

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

**FELIPE CAMELO DOS SANTOS**

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO COALHO DE FABRICAÇÃO  
ARTESANAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO  
FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF**

**2021**

FELIPE CAMELO DOS SANTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO COALHO DE FABRICAÇÃO  
ARTESANAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO  
FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito para obtenção do grau de Bacharel  
em Farmácia, na Universidade de Brasília,  
Faculdade de Ceilândia.

**Orientadora:** Farmacêutica Letícia Fernandes Silva Rodrigues

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2021

CS237q Camelo dos Santos, Felipe  
QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO COALHO DE  
FABRICAÇÃO ARTESANAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES  
DO DISTRITO FEDERAL / Felipe Camelo dos Santos; orientador  
Leticia Fernandes Silva Rodrigues; co-orientador Daniela  
Castilho Orsi. -- Brasília, 2021.  
34 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de  
Brasília, 2021.

1. Queijo artesanal. 2. Controle microbiológico. 3.  
Segurança alimentar. I. Fernandes Silva Rodrigues, Leticia,  
orient. II. Castilho Orsi, Daniela, co-orient. III. Título.

FELIPE CAMELO DOS SANTOS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO COALHO DE FABRICAÇÃO  
ARTESANAL COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO DISTRITO  
FEDERAL**

**BANCA EXAMINADORA**

*Letícia F.S. Rodrigues*

---

**Orientadora:** Farmacêutica Letícia Fernandes Silva Rodrigues  
(FCE/ Universidade de Brasília)

*Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira*

---

**Avaliador:** Farmacêutica Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira  
(FCE/ Universidade de Brasília)

*Sabrina Lunara S. Pavelquesi*

---

**Avaliador:** Farmacêutica Sabrina Lunara Santos Pavelquesi  
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

## RESUMO

Os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado problemas relacionados à qualidade microbiológica. Um local muito comum de comercialização de queijos artesanais no Distrito Federal são as feiras permanentes. Este estudo analisou a qualidade microbiológica de seis amostras de queijos do tipo coalho artesanais comercializadas em feiras permanentes do Distrito Federal. Realizou-se as análises bacteriológicas: contagem total dos micro-organismos mesófilos e psicrotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella* spp. Quanto à contaminação por coliformes totais, em 66% das amostras analisadas foram encontrados valores acima de 3,0 log NMP/g, indicando falta de qualidade higiênico-sanitária desses queijos. As contagens para *S. aureus* excederam o limite aceitável de 3,0 log NMP/g em todas as amostras, e, portanto, as 6 amostras de queijos coalhos artesanais estavam impróprias para consumo segundo a legislação brasileira. Além disso, 50% das amostras analisadas excederam o limite aceitável de 3,0 log NMP/g para coliformes termotolerantes. Esses resultados evidenciaram condições higiênico-sanitárias precárias na produção e comercialização de queijos do tipo coalho artesanais em feiras permanentes do Distrito Federal. Deste modo, ressalta-se a importância do controle de qualidade na produção e comercialização destes produtos, assim como a necessidade das ações da vigilância sanitária para orientação aos manipuladores e produtores de queijo.

**Palavras-chave:** Queijo artesanal. Controle microbiológico. Segurança alimentar.

## ABSTRACT

Brazilian artisanal cheeses have problems related to microbiological quality. A very common place for the commercialization of artisanal cheeses in the Federal District is the permanent fairs. This study analyzed the microbiological quality of six artisanal “coalho” cheeses sold at permanent fairs in the Federal District. Bacteriological analyzes were carried out: total count of mesophilic and psychrotrophic microorganisms, determination of the Most Probable Number (NMP) of total coliforms and thermotolerant coliforms, count of *Staphylococcus aureus* and research of *Salmonella* spp. As for the contamination by total coliforms, in 66% of the analyzed ones, values were found above 3.0 log NMP/g, indicating a lack of hygienic-sanitary quality for these cheeses. The counts for *S. aureus* exceeded the acceptable limit of 3.0 log NMP/g in all samples, and therefore the 6 samples of artisanal “coalho” cheese were unfit for consumption according to Brazilian legislation. In addition, 50% of the samples analyzed exceeded the acceptable limit of 3.0 log NMP / g for thermotolerant coliforms. These results showed precarious hygienic-sanitary conditions in the production and commercialization of artisanal “coalho” cheese at permanent fairs in the Federal District. Thus, the importance of quality control in the production and marketing of these products is emphasized, as well as the need for health surveillance actions to guide cheese handlers and producers.

