas disponível na Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro com todas as recomendações referentes ao modo de se fazer o queijo artesanal, uma forma de tornar o produto uniforme mantendo suas características.

Imediatamente após a ordenha, que pode ser manual ou mecânica, o leite passa pelo processo de filtragem, feito por meio de filtro ou tecido sintético; em seguida, o leite é transferido para o tanque de fabricação, quando são adicionados o “pingo” e o coalho. O “pingo”, também conhecido como cultura endógena, é definido como fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados, coletado de um dia para outro, sendo, portanto, um soro

fermentado com certa quantidade de sal, que pode agir como inibidor de algumas fermentações indesejáveis e que confere ao queijo características físico-químicas e organolépticas específicas (FERREIRA, 2002). Após a coagulação, a coalhada é deixada em repouso por cerca de cinco minutos, seguido de agitação lenta de, aproximadamente, meia hora, até a obtenção da massa firme. A partir daí, é eliminada parte do soro e feita a compressão da massa nas fôrmas, com as mãos. A salga é realizada primeiro em um lado do queijo e, após duas horas, no outro lado. O pingo é coletado em recipiente higienizado, de um dia para o outro, para ser usado na próxima fabricação.

Os queijos são tirados da fôrma no dia posterior, maturados por um período que varia de três a cinco dias, dependendo da preferência do consumidor e, enfim, levados para o comércio.

O queijo Minas Artesanal do Serro possui formato cilíndrico, com aproximadamente 14 cm de diâmetro e altura variando de quatro a seis cm. A casca é normalmente esbranquiçada, tendendo a se transformar numa crosta fina e amarelada quando o queijo é maturado por alguns dias (FURTADO, 1980).

### **3 Legislações do queijo Minas Artesanal**

Com o objetivo de resguardar a segurança alimentar dos consumidores, o Governo do Estado de Minas Gerais lançou leis específicas para os queijos Minas Artesanais (Minas Gerais, 2002), que estabelecem critérios de funcionamento e controle da produção desses queijos, as quais seguem os mesmos critérios microbiológicos estipulados pela Legislação Federal (BRASIL, 1996) para queijos industriais de alta umidade. Além de determinar parâmetros microbiológicos, a lei estadual estabelece critérios de qualidade no processamento, na obtenção da matéria-prima, da água e adequação das queijarias, currais, equipamentos, utensílios e manipuladores (DORES, 2007).

A Lei Estadual (Minas Gerais, 2002) define o queijo Minas Artesanal como sendo todo queijo confeccionado conforme a tradição histórica e cultural da região do Estado onde for produzido, a partir do leite integral da vaca, fresco e cru, sem nenhum tratamento térmico, retirado e beneficiado na propriedade de origem, que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corante e conservantes. Conforme a mesma Lei, o início do processamento do queijo Minas Artesanal deve ser até noventa minutos após o começo da ordenha e, na fabricação, devem ser utilizados como ingredientes culturas lácticas naturais como “pingo” (soro fermentado), coalho e sal.

As boas práticas agropecuárias regulam a produção do queijo Minas Artesanal por meio de quatro portarias do Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA: Portaria n.º 517, de 14 de junho de 2002, que estabelece normas de defesa sanitária para rebanhos fornecedores de leite para a produção de queijo Minas Artesanal; Portaria n.º 518, de 14 de junho de 2002, que dispõe sobre requisitos básicos das instalações, materiais e equipamentos para a fabricação do Queijo Minas Artesanal; Portaria n.º 523, de 23 de julho de 2002, que estabelece normas sobre as condições higiênico-sanitárias e as boas práticas de manipulação e fabricação; Portaria n.º 818/2006, que regulamenta a produção do queijo Minas Artesanal.

Além das portarias, há o Decreto n.º 44864/2008 - Altera o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal: Produção de leite coletiva para a fabricação de queijo (assentamentos e grupos de produtores); altera parâmetros físico-químicos e microbiológicos; determina parâmetros para análises de água; define transporte, embalagem e período de maturação.

#### **4 Microrganismos presentes em queijos**

Os derivados de leite, principalmente os queijos, são alimentos altamente nutritivos, ideais para o crescimento de microrganismos patogênicos como também os microrganismos deteriorantes. *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* (*E.coli*) O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) são alguns exemplos de microrganismos patogênicos associados a surtos de toxinfecções alimentares, nos quais leite e produtos lácteos foram envolvidos (HAJDENWURCEL, 2002).

De acordo com Sena (2000), os queijos fabricados com leite cru e sem controle higiênico sanitário satisfatório podem resultar em contaminação microbiana, inclusive por *S. aureus* e *E.coli*, o que representa perigo à saúde do consumidor. Vários trabalhos realizados sobre a qualidade microbiológica dos queijos artesanais (SENA, 2000; BORELLI, 2006; MARTINS, 2006; ORNELLAS, 2005) mostram que os produtos se encontravam em condições higiênicas insatisfatórias. Entre os microrganismos potencialmente capazes de contaminar esses queijos, destacam-se a *E. coli*, o *Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp. e suas toxinas e *Listeria monocytogenes* (JAY, 2005).

#### 4.1 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* está amplamente distribuído na natureza e já foi isolado de diferentes locais como solo, água, vegetais, alimentos crus e processados, no leite cru, queijo, assim como de humanos e animais portadores sadios da bactéria que não apresentam nenhum sinal clínico da doença (KAMPELMACHER & JANSEN, 1972).

A espécie patogênica é *Listeria monocytogenes*, sendo os alimentos os principais veículos. Uma importante característica dessa espécie é a capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, entre 2°C a 4°C, e pode sobreviver por mais de 100 dias a 4°C. É capaz de se multiplicar em intervalos de temperatura entre 2,5°C e 44°C, em concentrações entre 10,5% e 30,5% de NaCl. O intervalo de pH ótimo é de 6 a 8, mas essa espécie pode crescer entre 5 e 9. Pode se desenvolver em alimentos em  $a_w$  baixa (0,83) (JAY, 2005). A espécie *Listeria monocytogenes* já foi isolada de 42 diferentes espécies de mamíferos e de várias espécies de aves, peixes e insetos (SWAMINATHAN et al., 1995).

Segundo a Comissão Internacional para Especificações Microbiológicas de Alimentos ICMSF (1996), o microrganismo pode ser isolado de materiais contaminados como a água destilada ou caldo nutritivo depois de um longo período de incubação (semanas ou meses) sob temperatura de refrigeração, onde possivelmente pode multiplicar-se.

Com relação à doença causada por esses agentes, essa ocorre em casos esporádicos ou em surtos epidêmicos e, nas duas situações, os alimentos contaminados são os veículos responsáveis pela transmissão da doença ao homem (MURRAY et al., 1995). *Listeria monocytogenes* caracteriza-se por ser patogênica, principalmente para indivíduos imunologicamente debilitados, como crianças e idosos. Em mulheres grávidas, pode ocorrer aborto, parto prematuro ou septicemia neonatal (MARCO et al., 2000; MARTÍN et al., 2004). Os sintomas mais comuns são febre, fadiga, mal-estar, náusea, vômitos, dores e diarreia (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

O uso de leite cru na fabricação de queijos levanta particular interesse na saúde pública em razão da possibilidade de incidência de *Listeria monocytogenes* (PINTADO et al., 2005). As legislações estaduais e federais exigem ausência desse patógeno em 25g de amostra de queijo. De acordo com Silva et al. (1998), existem poucos estudos sobre *Listeria monocytogenes* em queijos fabricados no Brasil e as informações sobre ocorrência de casos clínicos ou surtos de listeriose associados ao consumo de algum alimento são escassas. Martins (2006), Pinto (2004) e Araújo (2004) não encontraram *Listeria sp.* em nenhuma das amostras de queijos Minas Artesanais analisadas nas regiões do Serro e Araxá. Entretanto,

Ornellas (2005) confirmou a incidência de 2,5% em queijos artesanais por esse microrganismo. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira (1993), Cordano & Rocourt (2001) e Pak et al. (2002) em outros tipos de queijos.

#### 4.2 *Staphylococcus aureus*

Os produtos lácteos são frequentemente envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares em todo o mundo. Muitos microrganismos patogênicos podem ser veiculados ao homem através do consumo de leite e seus derivados, entre eles a bactéria *Staphylococcus aureus* (FILHO, 2000). O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. A contaminação de alimentos com *S. aureus* deve-se primariamente à sua presença na matéria-prima, apesar de um grande número de surtos de toxinfecções alimentares envolverem cepas de origem humana como fontes de contaminação. A cavidade nasal é o principal habitat dos estafilococos no homem e sua presença em manipuladores assintomáticos está bem documentada (HATAKKA et al., 2004; FIGUEROA et al., 2002; ACCO et al., 2003) e contribui para a contaminação de produtos lácteos.

Os *S. aureus* são considerados os mais importantes na epidemiologia de mastites em vacas de leite e o patógeno mais abundante em leite cru (OLIVEIRA et al., 2000; AKINEDEN et al. 2001; VINTOV et al., 2003.)

Os estafilococos podem produzir doença tanto por sua capacidade de multiplicação e disseminação ampla nos tecidos, como pela produção de substâncias extracelulares, como a enterotoxina, que é uma causa importante de intoxicação alimentar, sendo produzida, principalmente, quando certas cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em alimentos contendo carboidratos e proteínas (FRAZIER & WESTHOFF, 1988). Enquanto as células de *S. aureus* são termolábeis e facilmente eliminadas por processos moderados de temperatura, as enterotoxinas são termoestáveis e resistentes a temperaturas normalmente utilizadas no processamento de produtos lácteos (FREITAS & MAGALHÃES, 1990).

O *S. aureus* é frequentemente pesquisado em alimentos, sendo o queijo um dos principais veículos causadores de toxinfecção alimentar, pois sua presença está associada a práticas de higiene e manipulação inadequadas (REIBNITZ et al., 1998).

Sabioni et al. (1994) citam casos de intoxicação estafilocócica causada por queijo Minas Frescal, assim como Anunciação et al. (1994), que relataram a presença de enterotoxina estafilocócica também em queijo Minas Frescal em todas as amostras testadas com contagens de  $10^4$  UFC/g". Carmo et al. (2002) relataram surtos de intoxicação após

ingestão de queijo e leite “*in natura*” no Estado de Minas Gerais, envolvendo 328 pessoas e tendo como agentes etiológicos envolvidos *S. aureus* e *S. epidermidis* (coagulase negativa). Em outro estudo, Veras et al. (2003) relataram vários surtos de intoxicação alimentar após a ingestão de queijos no Estado de Minas Gerais, provocados principalmente por *S. aureus*. No entanto, não se tem relatos de problemas dessa natureza em queijos produzidos com a tecnologia estabelecida para a produção dos queijos artesanais com uso de fermento endógeno.

Apesar de ser quase incomum a fatalidade de intoxicação alimentar estafilocócica, ela ocorre ocasionalmente em indivíduos debilitados imunologicamente, idosos e crianças em tenra idade (GONÇALVES & FRANCO, 1996). Esse microrganismo pode representar um risco à saúde humana quando o leite não é submetido à pasteurização (SANTOS et al., 1981), pois, além de produzir enterotoxinas termorresistentes (SILVA et al., 1997), possuem a capacidade de permanecer em um estado de injúria, do qual podem se recuperar quando o ambiente for favorável, e retornar ao estado fisiológico normal, multiplicando e produzindo enterotoxinas (ASSIS, 1990). Portanto, o seu crescimento deve ser evitado, para impedir a produção de enterotoxinas que podem causar intoxicação quando os níveis de *Staphylococcus aureus* no alimento ultrapassarem  $10^6$  UFC/g (CARMO et al., 2002). Já em estudos relacionados com queijos Minas Artesanais em três regiões do Estado de Minas Gerais, não foi detectada a presença de enterotoxina, apesar de a contagem de *Staphylococcus aureus*, em algumas situações, ter sido superior a  $10^7$  UFC/g (PINTO et al., 2004; PINTO, 2004 e ARAÚJO, 2004).

