



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA CURSO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

NADINE PAULA DOS SANTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA DF

2022

NADINE PAULA DOS SANTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO FEDERAL**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia na Universidade de Brasília,
Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Me. Esp. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Coorientadora: Prof^a. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA DF

2022

Ficha catalográfica elaborada, automaticamente, com
os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Pq

Paula dos Santos, Nadine

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO FEDERAL.

/ Nadine Paula dos Santos; orientador Leticia Fernandes
Silva Rodrigues; co-orientador Daniela Castilho Orsi. --
Brasilia, 2022.

34 p.

1. Queijo de coalho. 2. doenças transmitidas por
alimentos. 3. coliformes termotolerantes. 4.
Staphylococcus aureus.

NADINE PAULA DOS SANTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS DE COALHO ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

Leticia F.S. Rodrigues

Orientadora: Me. Esp. Leticia Fernandes Silva Rodrigues

(FCE/ Universidade de Brasília)

Karolina Oliveira Gomes.

Farmacêutica Karolina Oliveira Gomes

(FCE/Universidade de Brasília)

Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira

Me. Esp. Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira

(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2022

Aos meus queridos pais, Paulo César e Eneilza Maria, por terem me proporcionado, da melhor forma possível, a possibilidade de estudar e por não terem descreditado de mim nem um dia sequer.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sei que a fé me fez e me fará chegar muito longe.

Agradeço aos meus pais, Paulo César e Eneilza, por lutarem e abrirem mão de muitas coisas para que eu pudesse ter educação, por segurarem a barra financeiramente durante tantos anos, por me incentivarem a cada dia, por me lembrarem do quanto sou capaz, inteligente e esforçada, por serem presentes, por me educarem da melhor forma possível, por nunca deixarem que me faltasse nada em meio a tantas dificuldades e por sempre me lembrarem de quem sou e de onde vim; sem vocês nada seria possível. Eu os amo e os honro para sempre.

Agradeço ao meu namorado, Vinícius, por toda força, todas as palavras de incentivo, pelos abraços durante minhas crises de ansiedade, por vibrar a cada aprovação e confortar-me a cada reprovação, por me lembrar do meu valor e da minha capacidade e por sempre acreditar em mim, você foi uma peça crucial na minha vida durante todos esses anos; sem o seu apoio seria muito mais difícil. Eu te amo.

Agradeço aos meus sogros, Ailton e Rose, por torcerem por mim, acreditarem, incentivarem, serem os melhores sogros que eu poderia ter e me acolherem como filha. Vocês são incríveis.

Agradeço às minhas amigas, Marina e Zaira, que sempre me incentivaram e acreditaram em mim e à minha amiga, Monalisa, que esteve comigo durante toda a graduação, choramos e sorrimos juntas muitas vezes, e conseguimos concluir esse sonho juntas em meio a tantas dificuldades.

Agradeço à minha orientadora que tanto admiro, Letícia, por ser a melhor, por nunca medir esforços em me ajudar, por sempre me incentivar e por me acolher da melhor forma possível. Agradeço-a pelos áudios de dois minutos (ou mais) para que não restasse nenhuma dúvida e por todas as caronas. Você foi muito além de orientadora; foi uma amiga, humana e compreensiva, nunca me esquecerei das tardes no laboratório que foram muito leves e divertidas. Agradeço, também, à minha coorientadora, Dr. Daniela, por ter despertado meu interesse pela microbiologia de alimentos durante a graduação; admiro-te muito e sou eternamente grata por todo ensinamento.

Meus agradecimentos a todo o corpo docente da UNB – FCE) por ter me dado a base necessária para que eu pudesse concluir esse curso que tanto amo. Obrigada a essa banca examinadora e a todos que de alguma forma me ajudaram.

Por fim, agradeço a mim por ser forte, confiante, guerreira, esforçada e por nunca desistir. Gratidão eterna!

RESUMO

O queijo é um alimento bastante consumido no Brasil e possui diversas texturas, sabores e aromas de acordo com cada região. Para a produção do queijo é necessário que haja boas práticas de higiene e fabricação de acordo com as legislações brasileiras vigentes. Entretanto, os queijos artesanais vêm sendo associados à doenças transmitidas por alimentos (DTA), e são, em sua maioria, produzidos a partir do leite cru (sem pasteurização), o que pode ser considerado uma fonte de bactérias causadoras de doenças. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de queijos de coalho de fabricação artesanal comercializados em feiras permanentes do Distrito Federal. Foram coletadas seis amostras de queijos de coalho artesanais em diferentes feiras. As amostras foram analisadas considerando a contagem total de bactérias mesófilas e psicrófilas, determinação de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *S. aureus* e pesquisa *Salmonella* spp. Todas as amostras analisadas apresentaram resultados aceitáveis de bactérias mesófilas e psicrófilas, com valores abaixo de 7,0 log UFC/g. Um total de 4 (66,7%) amostras excederam os valores de *S. aureus* estabelecidos pela legislação brasileira. Para coliformes termotolerantes, 100% (6/6) das amostras apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela legislação brasileira. Bactérias *Salmonella* spp. não foram detectadas nas amostras. Portanto, tendo como resultados todas as amostras de queijo de coalho reprovadas para o consumo, observa-se a carência de fiscalização por órgãos de inspeção para controle e manutenção da qualidade dos queijos de coalho de fabricação artesanal comercializados em feiras permanentes.