**Keywords:** Artisanal cheese. Microbiological quality. Food safety.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Sequência do primer utilizado e grandeza do produto amplificado na técnica de PCR para identificação do gene <i>invA</i> .....	<b>22</b>
<b>Tabela 2</b> - Análises microbiológicas das amostras dos queijos coalhos artesanais.....	<b>24</b>

## **SUMÁRIO**

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
1.1 Definição e comercialização de queijos artesanais	9
1.2 Queijos brasileiros e queijo coalho	10
1.3 Queijos industriais e artesanais brasileiros e aspectos legais	11
1.4 Legislação brasileira e limites microbiológicos para queijos	12
1.5 Biologia molecular na identificação de bactérias em alimentos	14
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	<b>17</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>18</b>
4.1. Coleta das amostras e análises microbiológicas	18
4.2. Análises moleculares para identificação de Salmonella	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
5.1. Análises microbiológicas das amostras dos queijos coalhos artesanais	21
5.2. Análise moleculares: Pesquisa de Salmonella spp.	25
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>28</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ABIQ</b> -	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
<b>BHI</b> -	Brain Heart Infusion (Infusão Cérebro Coração)
<b>BPF</b> -	Boas Práticas de Fabricação
<b>DNA</b> -	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EPEC</b> -	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
<b>ICMSF</b> -	Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos)
<b>MAPA</b> -	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>NMP</b> -	Número Mais Provável
<b>PCR</b> -	Reação em Cadeia da Polimerase
<b>TSI</b> -	Triple Sugar Iron (Três açúcares e ferro)
<b>UFC</b> -	Unidades Formadoras de Colônia

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Definição e comercialização de queijos artesanais

Entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite coagulado pela ação do coalho (que contém enzimas específicas), bactérias específicas e/ou ácido orgânicos (isolados ou combinados), com ou sem agregação de especiarias ou condimentos, aromatizantes e corantes. No Brasil, os queijos sem maturação devem ser produzidos a partir de leite tratado termicamente. Fica excluído da obrigação de ser submetido à pasteurização ou outro tratamento térmico, o leite que se destine à elaboração dos queijos submetidos a um processo de maturação por um período não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996).

Assim, no Brasil, o queijo industrializado geralmente é elaborado a partir de leite pasteurizado, em indústria de laticínios, acompanhada pelo selo do serviço de inspeção sanitária (BRASIL, 1996). Porém, no mercado brasileiro também existem os queijos artesanais, de fabricação caseira ou em pequenas propriedades rurais, que não passam por controle de qualidade, não são inspecionados e são comumente comercializados em feiras, apresentando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante sua produção e conservação. Esses queijos vendidos informalmente não possuem as características que estabelecem os padrões mínimos de segurança alimentar, tais como: data de validade e fabricação, descrição da origem do produto e selos de inspeção. Em feiras, é comum esses queijos serem expostos em prateleiras, sem nenhum tipo de refrigeração (FERREIRA *et al.*, 2011; SILVA, 2015; YAMANAKA *et al.*, 2016).