Métodos preventivos são as melhores opções para o controle de *Staphylococcus aureus* em leite e seus derivados já que, depois da contaminação, a redução do número desse microrganismo não garante a inocuidade do produto (GAYA et al., 1988). O leite cru, por possuir uma microbiota diversificada, com predomínio de bactérias lácticas, provavelmente promove uma proteção natural inerente ao sistema vivo (TO et al., 2004). Estudo com queijos artesanais de diversas partes do mundo indicam efeito antagonista de bactérias lácticas sobre *S. aureus*. (NUÑEZ et al., 1986).

#### **4.3 Coliformes a 30°C e Coliformes a 45°C**

Os grupos de Coliformes a 30°C e Coliformes a 45°C colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os humanos, e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos (CALCI et al., 1998). Apesar das controvérsias com

relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes, em geral a *Escherichia coli* e os *Enterococos*, têm merecido maior consideração (SHARF, 1972).

A definição de Coliformes a 45°C objetivou, em princípio, selecionar apenas os coliformes originários do trato gastrintestinal de humanos e de animais de sangue quente e inclui pelo menos três gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (JAY, 2005 e SILVA et al., 1997). Atualmente, sabe-se que algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* não são de origem fecal. Por esse motivo, a determinação de Coliformes a 45°C em alimentos é menos representativa como indicação de contaminação fecal do que a enumeração direta de *Escherichia coli*, embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não-fecais (SILVA et al., 1997).

Segundo Santos et al. (1995), a *Escherichia coli* enterotoxigênica é a causa comum de diarreia de viajante. Algumas cepas, ao serem ingeridas com alimentos, crescem no intestino e produzem toxinas que originam hipersecreção no intestino delgado; a luz intestinal é distendida pelo líquido, provocando hipermotilidade e diarreia que duram alguns dias (1 a 3 dias). O período de incubação é de 24 a 72 horas. Ocorre diarreia, vômito, mas não quadro febril.

Vários estudos realizados com queijo Minas Frescal têm permitido o isolamento de inúmeros patógenos de importância em Saúde Pública, destacando-se diversos sorogrupos de *Escherichia coli* (REID, 2001). Quando presentes nos alimentos podem ser responsáveis por doenças microbianas de origem alimentar ou toxinfecções alimentares (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Franco & Landgraf (1996), com base em fatores de virulência, manifestações clínicas e epidemiologia, dividiu as cepas de *Escherichia coli* patogênicas em cinco classes: EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica); EIEC (*E. coli* enteroinvasiva); ETEC (*E. coli* enterotoxigênica); EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica); e EAaggEC (*E. coli* enteroagregativa).

A *Escherichia coli* O157:H7 produz uma ou mais toxinas Shiga, muitas vezes chamadas de verocitotoxinas, sendo a mais comum a *E. coli* diarreica, isolada e identificada na América do Norte e na Europa. A *E. coli* O157, produtora de toxina Shiga (STEC), é implicada como a causa de pelo menos 80% dos casos de síndrome Urêmica Hemolítica na América do Norte, e também é comumente reconhecida como a causa de diarreia sanguinolenta em países desenvolvidos (BOPP et al., 1998). Assim, Ornelas et al. (2005) observaram o perfil microbiológico do queijo Minas Artesanal produzido na região da Serra

da Canastra (MG) e, de quarenta amostras analisadas, 50% atendiam aos padrões para coliformes a 35°C e 50% para coliformes a 45°C.

#### 4.4 *Salmonella* sp

O gênero *Salmonella* representa um grupo de bactérias, cuja maioria infecta uma ampla classe de animais e humanos e está disseminada em países de clima tropical e subtropical, o qual constitui uma das doenças mais importantes causadas pelo consumo de alimentos, causando no homem desordem intestinal e febre por dois a três dias (SILVA & GOMES, 2001; JAY, 2005). São bacilos gram-negativos, não esporulados, aeróbios facultativos, catalase positiva, oxidase negativa, em geral são móveis com flagelos peritríquios. O pH ótimo de crescimento está próximo à neutralidade, mas crescem a pH entre 4 e 9. A temperatura de crescimento está entre 7°C e 47°C (ótima entre 35°C e 37°C) e  $A_w$  mínima para crescimento de 0,94 (MENDONÇA et al., 2003; JAY, 2005).

As doenças causadas por *Salmonella* subdividem-se em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*, as febres entéricas, causadas por *Salmonella paratyphi* (A, B e C), e as salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas. Geralmente, os sintomas são caracterizados por diarreia, febre, dores abdominais e vômitos, aparecendo após 12 a 36 horas depois do contato com o microrganismo, que permanecem entre um e quatro dias (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Entre os alimentos que mais apresenta o risco a esta patogenicidade encontram-se os ovos, carnes de aves, produtos cárneos processados e produtos lácteos (MENDONÇA et al., 2003).

A legislação brasileira exige ausência de *Salmonella* em 25g de amostra de produtos lácteos e em outros produtos. Em estudos com queijos artesanais, Pinto (2004) e Ornellas (2005) não encontraram a presença de *Salmonella* nas amostras de queijos analisadas; enquanto Araújo (2004), em trabalhos realizados com queijos Minas Artesanais da região de Araxá, encontrou *Salmonella* sp. em 7 das 37 amostras analisadas. Martins (2007) encontrou a presença de *Salmonella* sp. em uma das oito amostras de queijos Artesanais da região do Serro e Feitosa et al. (2003) encontraram em queijos Coalho e Manteiga a presença de *Salmonella* sp. em 9% e 15% das amostras analisadas, respectivamente.

#### 4.5 Bactérias Lácticas

Uma grande variedade de espécies microbianas participa da constituição dos queijos. A população total supera geralmente  $10^9$  UFC/g. Esse número varia muito pouco ao longo da maturação; contudo, o equilíbrio entre os distintos grupos microbianos e, por consequência, a importância relativa das populações, está em constante evolução. Esse equilíbrio depende das condições de crescimento próprias de cada grupo. As características físico-químicas do meio (pH) e do ambiente (temperatura e composição da atmosfera) são definitivas no que se refere à evolução dos grupos microbianos. Ainda entre os diferentes micro-organismos pode-se observar fenômenos de associação, estimulação e inibição (ECK, 1987).

Um dos principais papéis das bactérias lácticas é desenvolver as propriedades organolépticas dos alimentos fermentados. Por meio da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as bactérias lácticas transformam os nutrientes fundamentais dos produtos agrícolas em compostos com propriedades organolépticas complexas. Tais atividades permitem às bactérias lácticas alterar as estruturas e o aroma dos alimentos fermentados e contribuir para o desenvolvimento das suas qualidades gastronômicas. (JAY, 2005).

As bactérias lácticas têm grande importância econômica já que, de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Suas atividades metabólicas não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis como também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000a). As bactérias lácticas empregadas na fermentação de alimentos são capazes de prevenir ou reduzir a contaminação por microrganismos deteriorantes e/ou patogênicos, por meio da produção de vários agentes antimicrobianos. Além das bactérias lácticas, outros microrganismos são capazes de produzir bacteriocinas: desde Gram negativos, como *Escherichia coli* produtora de colicinas, até outros microrganismos Gram positivos, como algumas espécies de *Staphylococcus*. Entretanto, as bactérias lácticas são consideradas atualmente os microrganismos produtores de bacteriocinas mais importantes (CARR et al., 2002).

As bacteriocinas são peptídeos ou proteínas sintetizados no ribossomo e liberados no meio extracelular que apresentam ação bactericida ou bacteriostática sobre bactérias gram-positivas, dentre elas, importantes patógenos de veiculação alimentar, como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (HERNÁNDEZ et al., 2005).

A acidificação é, provavelmente, o fator primário na preservação de produtos de fermentação láctica. Entretanto, outros compostos, como diacetil, dióxido de carbono, peróxido, etanol e bacteriocinas, podem exercer ação inibitória sobre diferentes grupos microorganismos (HELANDER et al., 1997). Essa atividade ocorre devido ao crescimento competitivo com outros microorganismos nos alimentos, potencializado pelos efeitos inibitórios de seus metabólitos (MARTINIS et al., 2003). A sua principal produção, o ácido láctico, associado aos outros ácidos, como acético e propiônico, gera no alimento uma acidez que usualmente não é favorável à multiplicação e sobrevivência de bactérias gram-positivas e negativas, bem como de fungos e leveduras (GUERRA & BERNARDO, 2001). Alguns desses compostos também são responsáveis pelas características organolépticas dos queijos e ao mesmo tempo inibem parte dos micro-organismos da microflora indesejável (RACAH et al., 1979). Tradicionalmente, fazendeiros de várias partes do mundo fabricam queijos a partir de leite de vaca, cabra e ovelha em pequena escala, usando o fermento natural, o qual contém bactérias lácticas. Culturas com essas bactérias são produzidas incubando o leite ou o soro remanescente da última fabricação sob condições específicas (FOODS FROM SPAIN, 2009).

De acordo com Furtado (1991), as bactérias lácticas contidas no fermento transformam a lactose em ácido láctico, evitando assim que a lactose seja utilizada como substrato para fermentações indesejáveis e inibindo, com o abaixamento do pH, o crescimento de certos microorganismos patogênicos e /ou alteradores, como Coliformes e *Escherichia coli*.

Determinadas bactérias lácticas utilizam, preferencialmente, a lactose como fonte de carbono, tendo como produtos de seu metabolismo diversas substâncias antimicrobianas, como: ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído e bacteriocinas, que atuam favoravelmente no produto alimentício ao qual foram adicionadas, fazendo parte dos microorganismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro. São denominados microorganismos probióticos, apresentando um amplo espectro de ação contra microorganismos patogênicos e deteriorantes (NAIDU & CLEMENS, 2000).

Nos últimos anos, tem-se aumentado o interesse na caracterização genética das bactérias lácticas. Muitas técnicas têm sido desenvolvidas de modo a criar métodos para promover a mudança genética desses microorganismos, com o objetivo principal de acelerar a maturação dos queijos (SODA, 1993). A cada ano surgem pesquisas sobre as propriedades antimicrobianas dessas culturas sobre microorganismos patogênicos (KATLA et al., 2001; WOUTERS et al., 2002; GIRAFFA, 2003).

Em estudo conduzido por Vlaemynck et al. (2003), foram isoladas duas bacteriocinas produzidas por *Enterococcus faecium* com atividade inibitória sobre *Listeria monocytogenes*.

Usando culturas iniciadoras produtoras de bacteriocinas, ou adicionando bacteriocinas purificadas aos alimentos, é possível reprimir o crescimento de alguns patógenos ou deteriorantes alimentares e, assim, aumentar a segurança microbiológica e o tempo de vida útil do produto. Assumindo-se que bactérias lácticas ocorrem naturalmente em muitos alimentos fermentados, suas bacteriocinas podem ser facilmente aceitas como bioconservantes pelas autoridades da saúde e pelos consumidores (ROSA et al., 2009). Em geral, para que uma bacteriocina possa ser empregada na indústria de alimentos deve cumprir alguns requisitos como: a linhagem produtora deve ter status GRAS (Generally Recognized As Safe); a bacteriocina deve apresentar amplo espectro de inibição sobre os principais patógenos de alimentos ou ser altamente específica sobre algum deles; deve ser termoestável; não pode apresentar risco à saúde do consumidor; deve ter efeito benéfico sobre o produto, aumentando sua segurança, sem afetar a qualidade nutricional e sensorial (HOLZAPFEL et al., 1995).

## **5 O processo de maturação dos queijos**

A maturação dos queijos corresponde à fase de transformação física, química e microbiológica, que se processam tanto na periferia como no interior da massa, sob a ação de enzimas lipolíticas e proteolíticas, a maior parte de origem microbiana, sendo um fenômeno bastante complexo, pois varia de queijo para queijo (PERRY, 2004; BEHMER, 1985).

Entre os principais componentes resultantes do processo de maturação estão os aminoácidos, aminas, ácidos, tióis, tioésteres de proteínas; ácidos graxos, metilcetonas, lactonas e ésteres de lipídeos; ácidos orgânicos, como o lático, acético e propiônico; dióxido de carbono, ésteres e alcoóis da lactose, sendo esses os principais responsáveis pelas características sensoriais e físicas de cada tipo de queijo (FOX, 1993).

### **5.1 Lipólise**

A hidrólise da gordura causada por enzimas é denominada lipólise. Essas enzimas podem ser provenientes do próprio leite, dos microrganismos endógenos, do fermento adicionado, ou, ainda, de preparações enzimáticas usadas durante a fabricação, sendo resultantes produtos como ácidos graxos voláteis de cadeia curta que incluem o butírico, capríco, caprílico e cáprico (ROBINSON, 1987).