Palavras-chave: Queijo de coalho; doenças transmitidas por alimentos; coliformes termotolerantes; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Cheese is a food widely consumed in Brazil and has different textures, flavors and aromas according to each region. For the production of cheese it is necessary to have good hygiene and manufacturing practices in accordance with current Brazilian legislation. However, artisanal cheeses have been associated with foodborne diseases (FBD), and are mostly produced from raw milk (without pasteurization), which can be considered a source of disease-causing bacteria. Therefore, this study aimed to evaluate the microbiological quality of artisanal curd cheeses sold at permanent fairs in the Federal District. Six samples of artisanal curd cheeses were collected at different fairs. The samples were analyzed considering the total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, determination of total and thermotolerant coliforms, *S. aureus* count and *Salmonella* spp. All samples analyzed showed acceptable results for mesophilic and psychrotrophic bacteria, with values below 7.0 log CFU/g. A total of 4 (66.7%) samples exceeded the *S. aureus* values established by Brazilian legislation. For thermotolerant coliforms, 100% (6/6) of the samples presented values higher than those established by Brazilian legislation. Bacteria *Salmonella* spp. were not detected in the samples. Therefore, having as results all the samples of curd cheese disapproved for consumption, there is a lack of supervision by inspection services to control and maintain the quality of artisanal curd cheese sold in permanent fairs.

Keywords: Coalho cheese; foodborne illnesses; thermotolerant coliforms; *Staphylococcus aureus*.

RELAÇÃO DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µL	Microlitros
µg	Micrograma
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
ICMSF	International Commission on Microbiological Specifications for Foods
g	Gramma
IN	Instrução Normativa
LB	Caldo Lúria Bertani
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
ND	Não detectado
NMP	Número mais provável
pb	Pares de Base
PCA	Ágar padrão para contagem
PCR	Reação da Cadeia em Polimerase
p/v	Peso por volume
STEC	<i>Echerichia Coli</i> produtora da toxin Shiga
SS	Ágar Salmonella-Shigella
UFC	Unidade Formadora de Colônia

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para identificação de <i>Salmonella</i> spp	23
Tabela 2. Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase	24
Tabela 3. Contagem de bactérias mesófilas e psicrotóricas nas amostras de queijos de Coalho de produção artesanal.....	25
Tabela 4. Contagem de <i>S. aureus</i> em amostras de queijo de coalho de fabricação artesanal	26
Tabela 5. Enumeração de coliformes totais e termotolerantes em queijos de Coalho de produção artesanal.....	27

Sumário

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Qualidade do queijo de coalho artesanal brasileiro	14
1.2 Legislação brasileira e qualidade microbiológica dos queijos.....	15
1.3 Contaminação dos queijos com <i>S. aureus</i>	17
1.4 Contaminação dos queijos com <i>E. coli</i>	18
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral:	20
3.2 Objetivos específicos:	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS	21
4.1 Coleta das amostras	21
4.2 Preparo das amostras e análises microbiológicas	21
4.3 Análises Moleculares	22
4.4 Identificação molecular da <i>Salmonella</i> spp.	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
ANEXOS	36

1 INTRODUÇÃO

Segundo informações do Guia Alimentar para a População Brasileira, no Brasil existem várias regiões com culturas diferentes e comidas típicas e ao considerar as particularidades culturais associadas à liberdade individual dos produtores de alimentos, ocorre uma alta diversidade de alimentos produzidos (BRASIL, 2014). A exemplo disto, está o queijo, disponível em diversas opções de texturas, sabores e características diferentes uns dos outros, sendo um alimento de alto consumo no Brasil (ITAL, 2020).

Os queijos artesanais, principalmente os queijos do tipo minas, serrano, coalho, manteiga e marajó, atualmente são produzidos em pequenas quantidades por comerciantes autônomos e locais de diversas regiões do Brasil.

De acordo com o Ministério de Estado da Agricultura, do abastecimento e da Reforma Agrária, na Portaria Nº 146 de 07 de março de 1996, o queijo é um produto fresco (pronto para consumo) ou maturado (que sofreu trocas bioquímicas e físicas). Pode ser obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído, ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho com enzimas específicas, de bactérias específicas e de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, podendo haver substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos, do mesmo modo que substâncias aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996).

Para que haja fabricação do queijo é necessário que as práticas de higiene para elaboração do produto estejam de acordo com a legislação brasileira sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos (BRASIL, 2002).

Os queijos artesanais têm sido associados à doenças transmitidas por alimentos (DTA) em vários lugares do mundo (PRATES *et al.*, 2017). Apesar do desenvolvimento tecnológico na indústria do queijo ter crescido muito nos últimos tempos, surgiu uma grande variedade de queijos artesanais, em sua maioria produzidos a partir do leite cru, ou seja, sem pasteurização. O leite cru utilizado na produção dos queijos pode ser considerado uma fonte de bactérias causadoras de doenças aos seres humanos (BOMFIM *et al.*, 2020). Dentre os alimentos prontos para consumo, os queijos estão em uma categoria de alto risco para DTA em relação a

outros alimentos que sofrem processamento térmico antes do consumo (YAMANAKA *et al.*, 2016).

Assim, por mais que o queijo seja considerado um alimento saudável e nutritivo, estando presente na dieta de milhares de pessoas, muitas das DTA estão diretamente associadas ao seu consumo. Bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* são os principais patógenos encontrados em queijos artesanais de má qualidade (BOMFIM *et al.*, 2020).