Os queijos artesanais brasileiros têm demonstrado problemas relacionados à qualidade microbiológica. As falhas na aplicação de boas práticas agropecuárias e de fabricação, a utilização de matéria prima de baixa qualidade e a produção sem condições higiênico-sanitárias apropriadas, são alguns dos fatores que comprometem a qualidade dos queijos artesanais (EVANGELISTA-BARRETO *et al.* 2016; FERREIRA *et al.*, 2011; SILVA, 2015).

Um local muito comum de comercialização de queijos artesanais no Distrito Federal são as feiras permanentes e a Lei nº 4.748 de 02 de fevereiro de 2012 dispõe que as feiras permanentes são:

Locais onde se realizam atividades mercantis de caráter constante realizada em logradouro público destinado para esse fim, com instalações comerciais fixas e edificadas para comercialização dos produtos referidos para as feiras livres e produtos de bazar e agropecuários, refeições típicas regionais, jornais, revistas, além de prestação de pequenos serviços, na forma do regulamento (GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL, 2012).

As feiras permanentes estão espalhadas por quase todas as regiões administrativas da capital, com exceção do Lago Sul e Lago Norte. Ao todo são 38 feiras permanentes e mais de 20 mil feirantes que trabalham nesses locais (GOVERNO DO DISTRITO FEDERAL, 2020). Essas feiras são fixas e são caracterizadas por produtos com manifestações culturais distintas, como as raízes cariocas da feira do Cruzeiro, o estilo nordestino das feiras do Núcleo Bandeirante e Ceilândia e a mescla de cultura mineira e goiana da feira de Taguatinga, Gama e Sobradinho (LEITE, 2015).

## **1.2 Queijos brasileiros e queijo coalho**

Em termos de produção de queijos, o Brasil fica entre os cinco maiores do mundo, com produção anual de 1,2 milhões de toneladas, mas aquém de alguns países, como os Estados Unidos, que atualmente é o maior produtor mundial de queijos com produção estimada em mais de 5,3 milhões de toneladas por ano. Em seguida aparece Alemanha e França, com 2,2 e 2,0 milhões de toneladas por ano respectivamente. Grande parte do volume de produção de queijos no Brasil é destinada para consumo interno. Conforme a Associação Brasileira de Indústria de Queijo - ABIQ (2019), hoje o Brasil importa mais queijo do que exporta, sendo que 36 mil toneladas são importadas todos os anos, enquanto apenas 3,6 mil toneladas são exportadas.

Segundo a ABIQ (2019), 65% dos queijos produzidos no Brasil são do tipo mussarela, em seguida, com 26% de produção, aparece o queijo do tipo Minas frescal, os queijos fundidos e o queijo do tipo coalho. E somente 9% da produção

são dos chamados queijos especiais, como parmesão, gorgonzola, gouda, estepe, entre outros.

O mercado brasileiro de queijos tem crescido consideravelmente nos últimos anos, sendo o consumo médio de queijos por habitante no Brasil em 2017 de, aproximadamente, 5,4 quilos por ano e há uma projeção que em 2030 esse consumo aumente para cerca de 9,6 Kg por habitante (ABIQ, 2017).

O queijo do tipo coalho é classificado como um queijo de média a alta umidade (36 a 54%), de massa semi-cozida ou cozida e com teor de gordura entre 35 e 60% (gordo). Deve apresentar consistência elástica, textura compacta e macia, cor branco-amarelado uniforme, sabor ligeiramente ácido, podendo ser salgado, crosta fina e sem trinca (não sendo usual a formação de casca bem definida) e algumas olhaduras pequenas ou sem olhaduras. O queijo coalho é obtido por coagulação do leite pasteurizado, por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas (BRASIL, 2001).

Os processos de elaboração do queijo de coalho são: a) coagulação em torno de 40 minutos; b) corte e mexedura da massa; c) remoção parcial do soro; d) aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semi-cozida (até 45°C) ou cozida (entre 45°C e 55°C); e) adição de sal (cloreto de sódio) a massa, se for o caso; f) prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura de 10-12°C, normalmente até 10 dias (BRASIL, 2001).