A lipólise é importante na formação do aroma, porém não altera a textura do queijo. Na maioria dos queijos, a lipólise não é extensa, sendo um pouco mais significativa para queijos oriundos de leite cru (FOX, 1993). As lipases ativas no queijo provêm de microrganismos e das lipases naturais do leite, sendo essas últimas inativadas por valores de pH inferiores a 6,5 e por temperaturas elevadas. A lipólise nos queijos é influenciada pelo aumento de temperatura, população alta de bactérias psicotróficas e homogeneização do leite (WASTRA, NOOMEN e GEURTS, 1999).

## 5.2 Proteólise

Consiste na degradação das proteínas em produtos mais e mais solúveis, e é o principal e mais complexo evento bioquímico que ocorre durante a maturação da maioria das variedades de queijo. Nesse processo, a caseína é hidrolisada a peptídeos de alto, médio e baixo peso molecular, aminoácidos, amidas e amônias, por enzimas proteolíticas (FARKYE, 1995), cuja procedência pode ser do próprio leite, das bactérias que contaminam o leite, do coalho ou enzima coagulante, das bactérias lácticas ou mo da microbiota secundária (SOUSA; ARDO e McSWEENEY, 2001).

A proteólise contribui para as modificações ocorridas textura, por meio da quebra da rede protéica, diminuição da atividade de água, formação de novas ligações entre a grupos carboxilas e aminas liberados e, com o aumento do pH, principalmente para variedades de queijos maturados por fungos, o que facilita a liberação de compostos aromáticos. Sua contribuição direta para o sabor ocorre mediante a formação de peptídeos e aminoácidos livres, assim como a liberação de substratos (aminoácidos) para reações de transaminação, deaminação, descarboxilação, dessulfuração, catabolismo de aminoácidos aromáticos e reações de aminoácidos com outros compostos (SOUSA; ARDO e McSWEENEY, 2001). O teor de sal afeta diretamente a proteólise, pois inibe o desenvolvimento das bactérias lácticas, o que diminui a produção de enzimas proteolíticas. (KINDSTEDT, 1993).

## Referências

- ACCO, M.; FERREIRA, F.S.; HENRIQUES, J.A.P. et al. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v.20, p.489-493, 2003.
- AKINEDEN, Ö.; ANNEMULLER, C.; HASSAN, A.A. et al. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p.959-964, 2001.
- ANUNCIACÃO, L.L.C., LINARDI, W.R., CARMO, L.S. et al. Production of staphylococcal Enterotoxin A in white cheese. **Revista de Microbiologia**, v.5, n.1, p.68-71, 1994.
- ARAÚJO, R.A.B.M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da região de Araxá**. 2004. 148f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- ASSIS, E.M.de. **Comportamento de *Staphylococcus aureus* e formação de injúria durante o período de comercialização dos queijos Minas e Mussarela**. 1990. 95p. Dissertação de Mestrado, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras.
- BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite – Produção, industrialização e análise**. 15.Ed. São Paulo: Ed. Nobel, 1985.
- BOOP, C.A.; BRENNER, F.W.; WELLS, J. et al. *Escherichia, Shigella* and *Salmonella*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A. et al. **Manual of clinical microbiology**. Washington DC: ASM, 1999. p.459-466.
- BORELLI, B.M. **Melhoria da qualidade do queijo Minas Artesanal**. Belo Horizonte: Fundação CETEC, 2006. 19p. (Dossiê Técnico).
- BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p.3977- 3986.
- CALCI, K.R.; BURKHARDT III, W.; WATKINS, W.D. et al. Occurrence of malespecific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human-associated wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, n.12, p.5027-5029, 1998.

CARMO, L.S. do; DIAS, R.S.; LINARDI, V.R. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw Milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, p.9-14, 2002.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a 1 survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370, 2002.

CORDANO, A.M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, p.175-178, 2001.

DORES, M.T.das. **Queijo minas artesanal da canastra maturado à temperatura ambiente e sob refrigeração**. 2007. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

ECK, A. O queijo. v.1. Portugal: Publicações Europa-América Ltda., 1987.

EMATER – MG. Ano XXII – Nº 77. Julho de 2003. p.16-17.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - EMATER. Documento de caracterização da região do Serro/MG como produtora de queijo Minas artesanal. Serro, outubro/2002.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL - EMATER. Caracterização da microrregião da canastra como produtora de queijo Minas artesanal. **Revista da EMATER/MG**. São Roque de Minas, 2004a.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DE MIN GERAIS – EMATER. Queijos tradicionais de Minas com mais qualidade. **Revista da EMATER/MG**, v.22, n.80, p.8-9, 2004b.

FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R. et al. Pesquisa de *Salmonella sp.*, *Listeria sp.* e microrganismos indicadores higiênico sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, p.162-165. 2003.

FERREIRA, C.L.L.F. Queijo: Mineiros tentam ajustar modernidade e produção artesanal. **Revista Globo Rural**, ano 17, n.200, p.41, 2002.

FIGUEROA, G.G. et al. Carriage of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food handlers. **Revista Médica do Chile**, v.130, n.8, p.859-864, 2002.

FILHO, E.S.A.; FILHO, A.N. Ocorrência de *S. aureus* em queijo tipo “frescal”. **Revista de Saúde Pública**, v.34, n.6, 2000.

FOODS FROM SPAIN. Disponível em: <[www.cheesefromspain.com](http://www.cheesefromspain.com)> Acesso em: 15 out. 2009.

FOX, P. F. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. Vol 1 – General aspects. London U. K. 1993A. Chapman & Hall, 2. Ed., 1993. 601 p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.46-50, 144.

FRAZIER, W. C., WESTHOFF, D. C. **Food Microbiology**. 4a ed. New York: Mc Graw-Hill, 1988. 494 p.

FREITAS, M.A.Q., MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**., São Paulo, v.21, n.4, p.315-19, 1990.

FURTADO, M.M. A qualidade do leite. In: **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Editora Globo, 1991, p.21-33.

FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.35, p.33-36, 1980.

GAYA, P.; MEDINA, M.; BAUTISTA, L. et al. Influence of latic starter inoculation, curd heating and ripening temperature on *Staphylococcus aureus* behavior in Manchego cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v.6, p.249-257, 1988.

GIRAFFA, G. Functionality of enterococci in dairy products. International journal of Food Microbiology. **International Journal of Food Microbiology**.p 216-222.2003.

GONÇALVES, P.M.R., FRANCO, R.M. *Coliformes fecais, Salmonella e Staphylococcus aureus* em queijo Minas Frescal. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária e Zootecnia**. v.3, n.1, p.5-9, 1996.

GUERRA, M.M.M.; BERNARDO, F.M.A. Caracterização de efeitos inibidores de *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do Alentejo. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.96, n.538, p.65-69, 2001.

HAJDENWURCEL, J.R. Produção segura na cadeia alimentar do leite. In:PORTUGAL, J.A. B. et al. (Ed.) **Segurança alimentar na cadeia do leite**. Juiz de Fora- MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., 2002. p.99–112.

HATAKKA, M. et al. Genotypes and enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* isolated from the hands and nasal cavities of flight-catering employees. **Journal of Food Protection**, v.63, n.11, p.1487-1491, 2004.

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative. **Trends in Food Science and Technology**, v.8, n.5, p.146-150, 1997.

HERNÁNDEZ, D.; CARDELLE, E.; ZÁRATE, V. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.6, p.77-84, 2005.

HOLZAPFEL, W. H.; GEISEN, R.; SCHILLINGER, U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.24, n.3, p.343-362, 1995.

I.C.M.S.F. **Microorganisms in Foods. Microbial Specifications of Food Pathogens**. Blackie Academic & Professional, Londres, Reino Unido. 1996. 431p.

JAY, J.M. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods OR, why did human listeriosis and hemorrhagic colitis become foodborne diseases? **Dairy Food and Environmental Sanitation**, Ames, v.15, n.11, p.674-677, 1995.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed., Porto Alegre, Artemedia. 2005. 711p.

KAMPELMACHER, E.H.; VAN NOORLEJANSEN, L.J.. Further studies on the isolation of *Listeria monocytogenes* in clinically healthy individuals. **Zentralblatt Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**. Abstrakt Originale v.221, p.70-77, 1972.

KINDSTEDT, P.S. Effect of manufacturing factors, composition and proteolysis on the functional characteristics of mozzarella cheese. **Critical Reviews in Foods Science**. v.33, p.167 – 187, 1993.

LEI ESTADUAL/MG Nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. D sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá Outras Providências. Belo Horizonte, 2002.

LEITE, M.O. **Isolamento e seleção de culturas lácticas nacionais resistentes a bacteriófagos para elaboração de queijo Minas curado.** 1993. 64f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

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

MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J.M. M.; SORRIBES, C.H. et al. **Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: definición, clasificación, caracterización y métodos de detección.** **alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000a.

MARCO, F.; ALMELA, M.; NOLLA-SALAS, J. et al. In Vitro Activities of 22 Antimicrobial Agents against *Listeria monocytogenes* Strains Isolated in Barcelona – Spain. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p.259-261, 2000.

MARTINS, J.M. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas Artesanal da região do Serro. 158 p. 2 6.** (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

MARTINS, E.C.P.; ALVES, V.F.; FRANCO, B.D.G.M. Bioconservação de alimentos: aplicação de bactérias lácticas e suas bacteriocinas para a garantia da segurança microbiológica de alimentos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.29, p.114-119, 2003.

MENDONÇA, R.C.S., VIEIRA, E.N.R., OLIVEIRA, K.A.deM. **Patógenos na indústria de carnes e derivados. In: Editado [por] Regina Célia San Mendonça... [e outros].** Microbiologia de Alimentos: qualidade e segurança na produção e consumo. Viçosa-MG: Tribuna Editora Gráfica, p. 21-48, 2003.

MENESES, J.N.C. **Queijo Artesanal de Minas: Patrimônio Cultural do Brasil.** Dossiê interpretativo. v.1. Belo Horizonte. 2006.

MUNDO DO LEITE. Produção, Industrialização e Consumo. **Revista Mundo do Leite**, n 04, DBO Editores. Maio de 2003.

MURRAY, P.R. et al. (eds.) **Manual of Clinical Microbiology.** 6.ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C. , Estados Unidos. 1995. 1482p.

NAIDU, A.S.; CLEMENS, R.A. **Probiotic: natural food antimicrobial systems**. Boca Raton: CRC, 2000. p.431-462.

NÚÑEZ, M.; GARCÍA-ASER, C.; RODRÍGUEZ-MARÍN, M.A. et al. The effect of ripening and cooking temperatures on proteolysis and lipólisis manchego cheese. **Food Chemistry**, 21:115-123, 1986.

OLIVEIRA, A. N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia** – Goiás. 1993. (Dissertação, Mestrado em Medicina Veterinária) –Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 1993.

OLIVEIRA, A. P. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Europe and the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 855-862, 2000.

ORNELA, E.A. et al. Perfil microbiológico de amostras de queijo minas artesanal produzidos na Serra da Canastra-MG. In:CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2005,Santos. Anais... Santos: Pró-Reitoria de Pós-graduaçãoe Pesquisa, 2005. p.15581-15581.

PAK, S.; SPAHR, U.; JEMMI, T. et al. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990 - 1999. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 53, p. 55 - 65. 2002.

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

PINTO, M.S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa,2004.

PINTO, P.S.A.; GERMANO, M.I.S.; GERMANO, P.M.L. Queijo Minas: problema emergente da vigilância sanitária. **Higiene Alimentar.**, v.10, p.22-27, 1996.

RACCAH, M., BAKER, R.C., REGENSTEIN, J.M. et al. Potencial Application of Microbial Antagonism to Extend Storage Stability of a Fresh Type of Food. **Journal Food Science**. 44: 43-46, 1979.

REIBNITZ, M.G.R., TAVARES, L.B.B., GARCÍA, J.A. Presencia de coliformes fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* coagulasa y DNAs a positivos en queso. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.30, n.1, p.8-12,1998.

REID, T.M.S.A. Case study of cheese associated *E. coli* O157 outbreaks. **Food and Nutrition**, p.201-212, 2001.