1.1 Qualidade do queijo de coalho artesanal brasileiro

O queijo de coalho pode ser de fabricação industrial ou artesanal, e nas regras de fabricação desse queijo, estabelece-se que a produção deve ser feita a partir de leite que passou por processo de pasteurização ou outro tratamento térmico adequado. Entre as principais características do queijo de coalho, temos: consistência semidura e elástica com a textura compacta e macia, de cor branca amarelada uniforme, sabor e cheiro ligeiramente ácidos, podendo apresentar sabor salgado, com formas e pesos distintos, podendo ser gordo ou semigordo (MELO *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2020).

No Brasil existe uma produção expressiva de queijos artesanais, geralmente comercializados e consumidos apenas na sua região de origem (MUNHOZ *et al.*, 2021). Esses queijos artesanais, muitas vezes, são feitos a partir do leite cru (não pasteurizado). A produção de queijo de coalho artesanal utilizando o leite cru da vaca aumenta as chances de contaminação por microrganismos patogênicos como: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, o que representa perigo à saúde de quem o consome (MELO *et al.*, 2021).

O leite bovino é composto por muitos nutrientes, entre eles: água, carboidratos, proteína, gordura, vitaminas e sais minerais, assim, torna-se um alimento de grande valor nutricional para a dieta do ser humano. No entanto, quando as regras de higiene são precárias, o leite fornece um ambiente favorável ao crescimento de diversos microrganismos devido à grande disponibilidade de nutrientes e ao pH próximo à neutralidade (PEREIRA *et al.*, 2017). Desta forma, mesmo que, por muitas vezes, sejam mantidas as características tradicionais da produção dos queijos artesanais, os leites

não pasteurizados podem ser uma grande fonte de bactérias que em grande parte são prejudiciais à saúde do ser humano (BOMFIM *et al.*, 2020).

Os alimentos tradicionais, como o queijo de coalho feitos de forma artesanal ganham destaque nos projetos de valorização e de estratégias para manutenção das características tradicionais e produção do meio rural, entretanto, tornaram-se alvo de pressão em relação à legislação, isso porque em grande parte dos casos esses queijos são produzidos informalmente, sem fiscalização do Estado (CRUZ *et al.*, 2014).

Para que haja um consumo seguro desse tipo de alimento, é necessário que exista uma condição aceitável na produção, estocagem e distribuição. A falta de cuidados com o alimento pode resultar em doenças alimentares. Existem diversos tipos de alimentos que podem veicular doenças ao ser humano, entre eles o leite é considerado um dos mais consumidos e de frequente veiculação de patógenos (RUWER *et al.*, 2011). A falta de qualidade do leite e das técnicas de fabricação dos queijos artesanais faz com que os produtos que chegam aos consumidores sejam de baixa qualidade, tanto em questão de falta de higiene quanto à falta de padronização (SOUSA *et al.*, 2014).

Mesmo que existam regras na legislação brasileira que estabeleçam que o leite utilizado na produção do queijo deva ser submetido à pasteurização ou a algum tratamento térmico equivalente, ainda existem diversos produtores que utilizam do leite cru. Segundo pesquisas, 85% dos fabricantes não utilizam o leite pasteurizado para a fabricação do queijo de coalho artesanal. Desta forma, a ingestão desse queijo representa riscos à saúde do consumidor. Outro ponto importante é a forma como o queijo de coalho é consumido, pois trata-se de um alimento de pronto consumo, ou seja, não há tratamento térmico antes de consumi-lo (SOUSA *et al.*, 2014).

1.2 Legislação brasileira e qualidade microbiológica dos queijos

No Brasil a inspeção de produtos alimentícios de origem animal é feita pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo uma atribuição do MAPA em associação ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA). Todas as ações de inspeção desenvolvidas no território brasileiro estão baseadas em legislações que regulamentam as atividades que estão vinculadas a alimentos de origem animal. As ações visam garantir que alimentos de origem animal

não causem danos a saúde do consumidor e que a distribuição desses alimentos seja realizada da forma correta, considerando a qualidade higiênico-sanitária e tecnológica. A atuação de fiscalização da DIPOA no Brasil ainda pode contar com o Serviço de Inspeção Federal (SIF) para fiscalização dos estabelecimentos que estão registrados DIPOA, garantindo assim, que alimentos de origem animal não sejam prejudiciais à saúde de quem os consome (MAPA, 2021).

A regulamentação brasileira mais recente que estabelece a lista de padrões microbiológicos para alimentos é a Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada), a qual estabelece limites de segurança para a presença de *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella* spp., sendo que os limites são de $1,0 \times 10^3$ ou 3,0 log NMP/g (Número mais provável) para *E. coli* e $1,0 \times 10^3$ ou 3,0 log UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia) para *S. aureus*, além da ausência de *Salmonella* spp. em qualquer amostra de queijo (BRASIL, 2019).

Segundo a Lei 13.860 julho de 2019 (Congresso Nacional), queijo artesanal é aquele produzido de forma tradicional, de acordo com valorização e características regionais e culturais, de forma a ser seguido protocolo de elaboração diferenciado para cada tipo, já que é um alimento de grande variedade, mas que precisa manter as boas práticas de fabricação. O queijo artesanal deve seguir a identidade, qualidade e segurança sanitária e deve cumprir os requisitos impostos pelo poder público de boas práticas de fabricação. Entretanto, os procedimentos de controle das boas práticas e da fiscalização são simplificados para pequenos produtores, conforme o regulamento. É de dever das entidades de defesa sanitária e de assistência técnica orientar o produtor de queijo artesanal em relação à implementação de boas práticas agropecuárias de produção do leite e do queijo (BRASIL, 2019).