### **1.3 Queijos industriais e artesanais brasileiros e aspectos legais**

Os queijos industrializados tipo coalho são fabricados em indústrias de laticínios a partir de leite pasteurizado, acompanhado por serviço de inspeção sanitária (BRASIL, 1996). A pasteurização do leite tem como objetivo a destruição dos possíveis microrganismos patogênicos. A redução da carga microbiana constitui a base para os posteriores processos de transformação do leite em derivados lácteos, como os queijos (MENEZES *et al.*, 2014).

Para os queijos artesanais existe um conjunto de fatores que desempenham um papel de destaque no controle da microbiota indesejável e que são importantes para a segurança de consumo desses queijos. Entre eles os requisitos para o

reconhecimento de queijaria produtora de queijo artesanal segundo a recente Lei nº 13.860/2019 (BRASIL, 2019) e a aplicação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) (DORES *et al.*, 2012).

Um fator que causa preocupação é que muitos estabelecimentos produtores de queijos artesanais não estão formalizados e, portanto, não recebem inspeção sanitária e não possuem padrões de identidade e qualidade dos seus produtos, exercendo atividade informal (DORES *et al.*, 2012). Além dos produtores informais de queijo Minas artesanal, outro exemplo são os produtores artesanais de queijo coalho em várias regiões do Brasil. No nordeste, por exemplo, alguns produtores utilizam leite cru e não obedecem às normas higiênico-sanitárias na produção, onde o queijo coalho artesanal pode oferecer risco à saúde do consumidor (DIAS *et al.*, 2015).

Um dos principais problemas do uso do leite cru na fabricação dos queijos artesanais é a possibilidade de elevada presença de microrganismos patogênicos nos queijos. Inúmeros trabalhos detectaram *S. aureus* em contagens acima do permitido pela legislação brasileira nos queijos artesanais brasileiros (DIAS *et al.*, 2015; EVANGELISTA-BARRETO *et al.* 2016; FREITAS *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2016; SILVA, 2015; SOUSA *et al.*, 2014; YAMANAKA *et al.*, 2016).

#### **1.4 Legislação brasileira e limites microbiológicos para queijos**

A legislação brasileira determina como parâmetros microbiológicos para os queijos a quantidade limite para coliformes termotolerantes e para *Staphylococcus aureus* de  $1 \times 10^3$  NMP ou UFC/g e *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g do produto (BRASIL, 2019).

O *Staphylococcus aureus* é uma das espécies contaminantes mais prevalentes em leite e queijos, principalmente os de fabricação informal, nos quais o controle sanitário não é monitorado, e assim, são frequentemente associados aos surtos alimentares (DIEDRICH *et al.*, 2013). *S. aureus* é um microrganismo patogênico, potencialmente produtor de enterotoxinas, tais quais, quando pré-formadas e ingeridas com alimentos, podem causar intoxicação alimentar. As enterotoxinas estafilocócicas, por sua vez, são proteínas extracelulares de baixo peso molecular, hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas no sistema gastrointestinal, permanecendo ativas após a ingestão (ZOCCHÉ & SILVA,

2012). Uma vez pré-formadas no leite cru, as enterotoxinas poderão permanecer ativas após o processamento do queijo, tendo em vista sua termorresistência (SOUSA *et al.*, 2014).

A presença elevada de coliformes totais no queijo é um importante indicador de condições higiênicas insatisfatórias. Os coliformes totais são compostos por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, capazes de fermentar lactose produzindo ácido e gás num período de 24-48 horas a 32-37°C. São bacilos Gram negativos, sendo anaeróbios facultativos (GARCIA *et al.*, 2016). As bactérias do grupo coliforme em altas quantidades são consideradas as principais causadoras de deterioração de queijos, o que causa estufamento precoce dos produtos e fermentações anormais (FERREIRA *et al.*, 2011).