ROSA, M.C.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de Bactérias Lácticas. Disponível em ><http://www4.uninove.br/ojs/index.php/saude/article/view/156/149> < acesso em 20 jan. 2009.

SABIONI, J.G.; NASCIMENTO, D.; PEREIRA, J.L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo tipo Minas em Ouro Preto. **Revista Higiene Alimentar**, v.8, n.33, p.22-23, 1994.

SANTOS, E.C.dos; GENIGEORGIS, C. Potencial for presence and growth of *Staphylococcus aureus* in brazilian Minas cheese whey. **Journal of Food Protection**, n.3, v.44, p. 185-188, 1981.

SANTOS, F.A.; NOGUEIRA, N.A.P.; CUNHA, G.M.A. Aspectos microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em Fortaleza - Ceará. **B CEPPA**, v.13, n.1, p.31-36, 1995.

SHARF, J.M. **Exame microbiológico de alimentos**. São Paulo: Polígono, 1972. Cap.16: Índices de sanidade: p.173-186.

SILVA, F. T.; GOMES, C.A.O. Segurança alimentar de leite e derivados: Aplicação de BPF e APPCC. IN: PORTUGAL, J.A.B.; CASTRO, M.C.D.; SILVA, P.H.F. et al. (Ed.) **O agronegócio do leite e os alimentos lácteos funcionais**. Juiz de Fora-MG: Templo Gráfica e Editora Ltda., p.107-150, 2001.

SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, v.61, n.3, p.354-356. 1998.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 1. Ed. São Paulo-SP: Livraria Varela Ltda., 1997.

SODA, M.A.EL. The role of latic acid bacteria in accelerated cheese ripening. Microbiology reiwews (FEMS), v. 12, p. 329-252, 1993. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS. **Anais...** 2003, p. 218-219.

SOUSA, M.J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P.L.H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v.11, p. 327-345, 2001.

SWAMINATHAN, B.; ROCOURT, J.; BILLE, J. *Listeria*. In: MURRAY ; E.J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 6.ed. Washington: American Society for Microbiology (ASM), 1995.

VINTOV, J.; AARESTRUP, F.M.; ZINN, C.E. et al. Phage types and antimicrobial resistance among Danish bovine *Staphylococcus aureus* isolates since the 1950s. **Veterinary Microbiology**, v.97, n.1-2, p.63-72, 2003.

VLAEMYNCK, G.; HERMAN, L.; COUDIJZER, K. Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.24, p.211-225, 2003.

WASTRA, P.; NOOMEN, A.; GEURTS, T.J. Dutch – Types Varieties. In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. 2nd. Ed. Aspen Publishers Inc. Maryland. P.39-82,1999.

WOUTERS, J.T.M.; AYAD, E.H.E.; HUGENHOLTZ, J. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.12, n.2-3, p.91-109, 2002.

## **CAPÍTULO II**

### **QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO SERRO-MG: EFEITO DA SAZONALIDADE SOBRE A MICROBIOTA DO LEITE CRU**

## RESUMO

O leite utilizado para produção do queijo Minas Artesanal deve seguir padrões microbiológicos estipulados pela Lei Estadual n.º 14.185, que regulamenta a produção do queijo. No decorrer de um ano foi feita uma análise para avaliar a influência da sazonalidade nas características microbiológicas do leite cru utilizado para fabricação do queijo artesanal do Serro-MG. De acordo com os resultados, verificou-se que as variações sazonais não influenciaram as características do leite cru. As médias de aeróbios mesófilos foram menores no verão, com maiores médias no outono, período quando se excedeu os limites estabelecidos pela Legislação. Todas as amostras estavam dentro dos limites microbiológicos para Coliformes a 45° C, sendo as maiores médias encontradas no outono e, as menores, no inverno. Para a presença de Coliformes a 30°C, a maior média foi observada no outono e, a menor, no inverno. A média da contagem de células somáticas foi maior no período da primavera e menor no período de inverno. Em todas as estações, observou-se a contaminação de *Staphylococcus aureus* acima dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação, sendo observadas maiores médias no outono e menores médias na primavera. Os maiores valores de acidez foram observados na primavera e, os menores, no inverno, mas em todas as estações as médias se mantiveram dentro dos padrões.

**Palavras-chave:** bactéria, contaminação microbiológica, qualidade

## HANDMADE MINAS CHEESE OF A SERRO-MG MICROREGION: SEASONALITY EFFECT ON THE RAW MILK MICROBIOTA

### ABSTRACT

The milk used for the handmade Minas Cheese production must follow microbiological standards set by the State Law n° 14,1 which regulates the cheese production. During one year there was performed an analysis to evaluate the seasonality influence on the raw milk microbiological characteristics for the manufacture of handmade Serro-MG Minas Cheese. According to the results, it was found that seasonal variations do not influence the raw milk characteristics. The average aerobic mesophilic count were lower in summer and presented higher averages in autumn, a when it has exceeded the limits established by legislation. All samples were within the microbiological limits for coliforms at 45° C, being the highest averages found in autumn and lowest in winter. For the coliforms presence at 30°C the highest average was observed in autumn and lowest in winter. The average somatic cell counts were higher in spring and in winter. In all seasons, there was observed contamination of *Staphylococcus aureus* above microbiological standards required by legislation, with higher averages in the autumn, and lowest averages in the spring. The highest values of acidity were observed in spring lowest in winter, but in all seasons averages remained within the standards.

**Keywords:** bacteria, microbiological contamination, quality

## Introdução

Os parâmetros de qualidade do leite são cada vez mais detectados falhas nas práticas de manejo e de obtenção do leite, servindo como referência na valorização da matéria-prima. Em razão da possibilidade de contaminação por agentes patogênicos em etapas de produção, estocagem e transporte, a ingestão de leite cru e seus derivados pode representar um potencial risco aos consumidores (OLIVER et al., 2005). Assim, esses produtos são comumente associados a casos e surtos de toxinfecções alimentares causados por *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OLIVER et al., 2005; VAILLANT et al., 2005; DE BUYSER et al., 2001).

A produção de leite de boa qualidade é um desafio que pode ser alcançado desde que alguns cuidados sejam tomados na fonte de produção. De modo geral, os microrganismos patogênicos não sintetizam expressivamente as enzimas responsáveis pelas alterações nas características organolépticas e na composição do leite e, por isso, não causam comprometimento aparente na sua qualidade. Por esse motivo, a presença desses microrganismos no leite pode, muitas vezes, ser subestimada ou passar despercebida, o que é um fator gravíssimo se analisado sob o prisma da saúde pública (FONSECA & SANTOS, 2000).

Entre as características relacionadas com a qualidade do leite, destaca-se a qualidade microbiológica, que pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho e das condições gerais de manejo adotados na fazenda. (FONSECA & SANTOS, 2000). O leite utilizado para produção do queijo Minas Artesanal deve seguir padrões microbiológicos estipulados pela Lei Estadual (Minas Gerais, 2002), que regulamenta a produção do queijo.

A região do Serro é famosa pela cultura tradicional de produção do queijo artesanal fabricado com leite cru. A utilização do leite não pasteurizado para fabricação de queijos representa um grande perigo à saúde pública, pois aumenta consideravelmente a probabilidade de ocorrência de doses infectantes de bactérias patogênicas no produto destinado ao consumo (FERNANDES et al., 2006). Quando o leite é pasteurizado, tem-se uma redução no número de microrganismos presentes, diminuindo os riscos do produto final; já o leite cru pode servir como fonte primordial de contaminação para o queijo. A quantificação bacteriana do leite cru auxilia na avaliação dos procedimentos de ordenha e armazenamento na propriedade rural e, ao mesmo tempo, permite inferir os prováveis efeitos adversos sobre o rendimento industrial e segurança alimentar do leite.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da estação do ano sobre a qualidade microbiológica do leite cru utilizado para fabricação do queijo artesanal do Serro.

## **Material e Métodos**

### **Coleta e manutenção das amostras**

O trabalho foi realizado com seis produtores de queijo artesanal da região do Serro-MG. Foram coletadas amostras de leite no período de 12/12/2008 a 19/04/2010. Todas as amostras foram colhidas em frascos estéreis, acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportados aos Laboratórios de Análises Físico-Químicas do Departamento de Zootecnia e de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizada na cidade de Diamantina-MG.

### **Preparo das amostras**

Vinte e cinco mL de amostra de leite foram diluídos em 225 mL de Solução salina (0.85%) e posteriormente homogeneizadas. Foram feitas diluições decimais e em seguida os plaqueamentos para cada diluição.

### **Análises microbiológicas**

- **Contagem total de mesófilos aeróbios**

A contagem total de Aeróbios mesófilos foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade, em placas de petri, utilizando-se o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem – PCA . Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufas a 35°C, por 48 horas. Após esse período procedeu-se à contagem das placas e os resultados foram expressos em UFC/mL respectivamente (APHA, 2001).

- **Contagem de *Staphylococcus aureus***

Para as análises de *Staphylococcus aureus*, utilizou-se o Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate, (AOAC 981.15), de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante.

- **Contagem de *Escherichia coli***

Para a contagem de *Escherichia coli*, utilizou-se o método Oficial Petrifilm AOAC 991.14 Coliformes/*E.coli* (Contagem de Coliformes e *E. coli* em Alimentos, Película Reidratável Seca) de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante (3M Microbiology).

- **Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Para detecção da presença de *Listeria monocytogenes* utilizou-se a metodologia baseada no protocolo da ISO 11290-1. Uma alíquota de 25 mL de cada amostra foi adicionada a 225 mL de caldo Demi-Fraser com suplemento (Difco™) e incubada a 35°C por 24 h (1º enriquecimento). Em seguida, alíquotas do 1º enriquecimento foram semeadas por esgotamento em placas com Agar cromogênico CromoCen Listeria - Base ALOA (BioCen do Brasil), Agares Palcam e Oxford (Difco™) e também inoculadas (0,1 ml) em tubos contendo 10 ml de caldo Fraser com suplemento (Difco™), seguidas de incubação a 35°C por 48 horas (2º enriquecimento). Após incubação, alíquotas do 2º enriquecimento foram semeadas por esgotamento em placas com Agares cromogênico, Oxford e Palcam. Colônias típicas de *Listeria monocytogenes* foram submetidas à identificação bioquímica, por meio testes de produção de catalase, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), hemólise em Ágar Sangue de equino e motilidade a 25°C (PAGOTTO et al., 2001). Os resultados foram expressos como ausência/presença de *Listeria monocytogenes* em 25 mL de leite.

### **Análises físico-químicas**

- **Determinação da contagem de células somáticas**

Para a contagem de células somáticas utilizou-se um Contador Eletrônico de Células Somáticas DeLaval DCC (DeLaval Cell Counter).

- **Determinação da acidez em graus Dornic (°C)**

A determinação da acidez foi realizada através da titulação de 10 mL de leite com solução de NaOH (N/9) (solução Dornic) e 4 gotas de fenolftaleína como indicador (LUTZ, 2008).

### **Análise Estatística**

Para avaliar os resultados microbiológicos das amostras utilizou-se uma análise estatística descritiva.

## Resultados e discussão

Os resultados de aeróbios mesófilos, *Escherichia coli* (*E.coli*), Coliformes a 30°C, *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), Contagem de Células Somáticas (CCS) e Acidez estão apresentados abaixo.

Tabela 1 - Médias aritméticas dos parâmetros microbiológicos, em log UFC/mL, Contagem de células somáticas e acidez em Graus Dornic, nas diferentes estações do ano, para o leite cru utilizado para fabricação do queijo Minas Artesanal do Serro

| Estação    | Aeróbios mesófilos | <i>E. coli</i> | Coliformes a 30°C | <i>S.aureus</i> | CCS     | Acidez      |
|------------|--------------------|----------------|-------------------|-----------------|---------|-------------|
| Primavera  | 5,16               | 1,12           | 3,38              | 2,94            | 262.000 | 16,24       |
| Verão      | 5,04               | 1,15           | 3,13              | 3,13            | 240.488 | 16,17       |
| Outono     | 6,00               | 1,21           | 4,32              | 3,71            | 239.000 | 16,11       |
| Inverno    | 4,53               | 0,54           | 2,69              | 2,98            | 220.360 | 15,56       |
| Legislação | < 5,00             | < 2,00         | -                 | < 2,00          | 400.000 | 15°D - 20°D |

Na avaliação da qualidade microbiológica do leite cru, considerou-se como fora do padrão as amostras que apresentaram carga microbiana acima do estabelecido pela Lei Estadual n.º 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que determina os limites para o leite cru próprio para fabricação do queijo Minas Artesanal.