Dito isto, o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos e Produtores de Alimentos (ANVISA, 2002) é complementar, e estabelece que os estabelecimentos devam seguir pontos importantes como: Procedimentos Operacionais Padronizados (POPs), higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios, controle da água, higiene e saúde dos manipuladores, manejo dos resíduos, manutenção preventiva e calibração de equipamentos, controle integrado de vetores e pragas urbanas, seleção das matérias primas, ingredientes e embalagens e programa de recolhimento de alimentos (BRASIL, 2002).

1.3 Contaminação dos queijos com *S. aureus*

Quando se trata de alimentos feitos à base de leite cru, como os queijos artesanais, o risco de doenças transmitidas através por intermédio deles é maior (ARAGÃO *et al.*, 2020). A contaminação microbiana do leite está sempre em pesquisas da área, isso porque diz muito a respeito da qualidade higiênico sanitária desse alimento muito consumido pela população. Tal contaminação pode acontecer em várias etapas da fabricação, podendo ser desde a ordenha, manipulação, transporte, refrigeração, armazenamento até a distribuição (SILVA TEIXEIRA *et al.*, 2019).

A contaminação microbiana do queijo é de grande importância tanto para os que fabricam, pois pode causar perdas econômicas, como para a saúde pública, pois pode causar doenças que trazem risco à saúde dos consumidores. De acordo com estudos realizados no Brasil, há uma grande incidência de contaminação por *S. aureus* nos queijos de coalhos artesanais, sendo que no nordeste brasileiro os relatos são mais comuns, pois o consumo desse alimento é elevado nessa região (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Doenças causadas pelo consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos e toxinas microbianas são conhecidas por gastroenterites. Dentre as gastroenterites conhecidas, uma das mais comuns é causada pela bactéria *S. aureus*, responsável por surtos de intoxicação alimentar. Esta bactéria pode contaminar o leite de diversas formas, podendo ser na ordenha de vacas com mastite, pela pele do próprio animal, pela contaminação através do manipulador ou até mesmo pela contaminação de utensílios e equipamentos mal higienizados (SILVA TEIXEIRA, 2019).

A doença tem como sintomas principais: diarreia, vômito, cefaleia, náuseas, dores abdominais, em alguns casos, desidratação. Apesar de não ser considerada uma doença grave, quando apresentados os sintomas em pessoas mais velhas, imunossuprimidas ou crianças pode ser de grande perigo e às vezes fatal (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

1.4 Contaminação dos queijos com *E. coli*

O leite é um ótimo meio para a proliferação microbiana, que tem esse desenvolvimento aumentado devido à falta de higiene na ordenha, transporte e armazenamento. Por esse motivo, o leite e seus derivados são considerados como alguns dos alimentos mais envolvidos em surtos de DTA, principalmente em regiões onde a vigilância sanitária não funciona de forma correta. Os surtos são ainda mais comuns em localidades onde o leite utilizado para fabricação de derivados é comercializado de forma informal (MACHADO *et al.*, 2017).

Escherichia coli está entre as bactérias mais envolvidas nos surtos de DTA, sendo um contaminante comum do leite cru e seus derivados feitos a partir de leite sem pasteurização. A *E. coli* é uma bactéria Gram-negativa e pertence à família *Enterobacteriaceae*, e quando existe presença elevada desse microrganismo em alimentos, significa que existem falhas de higiene e que o alimento possui contaminação microbiana proveniente de fezes. Apesar de nem todas as cepas de *E. coli* serem patogênicas, muitas cepas possuem virulência e capacidade de causar doenças, além de que algumas possuem importância epidemiológica por apresentarem genes de resistência antimicrobiana (MACHADO *et al.*, 2017).

As infecções intestinais causadas por *E. coli* geralmente vêm associadas de alguns sintomas específicos, entre eles podemos citar: diarreia sanguinolenta ou não sanguinolenta, cólica, náusea, vômito, febre e desidratação (MACHADO *et al.*, 2017). Além disso, as cepas de *E. coli* produtoras da toxina Shiga (STEC) são causadoras de doença gastrointestinal em humanos e são de grande risco, pois podem causar sequelas e até mesmo riscos de óbito, como por exemplo, quando causam a síndrome hemolítica urêmica (SILVA *et al.*, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente a produção dos queijos artesanais vem aumentando no Brasil, e a grande maioria dos locais utilizados para a produção desses queijos são improvisados, ou seja, não possuem estrutura física adequada e a maior parte dos produtores autônomos são pessoas não capacitadas adequadamente para realizar as atividades de manipulação de alimentos de acordo com as boas práticas de fabricação, tornando, portanto, o processo de produção artesanal um potencial meio disseminador de microrganismos de importância clínica. Além disso, o queijo, por ser um alimento que possui muitas características favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, é alvo de fácil contaminação microbiológica. Pensando na grande facilidade de contaminação, no alto consumo deste alimento pela população e por sua possibilidade de fabricação artesanal, é de grande importância que haja pesquisas que avaliem a qualidade microbiológica desses produtos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Este trabalho teve como objetivo avaliar qualidade microbiológica de queijos de coalho de fabricação artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar as análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, identificação e contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem por meio da técnica de PCR para confirmação da *Salmonella* spp.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Foram analisadas seis amostras de queijo coalho. As amostras foram coletadas em diferentes feiras permanentes do Distrito Federal e foram adquiridas em quantidades de 150 g, acondicionadas em sacos plásticos transparentes. As amostras não apresentavam rótulo e datas que informassem sobre a produção e validade do alimento. Foram imediatamente transportadas das feiras para o laboratório em uma caixa térmica refrigerada e as análises microbiológicas foram iniciadas no prazo máximo de uma hora após a coleta. Todas as amostras foram analisadas em três repetições, ou seja, foram retiradas três alíquotas de cada amostra e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