Os coliformes termotolerantes compõem um subgrupo dos coliformes totais, que fermentam lactose com temperatura ótima entre 44,5 a 45,5°C em 24 horas. A *Escherichia coli* é o microrganismo com maior relevância neste grupo (RODRIGUES & FERREIRA, 2016). O aparecimento da bactéria *E. coli* em produtos alimentares aponta contaminação de maneira direta ou indireta com fezes humanas ou animais, indicando condições de higiene impróprias na produção ou armazenamento desses produtos (FERREIRA *et al.*, 2011). No leite, a elevada presença de coliformes termotolerantes indica presença de animais oriundos de ambientes contaminados na área de ordenha, já que esses microrganismos estão presentes no esterco e solo (CHAPAVAL *et al.*, 2010).

O grupo dos coliformes termotolerantes tem sido encontrado com frequência em números elevados em pesquisas envolvendo queijos artesanais (DIAS *et al.*, 2015; EVANGELISTA-BARRETO *et al.* 2016; FREITAS *et al.*, 2013; GARCIA *et al.*, 2016; SILVA, 2015; SOUSA *et al.*, 2014; YAMANAKA *et al.*, 2016). Sua presença nos queijos acima do limite máximo permitido pela legislação indica uso de matéria-prima de má qualidade e falhas nas BPF, assim como, uso de equipamentos mal higienizados, manipulação sem cuidados higiênicos e ainda proliferação microbiana devido a condições inadequadas de armazenamento, que permitem a multiplicação desses microrganismos (FERREIRA *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2013).

No estudo de Dias *et al.* (2015) as amostras de queijo coalho que estavam conservadas por refrigeração apresentaram um menor número de coliformes

termotolerantes em relação às que estavam conservadas na temperatura ambiente. Das amostras refrigeradas, 25% apresentaram valores de coliformes termotolerantes acima do limite, enquanto 44% das amostras não refrigeradas excederam o limite para coliformes termotolerantes.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos gram-negativos que não possuem esporos e são anaeróbios facultativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São capazes de crescer em diferentes meios de cultura, formando colônias visíveis em 24 horas a 37°C. A contaminação dos alimentos (principalmente de origem animal) por *Salmonella* spp. pode causar a salmonelose. Esse patógeno está presente mundialmente e com maior prevalência do sorotipo Enteritidis, o qual é responsável por causar surtos de doença alimentar em vários países (BORGES, 2010). A contaminação dos queijos com a *Salmonella* pode estar relacionada a diferentes fontes, porém a pasteurização do leite é capaz de eliminá-la, evidenciando, mais uma vez, a preocupação acerca do uso do leite cru para a fabricação de queijos artesanais. (SOUSA *et al.*, 2014).

### **1.5 Biologia molecular na identificação de bactérias em alimentos**

Nos últimos anos houve um aumento no número de técnicas para identificação genética de microrganismos com relevância clínica, destacando-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Desenvolvida primeiramente por Kary B. Mullis em 1985, a PCR é atualmente uma das técnicas mais utilizadas para caracterização genética de patógenos (GANDRA *et al.*, 2008).

Os procedimentos bioquímicos convencionais utilizados para a caracterização de patógenos, apesar de baratos e sensíveis, são lentos podendo levar dias para o resultado, além de serem susceptíveis a fatores de variações gênicas e leituras errôneas. Nesse cenário, a PCR destaca-se por sua praticidade, rapidez e confiabilidade para realizar este tipo de análise. A técnica de reação em cadeia da polimerase baseia-se na multiplicação em milhões de vezes de uma cadeia de genes de DNA isolada a partir de um molde de fragmentos de DNA com sequência conhecida e complementar ao gene do organismo a ser analisado, permitindo resultados mais rápidos e específicos, sendo uma técnica relativamente simples de ser aplicada em laboratórios (SÁ, 2012).