Os resultados de aeróbios mesófilos apresentaram-se menores no Verão, com maiores médias no Outono, período no qual se excedeu os limites estabelecidos pela Legislação. Essa contaminação pode ter ocorrido durante a ordenha, através da exposição e do contato do leite com bactérias provenientes do úbere, das tetas, do solo, fezes dos animais, das mãos e roupas do ordenhador, das instalações (piso, parede, teto), ordenhadeiras mecânicas, tanques de estocagem, baldes, ou até mesmo de panos usados para coar o leite ou secar o úbere. (FERNANDES et al, 2003). Segundo Fagan et al. (2008), a qualidade microbiológica do leite depende fundamentalmente da implantação de boas práticas na produção e menos das condições de infraestrutura e nível tecnológico da propriedade leiteira.

De acordo com a Lei n.º 14.185, a queijaria deve ficar distante de pocilgas, galinheiros e quaisquer outras fontes produtoras de mau cheiro que possam comprometer a qualidade do leite ou do queijo. Além disso, define-se que o acesso de animais e pessoas estranhas à produção deve ser impedido. No entanto, observou-se que a maioria dos produtores tem consciência desses problemas e estão dispostos a corrigi-los.

Uma elevada contagem de bactérias mesófilas pode indicar maior possibilidade de ocorrência de bactérias patogênicas (CARVALHO, 1999). Além disso, também constitui um

forte indicador de problemas que podem estar ocorrendo durante a ordenha e/ou durante armazenamento.

Todas as amostras estavam dentro dos limites microbiológicos para Coliformes a 45° C, sendo que as maiores médias foram encontradas no outono e, as menores, no inverno. A presença de Coliformes a 45°C, especialmente de *Escherichia coli* em índices condenatórios, além de mostrar as más condições higiênicas, evidencia a contaminação e a possibilidade de o produto veicular outros microrganismos patogênicos ao homem (PEREIRA et al., 1999). Para a presença de Coliformes a 30°C, a legislação não estabelece limite máximo de contagem de leite cru, sendo a maior média observada no outono e, a menor, no inverno.

A contagem de células somáticas pode ser um indicativo das condições de saúde da glândula mamária, ajudando no diagnóstico da mamite. Segundo Fonseca & Santos (2000), em animais sadios, 65% a 70% do total de células somáticas são de origem epitelial e, normalmente para esses animais, a contagem de células somáticas é inferior a 300.000 células/mL de leite. No entanto, havendo inflamação da glândula mamária, ocorre acentuado aumento das células somáticas presentes no leite.

A média da contagem de células somáticas observadas neste trabalho foi maior no período da primavera e menor no período de inverno, mas em todas as estações as médias não excederam o limite permitido pela legislação. As variações de células somáticas no leite se devem, principalmente, às práticas de manejo de ordenha. De acordo com os resultados deste trabalho, fica evidente que as variações climáticas têm pouca influência sobre a sanidade da glândula mamária e que as maiores variações observadas na primavera são provenientes de fatores ligados ao manejo de ordenha adotado nessa estação.

Em todas as estações foi observada a contaminação de *Staphylococcus aureus* acima dos padrões microbiológicos exigidos pela legislação, sendo observadas maiores médias no outono e menores médias na primavera. O gênero *Staphylococcus* é o agente responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo. A contaminação com *Staphylococcus spp.* pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana. Em condições favoráveis de temperatura, o micro-organismo cresce, podendo produzir toxinas. O controle das enterotoxicoses é possível desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos, pois a proteção contra essa enfermidade é considerada uma obrigação dos profissionais da área de alimentos e de saúde (STAMFORD et al., 2006).

Esse microrganismo pode representar risco à saúde do consumidor quando o leite não é submetido à pasteurização para seu consumo direto e para elaboração de seus derivados. Sua

importância está nas mudanças que provoca no leite e as substâncias que produz, as quais causam doenças no homem e nos animais. *Staphylococcus aureus* pode contaminar o leite por excreções provenientes de mastite clínica e subclínica ou por contaminação durante as etapas de seu manuseio (SCHERRER et al., 2004).

Trabalhos realizados por STAMFORD et al. (2006) evidenciam que, entre os *Staphylococcus*, a espécie *Staphylococcus aureus* é a mais prevalente para o leite *in natura*, sendo as espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intemedius* as que produzem enterotoxinas com maior frequência.

A acidez do leite é provocada principalmente pela multiplicação de microrganismos mesófilos e está associada às baixas condições de manejo higiênico-sanitárias adotado durante a ordenha. O leite dentro dos padrões de estabelecidos pela Lei Estadual nº 14.185 deve apresentar acidez titulável entre 15,0° a 20,0° graus Dornic. Os maiores valores de acidez foram observados na primavera e, os menores, no inverno, mas durante todas as estações as médias se mantiveram dentro dos padrões. Isso revela que o manejo higiênico dos equipamentos e os armazenamentos adotados em ambas as s foram admissíveis, evitando-se, assim, a multiplicação da flora microbiana restante. Os resultados encontrados deixam evidente que estações do ano não alteram a acidez do leite e que a acidificação do leite está relacionada à contaminação de microrganismos inicial e as condições de armazenamento do leite.

## Conclusões

As estações do ano não mostraram efeitos sobre os parâmetros microbiológicos do leite das seis fazendas.

A presença de *Staphylococcus aureus*, acima dos limites estabelecidos pela legislação, no leite cru, reafirma potenciais riscos quanto à presença de patógenos nesses produtos.

Observa-se que os principais contaminantes do leite cru utilizado para fabricação do queijo Minas Artesanal do Serro são os microrganismos mesófilos e os *Staphylococcus aureus*, o que indica deficiência na obtenção do leite.

Com relação à contagem de mesófilo, ela provavelmente se deve ao fato de esse microrganismo ser encontrado em diversos locais, o que dificulta uma redução satisfatória desse microrganismo no leite. Já os *Staphylococcus aureus* basicamente devem ser oriundos das mãos ou mesmo do úbere no momento da ordenha, sendo necessários maiores cuidados higiênicos nesse momento para que os produtores obtenham um leite que atenda aos limites microbiológicos atuais e para que ele não seja um veículo de contaminação do produto final.

## Referências

A. O. A. C. Extraneous Materials: Isolation. In: \_\_\_\_\_. Official Methods of Analysis, 14th ed., Washington, D.C., 1984. p.887–935.

APHA. American Public Health Association. For the Examination of Dairy Products. Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. **Requisitos microbiológicos de queijos**. Portaria nº 146/96. Brasília, 2002.

CARVALHO, E.P. de. **Microbiologia de alimentos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1999. 76p.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR. B.; MAIRE, M. et al. (2001) Implication of milk and milk-products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **International Journal of Microbiology**, v.67, p.1-17.

FAGAN, E.P.; TAMANINI, R.; FAGNANI, R.; BELOTI, V.; BARROS, M.A.F.; JOBIM, C.C. Avaliação de padrões físico-químicos e microbiológicos do leite em diferentes fases de lactação nas estações do ano em granjas leiteiras no Estado do Paraná – Brasil. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n.3, p. 651-660, jul./set. 2008.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F.de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.144, p.49-56, 2006.

FONSECA, L.F.; SANTOS, M.V. **Qualidade do Leite e Controle de Mastite**. São Paulo: Lemos Editorial, 2000, 175p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3.ed. São Paulo: IMESP, p.203-204, 2008.

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. (2005) Foodborne pathogens in Milk and dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.2, n.2, p.115-129.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J. et al. **Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. Health Canada's - Government of Canada [on-line] 2001.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.5, 1999.

SCHERRER, D.; CORTI, S.; MUEHLHERR, J.E. et al. Phenotypic and genotypic characteristic of *Staphylococcus aureus* isolated from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep. **Veterinary Microbiology**, v.101, p.101-107, 2004.

STAMFORD, T.L.M.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus spp.* isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.

VAILLANT. V.; VALK.H.; BARON.E.; ANCELLE.T.; COLIN.P.; DELMAS.M.C.; DUFOUR.B.; POUILLOT.R.; LE STRAT.Y.; WEINBRECK.P.; JOUGLA.E.; and DESENCLOS.J.C. Foodborne Infections in France. **Foodborne Pathogens and Disease**.v.2,n.3,2005.

### **CAPÍTULO III**

#### **QUEIJO MINAS ARTESANAL DA MICRORREGIÃO DO SERRO-MG: COMPORTAMENTO MICROBIOLÓGICO DURANTE A MATURAÇÃO**

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar características microbiológicas, durante o processo de maturação do queijo Minas Artesanal do Serro. Amostras provenientes de cinco fazendas foram estudadas, as quais incluíram: a água utilizada no processo de fabricação, o leite cru, o pingo e o queijo. Todas as amostras de água apresentaram contaminação por coliformes totais acima do valor máximo recomendado pelos padrões brasileiros. Nenhuma amostra de água apresentou contaminação por coliformes fecais. Duas das amostras de leite cru apresentaram contagem de mesófilos acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. Não foi verificada a presença de *Escherichia coli* em nenhuma amostra de leite e apenas uma amostra estava fora dos padrões para acidez. No pingo observou-se elevada contagem de microrganismos mesófilos e bactérias lácticas. No queijo, não houve efeito significativo entre as condições de maturação; no entanto, houve uma redução microbiológica ao longo da maturação, para os queijos mantidos refrigerados. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* não foram encontradas em nenhuma amostra. Amostras de do Serro, na primeira semana de maturação, mantidas refrigeradas, apresentaram contagens de coliformes a 30°C e *Staphylococcus aureus* superiores ao permitido pela legislação. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) para coliformes a 30°C ao longo do período de maturação para os queijos mantidos em temperatura ambiente (Tabela 4). No final de sete semanas de maturação, a contagem de coliformes a 30°C estava dentro dos padrões estipulados. O período de maturação de 63 dias não foi eficiente para tornar o produto seguro, pois ele apresentou um crescimento atípico, fato explicado pelas diversas variáveis envolvidas no processo de fabricação do queijo artesanal do Serro.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, maturação, mesofílicos, *Salmonella spp*

## HANDMADE MINAS CHEESE OF A SERRO-MG MICROREGION: MICROBIOLOGICAL PERFORMANCE DURING MATURATION

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate microbiological characteristics during the Serro handmade Minas Cheese maturation. There were studied samples from five farms and they included: water used in the manufacturing process, raw milk, natural yeast and cheese. All water samples had total coliforms counts above the maximum recommended by Brazilian standards. No water sample showed contamination by fecal coliforms. Two of the raw milk samples showed mesophilic counts above the limits allowed by Brazilian legislation. There was not detected the presence of *E. coli* in all samples of milk and only one sample was out of the standards for acidity. In the natural yeast it was observed high mesophilic counts and lactic bacteria. There was no significant effect of the maturation conditions. However, there was a microbial reduction during maturation for the refrigerated cheeses. No *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp* were found in any sample. Samples of Serro cheese on the first week of maturation, kept under refrigeration, showed coliform counts at 30°C and *Staphylococcus aureus* counts higher than allowed by legislation. There was no significant differences ( $p > 0.05$ ) for coliforms at 30°C during the maturation period for cheeses kept at room temperature (Table 4). At the end of seven weeks of maturation the coliform counts at 30 ° C was within the stipulated standards. The maturation period of 63 days was not enough to make the product safe, for it showed an atypical growth, a fact that can be explained by the different variables involved in the production process of Serro handmade cheese.

**Keywords:** *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, maturation, mesophilic, *Salmonella spp*

## Introdução

Os queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, por esse motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. Essas condições podem ser agravadas quando processados com leite cru, sem o emprego das boas práticas de fabricação e tecnologia adequada, ou sem se observar o tempo mínimo de maturação.