4.2 Preparo das amostras e análises microbiológicas

Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada uma delas e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, desta forma, foi obtida a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram obtidas as demais diluições decimais (até 10^{-4}) (APHA, 2001).

Para a contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas, as diluições de cada amostra foram semeadas, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem (PCA) (Acumedia¹). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h para bactérias mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para bactérias psicotróficas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/g (APHA, 2001).

Para a contagem de *S. aureus*, cada uma das diluições das amostras foi semeada, pelo método de superfície, em placas de Petri contendo o meio de cultivo PCA suplementado com 6% de cloreto de sódio. As placas foram incubadas a 37°C por 48 h. As colônias suspeitas de *S. aureus* foram reisoladas em tubos de Agar Sal Manitol e submetidas à coloração de Gram (ANVISA, 2019).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lauril Sulfato Triptose (HiMedia¹). Os tubos foram incubados a

37°C por 24 h. A positividade do teste foi caracterizada pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas, simultaneamente, em tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante bile lactose a 2% (Kasvi) (para a confirmação de coliformes totais) e caldo *Escherichia coli* (Kasvi) (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 h para o teste de coliformes totais e em banho-maria a 45°C por 24 h para o teste de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos foram expressos em log NMP/g com interpretação por meio da tabela de números mais prováveis constante no Anexo A (FENG *et al.*, 2002)

Para a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 h. Após a incubação, foi pipetado 1 mL das alíquotas do caldo de enriquecimento para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo seletivo tetratonato com iodo. As amostras foram homogeneizadas e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, foram semeadas placas de Petri contendo o meio de cultivo Ágar *Salmonella Shigella* (Kasvi). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram transferidas para tubos inclinados contendo os meios bioquímicos: Agar Três Açúcares e Ferro (Kasvi), Agar Lisina Ferro (HiMedia) e Agar Fenilalanina (HiMedia). Posteriormente as colônias suspeitas de *Salmonella* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR (BRASIL, 2011).

4.3 Análises Moleculares

Para identificação molecular do gênero *Salmonella* spp. por PCR, foi utilizado o gene *invA*, através do *primer* específico expresso na Tabela 1. Esse gene é bastante aceito para identificação de *Salmonella* spp., estando presente na maioria das espécies do gênero (NCBI, 2020).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para identificação de *Salmonella* spp.

Gene	Sequência de Primer (5'-3')	Tamanho	Bactéria
<i>invA</i> forward	GCTGATGCCGGTGAAATTA T	298 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>invA</i> reverse	CGACAAGACCATCACCAA TG		

Fonte: Araujo et al., 2015.

4.4 Identificação molecular da *Salmonella* spp.

Os isolados presuntivos suspeitos de serem *Salmonella* spp. foram identificados por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). As colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo BHI e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). A qualidade e quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a identificação do gene *invA* foram descritas na Tabela 2.

Tabela 2 - Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Reagente	Concentração	<i>InvA</i> (µL)
Água MiliQ®	q.s.p 25 µL	13,85
Tampão Taq	10X	2,5
MgCl ₂ (mM)	50 mM	1,26
dNTP (mM)	2,5 mM	2
Oligo <i>F</i> (µM)	10 pmol/µL	0,5
Oligo <i>R</i> (µM)	10 pmol/µL	0,5
Taq DNA pol (U/µL)	5 U/ µL	0,4
DNA molde	10 ng	4,0

Legenda: q.s.p: quantidade suficiente para; MgCl₂: Cloreto de magnésio; mM: milimolar; µM: micromolar; U/µL: unidade de massa atômica por microlitro; ng: Nanograma; µL: microlitro.
Fonte: Autoria própria (2022).

As condições de termociclagem foram 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, 72°C por 1 min e 72°C por 10 min para a extensão final. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às contagens de bactérias mesófilas e psicotróficas estão representados na Tabela 3. A Instrução Normativa nº60 de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada) não estabelece limites para bactérias mesófilas e psicotróficas. Contudo, a Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986) recomenda o limite máximo de bactérias totais em alimentos de 7,0 log/UFC, grupo este que engloba as bactérias mesófilas e psicotróficas.

Tabela 3 - Contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de queijos de Coalho de produção artesanal.

Amostras de Queijo de Coalho	Mesófilas (log UFC/g)	Psicotróficas (log UFC/g)
Amostra 1	5,57 ± 0,21	3,30 ± 0,15
Amostra 2	6,39 ± 0,11	4,66 ± 0,10
Amostra 3	6,34 ± 0,26	3,10 ± 0,21
Amostra 4	6,78 ± 0,17	5,27 ± 0,25
Amostra 5	6,40 ± 0,29	3,84 ± 0,21
Amostra 6	5,97 ± 0,36	3,92 ± 0,10

Legenda: UFC: Unidade formadora de colônias; g: grama; os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições.

Fonte: Autoria própria, (2021).

Todas as amostras analisadas apresentaram resultados aceitáveis de bactérias mesófilas e psicotróficas com valores abaixo de 7,0 log UFC/g. Os valores dos mesófilos ficaram entre 5,57 e 6,78 log UFC/g, e os valores de psicotróficos ficaram entre 3,30 e 5,27 log UFC/g. Altas quantidades de bactérias mesófilas e psicotróficas indica más condições de higiene no momento da produção, processamento, manipulação ou falta de pasteurização e controle de qualidade do leite utilizado (ANDRADE et al., 2016).

Na literatura vários estudos têm relatado a elevada presença de bactérias mesófilas e psicotróficas em leite e derivados. No estudo de Andrade e colaboradores (2016), houve uma elevada população de bactérias mesófilas em 100% das amostras de queijos de coalho analisadas. Resultados parecidos foram encontrados no estudo

de Da Silva e colaboradores (2018), onde foram analisadas 36 amostras de queijos de coalho coletados em feiras livres do município de Petrolina - Pernambuco, sendo que 100% das amostras analisadas mostraram elevada contagem para bactérias mesófilas.

Medeiros e colaboradores (2017), analisaram a qualidade do leite utilizado na fabricação de queijos de coalho e de manteiga. Para isso foram obtidas 15 amostras de leite de fábricas de queijo sem inspeção localizadas no Rio Grande do Norte, sendo que foram encontrados microrganismos mesófilos acima dos valores permitidos em legislação em todas as amostras de leite, estando, assim, a matéria prima do queijo altamente contaminada.

A Tabela 4 mostra que dentre as seis amostras estudadas, apenas duas (33,3%) não exibiram a presença de *S. aureus*, enquanto 66,6% (4/6) das amostras excederam os valores de *S. aureus* estabelecidos na legislação brasileira (BRASIL, 2019), o que classificou esses alimentos como impróprios para consumo humano.

Tabela 4 - Contagem de *S. aureus* em amostras de queijo de coalho de fabricação artesanal.

Amostras de Queijo Coalho	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)
Amostra 1	4,30 ± 0,15
Amostra 2	ND
Amostra 3	4,53 ± 0,08
Amostra 4	4,30 ± 0,17
Amostra 5	ND
Amostra 6	4,00 ± 0,00

Legenda UFC: unidade formadora de colônia; g: grama; ND: não detectado; Valor de referência: 3,0 UFC/g (BRASIL, 2019); os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Fonte: Autoria própria, (2021).

Por se tratar de patógeno causador frequente de mastite subclínica em vacas, *S. aureus* pode ser transmitido nos processos de ordenha. Assim, o leite e os queijos contaminados com *S. aureus* podem atuar como fonte de intoxicações estafilocócicas (LEMMA et al., 2021). Portanto, considera-se o alimento altamente contaminado com *S. aureus* um risco potencial para a saúde do consumidor pela possibilidade da

produção de toxinas, já que esta pode ocorrer quando as colônias atingem concentração de 5 log UFC/g (KASEM et al. 2021).

É importante destacar que o armazenamento inadequado do queijo em temperatura ambiente facilita a multiplicação do *S. aureus* até atingir a concentração bacteriana mínima necessária para a produção de toxinas estafilocócicas.

Na Tabela 5 estão descritos os resultados referentes as análises de coliformes totais e termotolerantes em queijos de coalho deste estudo.

Tabela 5 - Enumeração de coliformes totais e termotolerantes em queijos de Coalho de produção artesanal.

Amostras de Queijo de Coalho	Coliformes Totais (log NMP/g)*	Coliformes Termotolerantes (log NMP/g)†	<i>Salmonella</i> spp.‡
Amostra 1	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 2	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 3	3,04 ± 0,60	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 4	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 5	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 6	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,33	Ausente

Legenda: NMP: Números mais provável por grama; g: grama; *Valor de referência: 3,0 NMP/g (BRASIL, 1996); † Valor de referência: 3,0 log NMP/g (BRASIL, 2019) ‡Valor de referência: Ausente (BRASIL, 2019). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três repetições. Fonte: Autoria própria, (2021).

A Instrução Normativa nº 60 de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada) não dispõe sobre valores para coliformes totais em amostras de queijos, contudo, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), dispõe como limite máximo aceitável de coliformes totais o valor de 3,0 log NMP/g. Das amostras analisadas, 100% (6/6) apresentaram valores de coliformes totais acima de 3,0 log NMP/g. De acordo com a literatura, amostras que excedem os valores de coliformes totais indicam a existência de condições sanitárias precárias nos locais de fabricação de queijos de coalho (SOUSA et al., 2020).

Vários estudos têm demonstrado resultados semelhantes. Melo e

colaboradores (2021), encontraram em 90% das amostras de queijo coletadas em feira livre de Campina Grande - Pará, coliformes totais acima do limite aceitável. Da mesma forma, Sousa et al. (2020) realizaram um estudo no município de Soledade - Pará, onde foram coletadas sete amostras de queijo de coalho de fornecedores locais, e 85,71% das amostras estavam com coliformes totais acima do limite aceitável.