Para os produtores, a matéria-prima crua é a principal responsável pelo sabor e manutenção das características que garantem a aceitação do produto (BRANT et al., 2007). Para estudiosos, o queijo produzido artesanalmente pode funcionar como veículo de agentes patogênicos, principalmente quando as técnicas produtivas não obedecem às Boas Práticas de Fabricação (COLAK et al., 2007).

A etapa final no processo de fabricação do queijo Minas Artesanal é a maturação, a qual confere as características sensoriais apresentadas pelo produto, sendo utilizada como forma de assegurar boa aceitação do ponto de vista microbiológico, de acordo com os limites estabelecidos pela legislação vigente. A lei estadual estabelece o prazo de 60 dias de maturação para comercialização do queijo artesanal no Estado de Minas Gerais e a legislação federal (Brasil, 2000) estabelece o mesmo período de maturação de queijos produzidos com leite cru para comercialização entre diversos estados brasileiros.

A Lei Estadual nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (MINAS GERAIS, 2002a), possibilitou a legalização dos Queijos Minas Artesanal, determinando padrões microbiológicos de qualidade no processamento, obtenção da matéria-prima, água, adequação da queijaria, currais, equipamentos, utensílios e manipuladores. Uma vez adequados, torna-se necessário um acompanhamento sistemático, para possíveis ajustes tecnológicos, possibilitando, assim, um produto final seguro e de qualidade e, conseqüentemente, a criação de uma legislação federal que legalize e preserve o Queijo Minas Artesanal do Serro, cujo processamento foi tombado como primeiro bem imaterial do Estado de Minas Gerais.

A pesquisa microbiológica permite, muitas vezes, inferir as condições sob as quais um produto foi produzido, sendo fundamental como auxílio na garantia da saúde do consumidor. A fabricação de queijos, de modo geral, prevê a realização de diversas etapas tecnológicas, que requerem a manipulação do produto, sem que haja, por vezes, tratamentos eficientes para reduzir a carga microbiana (SPREER, 1991). Atualmente, quase que a totalidade dos queijos artesanais mineiros é comercializada a fresco, exceto aqueles utilizados para outros fins que não o consumo direto, a exemplo da fabricação de pão de queijo, sendo muito

requisitado por empresas de Belo Horizonte – MG. (COPSERRO, 2006, citado por MARTINS, 2006).

Leite cru também pode carrear agentes zoonóticos preocntes que não são pesquisados frequentemente como espécies de *Mycobacterium* (ABRAHÃO et al., 2005) e *Brucella* (RAMOS et al., 2008). Adicionalmente, a utilização do leite não pasteurizado para fabricação de queijos representa um grande perigo à saúde pública, pois aumenta consideravelmente a probabilidade de ocorrência de doses infectantes de bactérias patogênicas no produto destinado ao consumo (FERNANDES et al., 2006). Quando o queijo é fabricado a partir de leite cru, os cuidados durante as etapas de fabricação devem ser redobrados, pois produto não recebe nenhum tipo de tratamento que possa eliminar a contaminação (MARTINS, 2006). Entretanto, uma das formas de melhorar a qualidade microbiológica de um queijo, mesmo havendo uma contagem inicial de patógenos elevada, é a maturação, a qual favorece a combinação de fatores físicos, químicos e microbiológicos, considerados de fundamental importância para estabilidade e segurança do queijo. (MARCOS, 1993).

Em razão do grande risco para os consumidores, a elaboração de queijos a partir de leite cru vem sendo abandonada em alguns países da Europa e substituída pela forma semiartesanal, envolvendo a pasteurização do leite, adoção de outros processos de conservação e a adequação às boas práticas de fabricação a partir da substituição de equipamentos tradicionais por outros modernos (MANOLOPOULOU et al., 2003; LINTON et al., 2008).

Vários pesquisadores (ALEXANDRE et al., 2002; CARIDI et al., 2003; NETO et al., 2005; MARTINS et al., 2006; CHIODA et al., 2007) já identificaram atividade antimicrobiana de bactérias lácticas frente a microrganismos patogênicos como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*.

Conhecer os efeitos da maturação sobre a modulação da atividade patogênica desses queijos faz-se necessário para direcionar as adequações que estão sendo feitas nas unidades produtoras e também no treinamento dos produtores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características microbianas durante o processo de maturação do queijo Minas Artesanal do Serro.

## **Material e Métodos**

As análises microbiológicas da água, leite, pingo e queijos foram realizadas no laboratório de Higiene de Alimentos do Departamento de Nutrição da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), localizada na cidade de Diamantina - MG.

### **Coleta e Manutenção das Amostras**

Alíquotas de aproximadamente 250 mL de água, leite e pingo de cada produtor foram coletadas em frascos estéreis com tampas rosqueáveis, sendo mantidos refrigerados em caixa de isopor com gelo reciclável para posteriores análises.

Os Queijos Minas Artesanais foram coletados diretamente nas unidades produtoras no mês de maio de 2010. Foram escolhidas aleatoriamente cinco propriedades na região do Serro (MG) dentre unidades produtoras em diferentes graus de adequação, de modo a contemplar queijos com diferentes graus de contaminação. Após um dia de fabricação, ao completar a salga, os queijos foram mantidos na propriedade rural para maturação no ambiente próprio e a outra metade foi transportada para a Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, onde foram maturados sob refrigeração ( $8^{\circ}\text{C}$ ), sem embalagem e sem controle de umidade. As análises foram feitas nos tempos predeterminados de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, e 63 dias de maturação. Semanalmente, uma unidade de cada queijo por produtor e de cada condição de temperatura foi retirada do acondicionamento e submetida às análises microbiológicas.

### **Preparo das amostras de queijo**

Para o preparo do homogenato, foram retirados 25g de queijo. As amostras foram diluídas em 225 mL de solução salina (0.85%) e, posteriormente, homogeneizadas manualmente. Foram feitas diluições decimais e, em seguida, os plaqueamentos para cada diluição.

### **Preparo das amostras de leite e pingo**

Vinte e cinco mL de amostra de leite e pingo foram diluídos em 225 mL de solução salina (0.85%) e, posteriormente, homogeneizadas. Foram feitas diluições decimais e, em seguida, os plaqueamentos para cada diluição.

### **Preparo das amostras de água**

Um mL de amostra de água foi diluído em 9 mL de solução salina (0.85%) e, posteriormente, homogeneizado. Foram feitas diluições decimais e, em seguida, os plaqueamentos para cada diluição.

### **Análises microbiológicas**

- **Contagem de Coliformes a 30°C e *Escherichia coli***

Para a contagem de Coliformes a 30°C e *Escherichia coli* no leite, água e queijo utilizou-se o método Oficial Petrifilm AOAC 991.14 Coliformes/*E.coli* (Contagem de Coliformes e *E. coli* em Alimentos, Película Reidratável Seca), de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante (3M Microbiology).

- **Contagem total de mesófilos aeróbios**

A contagem total de mesófilos no queijo artesanal, no pingo e no leite foi feita pelo método de plaqueamento em profundidade, em placas de petri, utilizando-se o meio de cultura Ágar Padrão para Contagem – PCA. Após a solidificação, as placas foram invertidas e incubadas em estufas a 35°C, por 48 horas. Após esse período procedeu-se à contagem das placas e os resultados foram expressos em UFC/g e UFC/mL, respectivamente (APHA, 2001).

- **Contagem de *Staphylococcus aureus***

Para as análises de *Staphylococcus aureus* no queijo e leite utilizou-se o Petrifilm 3M – Rapid *S. aureus* (RSA) Count Plate (AOAC 981.15), de acordo com os procedimentos determinados pelo fabricante.

- **Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva**

Transferiu-se colônias típicas para tubos contendo 2 ml de caldo de infusão de cérebro e coração – BHI (DIFCO), que foram incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. A confirmação do *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada por meio do teste de coagulase. Para tal, adicionou-se aos 0,3 mL de cada tubo de caldo BHI 0,1 mL de plasma de coelho (LABORCLIN), os quais foram incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 4 a 6 horas para observação da formação de coágulo. O resultado foi obtido por meio da multiplicação do número de colônias contadas pela diluição inoculada e resultados expressos como UFC/g (BRASIL, 2003).

- **Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Para a detecção de *Listeria monocytogenes* no leite e queijo, utilizou-se o Kit Tecra 3M- *Listeria* Visual Immunoassay (VIA), de acordo com as recomendações do fabricante.

- **Pesquisa de *Salmonella sp.***

Para as análises de *Salmonella sp.* no leite e queijo, utilizou-se o Kit Tecra 3M – *Salmonella* Visual Immunoassay (VIA), de acordo com as recomendações do fabricante.

- **Contagem de bactérias ácido-láticas**

Para a enumeração de Bactérias ácido-láticas no leite e nos queijos, as amostras foram diluídas em caldo MRS e semeadas em placas de Petrifilm TM AC (3M do Brasil), com incubação a  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas em microaerofilia (NERO et al., 2006).

### **Determinação da contagem de células somáticas em amostras de leite**

Para a contagem de células somáticas, utilizou-se um Contador Eletrônico de Células Somáticas DeLaval DCC (DeLaval Cell Counter).

### Determinação da acidez em graus Dornic (°C)

A determinação da acidez foi realizada através da titulação de 10 mL de leite com solução de NaOH (N/9) (solução Dornic) e 4 gotas de fenolftaleína como indicador (LUTZ,2008).

### Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa *Statistical Analysis System* (SAS, 2003).

## Resultados e Discussão

### Análise microbiológica da água

Na Tabela 1, estão representadas as contagens microbiológicas da água utilizada nas propriedades produtoras de Queijo Minas Artesanal da região do Serro.

Tabela 1 - Análise microbiológica de água utilizada nas queijarias durante a fabricação do queijo Minas Artesanal do Serro

| Amostras   | Coliformes a 30°C (UFC/mL) | <i>Escherichia coli</i> (UFC/mL) |
|------------|----------------------------|----------------------------------|
| 1          | 120 x 10 <sup>0</sup>      | Ausência                         |
| 2          | 70 x 10 <sup>0</sup>       | Ausência                         |
| 3          | 50 x 10 <sup>0</sup>       | Ausência                         |
| 4          | 10 x 10 <sup>0</sup>       | Ausência                         |
| 5          | 20 x 10 <sup>1</sup>       | Ausência                         |
| Legislação | Ausência/100mL             |                                  |

As cinco (100%) amostras de água estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação para *Escherichia coli* e fora dos padrões para coliformes a 30°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Borelli et al. (2006) e Martins (2006), que analisaram a qualidade microbiológica da água utilizada na fabricação do Queijo Minas Artesanal da região do Serro e encontrou contagens superiores a 10<sup>4</sup> UFC/mL de coliformes a 30°C e *Escherichia coli*. Isso mostra que a água, geralmente originada de nascentes, recebe um tratamento ineficiente, através do uso do cloro pelos produtores. É importante que as unidades

produtoras sejam adequadas para que a água utilizada na fabricação do queijo não seja uma fonte potencial de contaminação do produto final.

Na Tabela 2, estão representados os valores das contagens microbiológicas do leite utilizado na fabricação dos queijos artesanais da região do Serro.

Tabela 2 – Valores médios das contagens microbiológicas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Contagem de células Somáticas (CCS) e acidez do leite cru utilizado na fabricação dos queijos artesanais do município do Serro

| Amostras   | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Escherichia coli</i> | CCS     | Acidez      |
|------------|------------------------------|-------------------------|---------|-------------|
| 1          | 0                            | 0                       | 13.500  | 22,00       |
| 2          | 3,46                         | 0                       | 260.500 | 17,50       |
| 3          | 2,74                         | 0                       | 251.500 | 16,00       |
| 4          | 2,28                         | 0                       | 210.500 | 16,50       |
| 5          | 2,41                         | 0                       | 216.000 | 16,00       |
| Legislação | < 2,00                       | < 2,00                  | 400.000 | 15°D - 20°D |

Em duas (40%) amostras de leite verificou-se contagens superiores ao estipulado pela legislação para mesófilos. Um fator que pode estar associado à contaminação das amostras é o manipulador que, apesar de possuir aventais, luvas e toucas descartáveis, não os utilizavam no processo de manipulação. Essa contaminação pode ter ocorrido durante a ordenha, através da exposição e do contato do leite com bactérias provenientes do úbere, das tetas, do solo, fezes dos animais, das mãos e roupas do ordenhador, das instalações (piso, parede, teto), ordenhadeiras mecânicas, tanques de estocagem, baldes, ou até mesmo de panos usados para coar o leite ou secar o úbere (FERNANDES et al, 2003). Segundo Fagan et al. (2008), a qualidade microbiológica do leite depende fundamentalmente da implantação de boas práticas na produção e menos das condições de infraestrutura e tecnológico da propriedade leiteira.