No estudo conduzido por Bezerra et al. (2017), realizado no Nordeste do Brasil, foram utilizadas amostras de queijos de coalho retiradas de cinco pontos de venda em uma feira livre localizada no Alto Sertão da Paraíba. Dentre as amostras analisadas, os valores de coliformes totais estavam acima do estipulado em 18 das 20 amostras. Dessa forma, destaca-se a importância de examinar a presença de coliformes totais nas amostras de queijo de coalho, pois estão diretamente associados à qualidade higiênico-sanitária dos alimentos.

Para os coliformes termotolerantes, a IN nº60 de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada) determina como limite microbiológico o valor de 3,0 log NMP/g em amostras de queijo. Neste estudo, do total de amostras analisadas, 100% (6/6) apresentam valores superiores aos estabelecidos pela legislação. *Escherichia coli* é o principal representante das bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes e sua presença indica a contaminação de origem fecal, funcionando como indicador de higiene do produto, especialmente em queijos elaborados a partir de leite que não passou por processo de pasteurização. Além disso, devido sua capacidade de produzir gás, o estufamento precoce do alimento é um dos principais defeitos associados a quantidade excessiva dessas bactérias, aliado a mudança de textura e sabor do queijo (CAMARGO et al., 2021).

Vários estudos na literatura reportaram resultados similares ao desta pesquisa. No estudo de Da Silva e colaboradores (2018), foram analisadas 36 amostras de queijos de coalho, sendo coletadas aleatoriamente em quatro diferentes feiras da região de Petrolina - Pernambuco. Das 36 amostras, todas encontraram-se fora dos valores estabelecidos na legislação para coliformes totais e termotolerantes. Os autores enaltecem a ideia de que esses números elevados indicam condições de higiene precárias e, desta forma, os queijos de coalho dessa região apresentam má qualidade microbiológica, tornando-os impróprios para consumo humano.

Bezerra et al. (2017), analisaram 20 amostras de queijos de coalho, e 7 amostras (35%) apresentaram valores acima do limite permitido pela legislação para coliformes termotolerantes. No estudo de Andrade e colaboradores (2016), coliformes totais e termotolerantes estavam acima do permitido pela Legislação brasileira em

todas as amostras queijos de coalho analisadas.

A legislação vigente IN n° 60 de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada) padroniza a ausência de *Salmonella* spp. em alimentos para comercialização. Essa bactéria pode sobreviver à acidez estomacal podendo chegar ao intestino e causar infecções graves (BRASIL, 2019b). Por ser capaz de causar infecções graves por ingestão alimentar, a presença desse microrganismo no queijo o torna impróprio para consumo. A pasteurização é um processo capaz de eliminar essa bactéria, desta forma, a falta de pasteurização pode evidenciar prevalência dessa bactérias em queijos de coalho de produção artesanal (MELO et al., 2021).

Dentre as seis amostras de queijo de coalho analisadas no presente trabalho, todas apresentaram ausência de *Salmonella* (Tabela 5), estando 100% das amostras de acordo com o estabelecido em legislação vigente.

Todavia, vários estudos têm descrito a presença deste patógenos em queijos de produção artesanal. No estudo de Melo e colaboradores (2021) que realizaram uma pesquisa na feira livre de Campina Grande na Paraíba, onde foram utilizadas dez amostras de queijo de coalho de produção artesanal compradas de comerciantes aleatórios, apenas quatro tiveram resultado ausente para *Salmonella* spp, ou seja, 60% das amostras apresentaram cepas características para este patógeno, tornando esses queijos impróprios para consumo, uma vez que a presença dessa bactéria é prejudicial à saúde de quem os consome. Entre as dez amostras coletadas apenas uma apresentou valores dentro dos impostos pela IN n° 60 de 2019 (Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada) em relação à presença de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, estando apto para consumo humano (ANVISA, 2019).

Em outro estudo, desta vez com amostras de queijo minas frescal comercializados e vendidos em Fernandópolis (SP), Camargo e colaboradores (2021) encontraram *Salmonella* em cinco das amostras estudadas. Sousa et al., (2020) encontrou em seu estudo presença de *Salmonella* em cinco das sete amostras analisadas, no total foram coletadas sete amostras de queijo de coalho de fornecedores locais na Paraíba.

Resultados parecidos também foram identificados por Bezerra et al., (2017) em estudo realizado no município de Souza na Paraíba, foram analisadas 20 amostras de queijo de coalho onde 40% delas tiveram resultados positivos para presença de *Salmonella*, podendo indicar algumas falhas no controle de higiene dos manipuladores, com um possível descaso com as Boas Práticas de Manipulação durante a preparação

do alimento, sobretudo a pasteurização.

6 CONCLUSÃO

Tendo em vista que os resultados reprovaram para consumo humano todas as amostras de queijo de coalho analisadas em pelo menos um parâmetro da legislação brasileira, entende-se que existe carência de fiscalização pelos órgãos de inspeção dos queijos de coalho de fabricação artesanal que são comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal. Além disso, conclui-se que é de grande importância que o leite utilizado para produzir o alimento passe por pasteurização ou outro tratamento térmico, de modo que, diminua sua contaminação.

Os nossos achados sugerem que a contaminação microbiana desse alimento, pode ocorrer de diversas formas, sendo no momento da manipulação, através de utensílios mal higienizados, no momento da ordenha do leite ou no armazenamento. E tendo em vista a possibilidade de DTA por meio da presença patógenos de origem alimentar, como *E. coli* produtora de toxina Shiga no leite bovino, o consumo de queijos produzidos a partir de leite cru constitui um risco para a saúde, especialmente em se tratando dos consumidores pertencentes aos grupos de risco.