De acordo com a Lei n.º 14.185, a queijaria deve ficar distante de pocilgas, galinheiros e quaisquer outras fontes produtoras de mau cheiro que possam comprometer a qualidade do leite ou do queijo. Além disso, define-se que o acesso de animais e pessoas estranhas à produção deve ser impedido. No entanto, observou-se que a maioria dos produtores tem consciência desses problemas e estão dispostos a corrigi-los.

A contaminação por *Staphylococcus aureus* foi observada em todas as amostras de leite com apenas uma dentro dos padrões exigidos pela legislação. A contagem variou entre 0 log UFC/mL e 3,46 log UFC/mL, coincidindo com os resultados obtidos por Borelli (2006), evidenciando que o leite constitui uma fonte de contaminação para os queijos artesanais, sendo necessárias medidas de controle no momento da ordenha para obtenção de um produto de melhor qualidade. A utilização do leite cru e a falta de higiene adequada dos equipamentos e utensílios podem ter sido a causa da contaminação. De forma geral, é necessário mudar o manejo da ordenha, adotando-se procedimentos simples de higiene, como a lavagem dos tetos do animal, realização do pré-dipping e de testes utilizados na detecção de mastite, e também da mão do ordenhador, além de uma higienização adequada das instalações, equipamentos e utensílios, o que diminui consideravelmente o risco de contaminação não só do leite como dos animais.

A *Escherichia coli* esteve dentro dos padrões em todas as amostras de leite. A contagem de células somáticas variou entre 13.500 células/mL e 260.500 células/mL e somente uma (16,66%) amostra estava fora dos padrões para acidez. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* não foram encontradas no leite. A legislação não fixa para Coliformes a 30°C no leite cru.

Na Tabela 3, estão representados os resultados da contagem total de mesófilos aeróbios e de bactérias lácticas, analisados no leite e no fermento endógeno utilizados na fabricação do queijo artesanal do Serro.

O “pingo”, também conhecido como fermento endógeno, é definido como fermento resultante da dessoragem dos queijos já salgados. Coletado de um dia para outro, é utilizado na fabricação do queijo do Serro e permanece à temperatura ambiente até o momento da sua utilização. Essa prática permite o crescimento de diversos microrganismos, o que explica as altas contagens de mesófilos nesse produto, cujos valores variaram entre 4,60 log UFC/mL e 8,18 log UFC/mL (Tabela 3). Já o leite apresentou uma contagem mais baixa de mesófilos, fato explicado pelo fato de o leite não permanecer por muito tempo em condições que favoreçam a multiplicação microbiana. Os valores de bactérias mesófilas no leite variaram entre 4,34 log UFC/mL e 5,32 log UFC/mL, estando duas amostras fora dos padrões estipulados pela legislação.

| Amostras | Mesófilos<br>log (UFC/mL) |       | Bactérias lácticas<br>log (UFC/mL) |       |
|----------|---------------------------|-------|------------------------------------|-------|
|          | Leite                     | Pingo | Leite                              | Pingo |
| 1        | 4,34                      | 8,18  | 3,86                               | 7,07  |
| 2        | 5,17                      | 8,05  | 5,28                               | 7,52  |
| 3        | 4,62                      | 8,16  | 3,14                               | 7,61  |
| 4        | 5,32                      | 6,09  | 5,31                               | 6,81  |
| 5        | 4,64                      | 4,60  | 4,48                               | 7,30  |

Tabela 3 - Valores das contagens microbiológicas do leite cru e do fermento endógeno em log (UFC/mL) utilizado na fabricação dos queijos artesanais do município do Serro

Foram observadas contagens elevadas de bactérias ácido-láticas (BAL), ficando evidente que esse grupo compõe a microbiota dominante o fermento endógeno da região do Serro. A contagem de BAL presentes no fermento endógeno variou entre 6,81 log UFC/mL e 7,52 log UFC/mL. Segundo Furtado (1980), o “pingo” constitui um autêntico fermento por conter um número elevado de bactérias lácticas desejáveis em cada mililitro. No entanto, pode conter também contaminação elevada de *Staphylococcus aureus*, podendo chegar sua população a valores acima de  $10^6$  UFC/mL, dependendo da quantidade de fermento adicionada ao leite. Há de se considerar, ainda, que as células de *Staphylococcus aureus* oriundas do fermento podem apresentar maior resistência às condições de pH baixo e alta concentração de sal, uma vez que sobreviveu por quase 12 horas durante a fermentação (PINTO, 2008).

O leite contém todos os compostos necessários à multiplicação bacteriana, mas há limitações no suprimento de aminoácidos essenciais, como ácido glutâmico, valina, leucina e histidina, necessários à síntese de proteínas. Em virtude disso, as bactérias lácticas dependem de seu sistema proteolítico para atender suas necessidades nutricionais e permitir seu crescimento em meio pobre em aminoácidos livres (MORENO et al., 2002). A contagem de BAL encontrada no leite cru foi entre 3,14 log UFC/mL e 5,31 log UFC/mL.

### **Análises microbiológicas dos queijos**

Os valores médios das contagens de mesófilos aeróbios, Coliformes a 30°C, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, encontrados no queijo do Serro maturados a temperatura ambiente e sob refrigeração estão na Tabela 4.

*Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* não foram detectados, mas a ocorrência desses patógenos é bem relatada em queijos fabricados com a utilização de leite cru (PAK et al., 2002; VITAS et al., 2003). Basicamente, a ausência desses patógenos se deve às mudanças que ocorrem durante o processo de maturação dos queijos, principalmente pela presença de grupos microbianos distintos, como bactérias lácticas e também enzimas, e outras substâncias que modificam as características do produto tornando-o desfavorável para sua sobrevivência.

Tabela 4 - Média das contagens microbiológicas e crescimento de mesófilos aeróbios, coliformes totais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva e bactérias lácticas (Log UFC/g) do queijo do Serro maturados à temperatura ambiente e sob refrigeração

| Microrganismos      | Período de maturação (semanas) |      |      |      |      |      |      |      |      |        | Média   | F     | CV |
|---------------------|--------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------|---------|-------|----|
|                     | Ambiente                       |      |      |      |      |      |      |      |      |        |         |       |    |
|                     | 1                              | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    |        |         |       |    |
| Mesófilos           | 8,37                           | 8,44 | 8,15 | 7,96 | 8,47 | 7,30 | 7,60 | 7,71 | 6,67 | 7,85 a | 1.58 ns | 10.03 |    |
| C. totais           | 3,64                           | 3,13 | 3,24 | 2,13 | 3,91 | 2,62 | 2,65 | 3,10 | 1,92 | 3.62 b | 11.23** | 21.43 |    |
| <i>E.coli</i>       | 1,22                           | 2,41 | 0,90 | 0,73 | 1,76 | 0,86 | 1,40 | 1,27 | 0,77 | 3.01 a | 1.93 ns | 21.35 |    |
| <i>S. aureus</i> C+ | 3,04                           | 3,85 | 4,19 | 2,41 | 3,51 | 1,99 | 3,68 | 2,24 | 2,88 | 3.53 a | 1.08 ns | 40.98 |    |
| Bactérias Lácticas  | 7.90                           | 8,42 | 8,37 | 8,65 | 8,05 | -    | -    | -    | -    | 8.28 a | 1.37 ns | 7.66  |    |

| Microrganismos      | Refrigerado |        |         |         |         |          |         |         |        |        | Média   | F     | CV |
|---------------------|-------------|--------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|--------|--------|---------|-------|----|
|                     | 1           | 2      | 3       | 4       | 5       | 6        | 7       | 8       | 9      |        |         |       |    |
| Mesófilos           | 8.44 a      | 8.62 a | 8.13 ab | 8.11 ab | 8.23 ab | 7.56 ab  | 7.55 ab | 7.86 ab | 7.12 b | 8.06 a | 3.59 ** | 10.03 |    |
| C. totais           | 5.15 a      | 4.72 a | 4.71 a  | 4.63 ab | 4.07abc | 4.15 abc | 3.37 c  | 3.45 bc | 1.00d  | 4.21 a | 22.02** | 21.43 |    |
| <i>E.coli</i>       | 3.85 a      | 3.38 a | 3.36 a  | 3.50 a  | 3.79 a  | 3.40 a   | 3.28 a  | 3.44 a  | 0.00 b | 3.21 a | 31.71** | 21.35 |    |
| <i>S. aureus</i> C+ | 3.60 ab     | 4.30 a | 4.50 a  | 4.80 a  | 4.30 a  | 3.50ab   | 3.40ab  | 1.90 b  | 3.00ab | 3.87 a | 3.50**  | 40.98 |    |
| Bactérias lácticas  | 7,68 a      | 8,29 a | 8,10 a  | 8,52 a  | 8,20 a  | -        | -       | -       | -      | 8,07 a | 1,88 ns | 7,66  |    |

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0.01$ )

ns não significativo ( $p > 0.05$ )

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Tukey ( $P > 0,05$ )

A legislação não fixa padrão para contagem de mesófilos aeróbios para o queijo, mas é usada como indicadora da população bacteriana de uma amostra, e altas contagens demonstram má qualidade da matéria-prima. A contagem de mesófilos aeróbios apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) para os queijos mantidos à temperatura ambiente ao longo de nove semanas de maturação. Ao analisar os locais utilizados na produção dos queijos nas propriedades rurais, durante as visitas técnicas, e acompanhando o processo de fabricação dos queijos foram observadas algumas falhas nas etapas, que poderiam justificar os níveis de contaminação encontrados, como a presença de animais próximo ao local de produção dos queijos, tais como cachorros, galinhas, pássaros e insetos, a fabricação do queijo sem o uso da vestimenta adequada (luvas, botas, aventais) e até mesmo sem o uso de camisa.

Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as condições de maturação; no entanto, percebe-se uma redução na contagem microbiana de 1,7 log UFC/g ao final do período de maturação na temperatura ambiente, e uma redução de 0,92 log UFC/g para os queijos maturados sob refrigeração. Nesse caso, a redução microbiana não foi suficiente para tornar o produto seguro, pois a contagem inicial de mesófilos se mostrou elevada. De acordo com Beresford et al. (2001), a diminuição da contagem bacteriana ao longo da maturação pode estar relacionada com a produção de ácidos orgânicos, assim como a perda de água e aumento da concentração de sólidos totais, como NaCl, que inibem o crescimento microbiano. Resultados contrários ao deste trabalho foram encontrados por Araújo (2004); Pinto (2004); Borelli (2006); Martins (2006). A diferença entre os resultados talvez seja justificada pelos diferentes tratamentos dados aos queijos, que não foram embalados, onde o ambiente refrigerado não dispunha de controle de umidade.

Amostras de queijos do Serro, na primeira semana de maturação, mantidas refrigeradas, apresentaram contagens de coliformes a 30°C e *Staphylococcus aureus* superiores ao permitido pela legislação. Não houve diferença ( $p > 0,05$ ) para coliformes a 30°C ao longo do período de maturação para os queijos mantidos em temperatura ambiente (Tabela 4). A contaminação inicial elevada por coliformes é um indício de falta de cuidados no momento da ordenha e também na fabricação dos queijos. A maturação dos queijos é utilizada como uma ferramenta para realçar as características sensoriais, além de possuir papel importante para garantir a segurança alimentar, uma vez que eles devem ser produzidos com alta qualidade para atender aos padrões microbiológicos que garantem sua inocuidade por serem fabricados a partir de leite cru.

No final de sete semanas de maturação, a contagem de coliformes a 30°C estava dentro dos padrões estipulados pelo Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002,

tanto para queijos mantidos refrigerados como para os queijos mantidos em temperatura ambiente. Essa contagem elevada de coliformes pode ser explicada pela alta contaminação da matéria-prima, que não recebe tratamento térmico.