Dito isto, fica claro que a fiscalização é de suma importância na produção de alimentos, prevenindo, assim, algumas doenças prejudiciais à saúde humana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, V. O. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos coalho. I Congresso Internacional das Ciências Agrárias (COINTER)- PDVAgro, 2016.

ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, volume 1.** 6ª Ed. Brasília, DF. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019.

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

ARAÚJO, Y. F. Avaliação da qualidade da tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) fresca e resfriada e do gelo de manutenção comercializados na cidade de Brasília, Distrito Federal. TCC, Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, 2015.

ARAGÃO, B. B. *et al.* Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus* em queijo coalho artesanal elaborado com leite de cabra produzido no estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.72, n.2, p.615-622, 2020.

BEZERRA, D. E. L. *et al.* Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa – Paraíba. **Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, n. 37, p. 85-91, 2017.

BOMFIM, A. P. *et al.* Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos Coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 27, 2020.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n.º 275 de 21 de Outubro de 2002, Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos**

Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Brasília, DF, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*.** Brasília: Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz, 2011.

BRASIL. **Ministério da saúde, secretaria de atenção à saúde, departamento de atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira..** – 2. ed. – Brasília: ministério da saúde, 2014.

BRASIL. Lei nº 13.860, de 18 de julho de 2019. Dispõe sobre a elaboração e a comercialização de queijos artesanais e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19/07/2019. (a)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019. Estabelece as listas de padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 23 dez. 2019.(b)

CAMARGO, A. C. et al. Microbiological quality and safety of Brazilian artisanal cheeses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 393-409, 2021.

CRUZ, F. & MENASCHE, R. O debate em torno de queijos feitos de leite cru: entre aspectos normativos e a valorização da produção tradicional. **Vigilância Sanitária Em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 2, n. 4, p. 34-42, 2014.

DA SILVA, G. L. Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, n.01, p. 2613-2626, 2018.

FENG, P.; WEAGENT, S. D; GRANT, M. A. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em: www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005213953/unrestricted/etd.pdf. Acesso em: 14 jan 2021.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). **Microorganisms in foods.2. Sampling for microbiological**

analysis: Principles and specific applications (2d ed). Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.

ITAL. **Brasil Dairy Trends 2020: Tendência do mercado de produtos lácteos.** 1ed. – Campinas, SP: ITAL, 2017. Disponível em: <<http://www.brasildairyrends.com.br/2/>> Acesso em: 03 set 2021.

KASEM, N. G. *et al.* Antimicrobial resistance and molecular genotyping of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from some Egyptian cheeses. **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 8, n. 2, p. 246-255, 2021.

LEMMA, F. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* in milk and traditionally processed dairy products in Addis Ababa, Ethiopia. **Biomed Research International**, p. 1-7, 2021.

MACHADO, F. *et al.* Genes de virulência eaeA e LT em *E. coli* isoladas de leite cru comercializado no sul do estado do Piauí, Brasil. **Revista Electrónica de Veterinária**, v. 18, n. 9, 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGROPECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Produtos de origem animal. Brasília, 2021. Acesso em 18 out. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal>>.

MEDEIROS, N. C. *et al.* Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 38, p. 1955-1962, 2017

MELO, W. G. *et al.* Análise da qualidade do queijo coalho vendidos em uma feira livre do município de Campina Grande-PB. **Research, Society and Development**, v.10, n. 7, 2021.

MUNHOZ, I. G. A. *et al.* Análise microbiológica comparativa de queijo coalho comercializado em supermercados e feiras livres na cidade de Maceió – Alagoas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 5, 2021.

NCBI. **invA type III secretion system export apparatus protein InvA [*Salmonella bongori*]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/61369727>>. Acesso em: ago de 2021.

OLIVEIRA, F. I. P. *et al.* Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo coalho.

Cadernos ESP, v. 13, n. 2, 2019.

OLIVEIRA, K. M. L. *et al.* Presença de *Staphylococcus aureus* em queijos artesanais comercializados na cidade de Uruaçu - Goiás. **Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia**, p. 64-71, 2015.

PEREIRA, T. *et al.* *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. v.12, n. 2, p. 358-361, 2017.

PRATES, D. F. *et al.* Microbiological quality and safety assessment in the production of moderate and high humidity cheeses. **Ciência Rural**, v. 47, n. 11, p. e20170363, 2017.

RUWER, C.M. *et al.* Surtos de doenças transmitidas por alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o problema do queijo coalho. **Segurança Alimentar Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SILVA TEIXEIRA, C. M. & ANDRADE FIGUEIREDO, M. Qualidade microbiológica do leite bovino no Brasil associada à *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v.6, n. 1, p. 196-216, 2019.

SILVA, F. F. *et al.* Pesquisa de genes de virulência de *Escherichia coli* isoladas de leite cru refrigerado da região central do Paraná. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 240-242, 2016.

SOUSA, A. Z. B. *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 01 p. 30-35, 2014.

SOUSA, M. L. F. *et al.* Avaliação microbiológica do queijo artesanal produzido e comercializado em uma cidade do interior da Paraíba. **Research, Society and Development**, v.9, n. 8, 2020.

YAMANAKA, E. H. U. *et al.* Microbiological quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.75, p.1-9, 2016.

ANEXOS

ANEXO A- Número Mais Provável (NMP) para três tubos e respectivos intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade.

Tubos positivos			NMP /g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/ g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.0 1	0.00 1		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

FONTE: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.html>