As contagens de *Escherichia coli* encontradas no queijo mantidos à temperatura ambiente estavam dentro dos limites estabelecidos pela legislação. Para os queijos mantidos refrigerados, a contagem de *Escherichia coli* atingiu os limites estipulados pela legislação na terceira semana de maturação. Os elevados níveis de coliformes totais e fecais podem ser a principal causa para a formação de olhaduras indesejáveis no queijo do Serro.

Não foi possível estipular em qual período os queijos estariam seguros quanto à contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva para que pudessem ser consumidos, pelo fato da redução microbiana não apresentar-se contínua ao longo da maturação.

Observou-se redução na contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva; no entanto, a contaminação inicial de microrganismos presentes no queijo estava elevada e, segundo dados de literatura, já seriam capazes de produzirem enterotoxinas; e mesmo que o queijo fosse maturado elas não seriam destruídas ao longo do tempo. Portanto, há necessidade de maiores cuidados no momento da ordenha e mesmo durante e após a fabricação do queijo visando diminuir a contaminação inicial.

A grande dificuldade de se adotar medidas que diminuam o risco de contaminação alimentar em razão das praticas inadequadas de higiene é que a maioria das pessoas envolvidas na manipulação de alimentos necessita de cursos sobre os cuidados higiênico-sanitários que devem ser seguidos na elaboração dos produtos, desconhecendo, totalmente, a possibilidade de serem portadores assintomáticos de microrganismos (TOSIN & MACHADO, 1995).

A lavagem rigorosa das mãos consiste no primeiro requisito de higiene pessoal dos manipuladores de alimentos, como forma de impedir que elas veiculem microrganismos existentes. A essa lavagem deve proceder-se no início das atividades, após a manipulação de alimentos contaminados e /ou uso de instalações sanitárias (MONTEIRO et al., 2001).

Medidas para eliminar *Staphylococcus aureus* são inviáveis; portanto, a identificação de portadores, a capacitação dos manipuladores e a aplicação das boas práticas de fabricação são procedimentos relevantes para a prevenção da contaminação de alimentos, durante as diferentes fases de preparo, aí incluídas todas as medidas de higiene pessoal, utensílios e instalações (BARTELS et al., 2009). Talvez com esses cuidados a maturação possa promover uma redução significativa na contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, garantindo-se um produto sem riscos ao ser consumido.

A atividade da enzima coagulase tem sido usada para indicar patogenicidade de microrganismo toxigênico e a enzima termonuclease sugerida como indicador mais confiável dessa enterotoxigenicidade (BENNETT, 1996). Ainda assim, a simples detecção da produção de coagulase por procedimentos bioquímicos rotineiros não é suficiente e segura para estabelecer enterotoxigenicidade e virulência de linhagens de *Staphylococcus*, uma vez que a bactéria pode possuir o gene e não expressá-lo em condições laboratoriais ou ser coagulase negativa e enterotoxigênica (VERAS et al., 2008). De acordo com Lamaita et al. (2005), os padrões estipulados pela legislação devem ser obedecidos para a determinação de padrões para *Staphylococcus spp.* e não somente para *Staphylococcus* coagulase positiva e/ou, ainda, preconizar a identificação de enterotoxinas nos diferentes alimentos, para garantir a sua real segurança.

O elevado número de bactérias lácticas encontradas no queijo Minas Artesanal do Serro durante os 35 dias de maturação pode ter contribuído para favorecer condições de inibição de microrganismos indesejáveis como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella ssp.* Trabalhos (ALEXANDRE et al., 2002; NETO et al., 2005) evidenciam a atividade inibitória de bactérias lácticas frente a vários patógenos em queijos artesanais do Serro. As bactérias lácticas têm grande importância econômica, já que de forma natural ou adicionada intencionalmente, desempenham importante papel na fermentação de grande variedade de alimentos. Suas atividades metabólicas não apenas contribuem para o desenvolvimento de características sensoriais desejáveis com também permitem conservar ou aumentar o valor nutritivo da matéria-prima (MAGRO et al., 2000a).

Os queijos artesanais do Serro com quatro semanas de maturação em temperatura ambiente (Figura1) já apresentavam características aparentes de deterioração. Na contribuição para o sabor do queijo, a degradação das proteínas pode atuar de maneira direta, com a liberação de aminoácidos e peptídeos, inclusive alguns produzindo sabor amargo, e de maneira indireta, pelo catabolismo de aminoácidos para a formação de aminas, ácidos, tióis, tioésteres, entre outros. As mudanças na textura ocorrem basicamente em razão da quebra da matriz protéica, do aumento de pH e da maior retenção de água pelos recém-formados grupamentos aminas e carboxílicos (POMAR et al., 2001a). Talvez isso possa ser um entrave para queijos maturados à temperatura ambiente, pois o longo período de maturação favorece sua deterioração, tornando-o com aparência e odores desagradáveis.



Figura 1 - Queijos artesanais do Serro com 30 dias de maturação em temperatura ambiente

### Conclusões

Todas as amostras de água apresentaram contaminação por coliformes totais acima do valor máximo recomendado pelos padrões brasileiros. Nenhuma amostra de água apresentou contaminação por coliformes fecais.

Em duas amostras de leite cru os mesófilos apresentaram-se acima dos limites permitidos pela legislação brasileira. *Staphylococcus aureus* esteve ausente somente em uma amostra de leite e a *Escherichia coli* esteve ausente em todas as amostras.

O fermento endógeno apresentou uma elevada população de bactérias lácticas, o que pode ter contribuído pela não detecção de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*

O período de maturação de nove semanas não foi suficiente para considerar o produto seguro para o consumo, pois alguns microrganismos não apresentaram redução microbiana contínua.

Percebe-se que o queijo ainda oferece riscos, uma vez que apresenta contaminação inicial elevada de microrganismos capazes de produzirem enterotoxinas que podem provocar transtornos alimentares em pessoas que apresentem algum tipo de imunodeficiência e que venham a consumi-lo.

A capacitação dos envolvidos na fabricação do queijo artesanal pode ser uma forma de reduzir a contaminação inicial do produto, a qual, aliada ao processo de maturação, pode ter efeitos positivos, tornando-o seguro e reforçando a tradição cultural da região.

## Referências

A. O. A. C. Extraneous Materials: Isolation. In: \_\_\_\_\_ . Official Methods of Analysis, 14th ed., Washington, D.C., 1984. p.887–935.

APHA. American Public Health Association. For the Examination of Dairy Products. Ed. Robert T. Marshall. 17 Ed. 2001.

ABRAHÃO, R.M.C.M.; NOGUEIRA, P.A.; MALUCELLI, M.I.C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.2, p.1-17, 2005.

ALEXANDRE, D.P.; SILVA, M.R.; SOUZA, M.R. 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**, v.54, n.4, 2002.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá**. 2004. 148 p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2004.

BRASIL. Diário Oficial da União – D.O.U. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Brasília, 3977-3986, 11 de março de 1996. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. **Requisitos microbiológicos de queijos**. Portaria nº 146/96. Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Serviço de Inspeção de Leite e Derivados. Instrução Normativa nº 22, de 14 de abril de 2003, Brasília, 2003.

BARTELS, A.S.; ANDRADE, A.D.; NEUMANN, E. et al. Identificação de portadores de *Staphylococcus* enterotoxigênicos e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.6, p.1450-1453, 2009.

BENNETT, R.W. Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the horizon an update. **Journal of Food Protection**., v.59, p.1123-1126, 1996.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L. et al. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p. 259-274, 2001.

BORELLI, B.M. **Melhoria da qualidade do queijo Minas artesanal**. Belo Horizonte: Fundação CETEC, 2006. 19p. (Dossiê Técnico).

BORELLI, B.M; FERREIRA, E.G; LACERDA, I.C.A et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus spp.* and other microbial contaminants during production of Minas cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.545-550, 2006.

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.1570-1574, 2007.

BRASIL. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p.3977-3986.

CARIDI, A.; MICARI, P.; FOTI, F.; RAMONDINO, D.; SARULLO, V.. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.13, n.2-3, p.191-200, 2003.

COLAK, H.; HAMPKIYAN, H.; BINGOL, E.B. et al. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella spp.* In Tulum cheese. **Food Control**, v.18, n.5, p.576-579, 2007.

FERNANDES, A.M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C.A.F.de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.144, p.49-56, 2006.

FURTADO, M.M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes, v.35, p.33-36, 1980.

GUEDES NETO, L.G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, supl.2, p.245-250, 2005.

IBRAHIM, G.F; RADFORD, D.R; BALDOCK, A.K et al. Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* in cheddar cheese produced with induced starter failure. **Journal of Food Protection**, v.44, n.3, p.189-193, 1981.

LAMAITA, H.C.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S. et al. Contagem de *Staphylococcus* spp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.702-709, 2005.

LINTON, M.; MACKLE, A.B.; UPADHYAY, V.K et al. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.9, n.4, p.423-428, 2008.

TOSIN, I.; MACHADO, R.A. Ocorrência de *Campylobacter* sp entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana na região Sul do Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v.29, n.6, p.472-477.

MAGRO, M.L.M.; CORBACHO, J.M.M.; SORRIBES, C.H. et al. Las bacteriocinas de las bacterias lácticas 1: Definición, clasificación, caracterización y métodos de detección. **Alimentaria**, v.37, p.59-66, 2000a.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E. et al. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture during ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.153-161, 2003.

MARCOS, A. **Cheese: chemistry, physics and microbiology**. V.1, General aspects. Water activity in cheese in relation to composition, stability and safety. p.439-469. London U. K. 1993. Chapman & Hall, 2. Ed., 1993.

MARTINS, A.D.O.; MENDONÇA, R.C.S.; SILVA, D.L. et al. Resistência de bactérias lácticas, isoladas de fezes de suínos e sua capacidade antagônica frente a microrganismos indicadores. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.5, n.1, p.53-59, 2006.

MINAS GERAIS. Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas Artesanal e dá outras providências**. 2002a. Disponível em: <[http://www.imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/14185.pdf](http://www.imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/14185.pdf)>. Acesso em: 15 abril. 2010.

MONTEIRO, M.C.N.; PINTO, P.S.A.; VAZ, A.J. Controle higiênico-sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais no Estado do Ceará. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.89, p.90-93, out 2001.

MORENO, I.; VIALTA, A.; LERAYER, A.L.S. et al. A importância da microbiota adicionada e autóctone na maturação de queijos prato. **Indústria de Laticínios**, v.39, p.59-62, 2002.

MORGAN, F.; BONNIN, V.; MALLEREAU, M.P. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.349-356, 2004.

NETO, L.G. G.; SOUZA, M.R.; NUNES, A.C.; NICOLI, J.R.; SANTOS, W.L.M. **Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.57, supl. 2, p.245-250, 2005.

NERO, L. A.; BELOTI, V.; BARROS, M. A. F; ORTOLANI, M. B. T.; TAMANINI, R.; FRANCO, B. D. G. M. Comparison of petrifilm aerobic count plates and de Man–Rogosa–Sharpe agar for enumeration of lactic acid bacteria. **Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology**, Trumbull, v.14, n.3, p.249-257, set. 2006

ORNELAS, E. A., **Diagnóstico preliminar para caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra d Canastra-MG**. 65p. 2005. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2005.

PINTO, M.S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria SP.* e *Staphylococcus aureus* em queijo minas artesanal do Serro**. 84 p. 2008. (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

RAPINI, LS.; TEIXEIRA, J.P.; MARTINS, N.E. Perfil antimicrobiano de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de leite cru de cabra, queijo e manipuladores. **Revista Higiene Alimentar**, v.17, p.162, 2003.

RAMOS, T.R.R.; PINHEIRO JUNIOR, J.W.; SOBRINHO, P.A.M. et al. Epidemiological aspects of infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.133-138, 2008.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM – SAS. *Technical report P-229*. SAS/STAT Software: changes and enhancements: release 6.07. Cary: SAS, 2003.

SANTOS, E.C.dos; GENIGEORGIS, C.; FARVER, T.B. Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. **Journal of Food Protection**, n.3, v.44, p.172-176, 1981b.

VERAS, J.F.; CARMO, L.S.; TONG, L.C. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais Brazil. **Journal of Infectious Diseases**. v.12, p.410-415, 2008.

VITAS, A.L.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, L. Occurrence of *Listeria monocytogenes* from raw goat milk. **International Journal of food microbiology**, v.64, p.217-221, 2001.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)