De acordo com Andrade *et al.* (2010), o uso da biologia molecular permitindo que laboratórios de diagnóstico, tanto para humanos quanto animais, e de controle de qualidade trabalhem com mais eficiência, já é uma realidade e tende a se expandir cada vez mais rápido. A exemplo da eficiência da técnica de PCR, tem-se a redução do tempo de identificação da *Salmonella* spp. causadora de salmonelose, de dias para poucas horas, em comparação aos métodos convencionais, podendo a PCR também ser usada para identificação de microrganismos não passíveis de cultivo convencional (ANDRADE *et al.*, 2010).

Através da técnica de PCR é possível realizar a amplificação enzimática "*in vitro*" de fragmentos de DNA, usando um par de primers que se hibridizam com as regiões a serem amplificadas. O processo acontece em progressão geométrica em um aparelho denominado de termociclador, permitindo o grande aumento do fragmento do DNA a ser analisado em poucas horas (SCHEIDEGGER, 2009). A enzima DNA Polimerase termoestável (Taq polimerase), isolada de uma bactéria resistente ao calor, é usada na PCR e é responsável por utilizar os nucleotídeos disponíveis no meio para estender a fita de DNA a partir dos fragmentos indicados pelos iniciadores (GANDRA *et al.*, 2008; SCHEIDEGGER, 2009). Assim, a cada ciclo no termociclador, as cópias de DNA produzidas se tornam moldes para o ciclo seguinte (MURRAY *et al.*, 2017). Os produtos da PCR podem ser analisados posteriormente por eletroforese em gel de agarose (SCHEIDEGGER, 2009).

No estudo de Chapaval (2003), a técnica de PCR mostrou-se útil na identificação de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas em amostras de leite bovino na Região de Piracicaba, sendo que 69,7% das amostras utilizadas nesse estudo se mostraram positivas para a presença de um ou mais genes de *S. aureus*. No trabalho de Zocche & Silva (2012), através de amostras contaminadas artificialmente com *S. aureus*, foi possível observar a presença de genes responsáveis por produção de enterotoxinas estafilocócicas em alimentos de origem animal, como carnes, leite e seus derivados antes desses organismos atingirem níveis capazes de causar intoxicação alimentar. Já no estudo realizado por Giazzi (2013), verificou-se através da reação em cadeia de polimerase a presença de *Salmonella* em 21,15% das amostras e *E. coli* patogênica (sorotipo EPEC) em 5,26% das amostras de queijos minas frescal produzidos e comercializados na cidade de Londrina- PR.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

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

### 2.2 Objetivos específicos

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

### **3 JUSTIFICATIVA**

Grande parte dos locais destinados ao preparo de queijo artesanal são improvisados, ou seja, não possuem estrutura física adequada e nem indivíduos capacitados para realizar as atividades de manipulação de alimentos. O queijo, por sofrer muita manipulação e apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos, é um alvo importante de contaminação microbiológica. Tendo em vista os potenciais riscos de contaminação na cadeia produtiva dos queijos artesanais e seu alto consumo pela população brasileira, torna-se importante a realização de pesquisas que avaliem a qualidade microbiológica desses produtos, a fim de garantir a segurança alimentar do consumidor.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Coleta das amostras e análises microbiológicas

As seis amostras de queijo coalho de fabricação artesanal foram coletadas em diferentes feiras permanentes do Distrito Federal no mês de janeiro de 2021.

As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, UnB. Todas as amostras foram avaliadas através das análises bacteriológicas: contagem total dos microrganismos mesófilos e psicotróficos, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes, contagem de *Staphylococcus aureus* e pesquisa de *Salmonella spp.*. Para a contagem total de bactérias, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem, com incubação a 37°C por 24 horas para mesófilas e a 7°C ± 1°C por 7 dias para psicotróficas.

Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes, as amostras foram inoculadas em caldo Lauril Sulfato Triptose, a 37°C por 48 h. Alíquotas dos tubos positivos foram inoculadas, simultaneamente, em caldo verde brilhante bile lactose 2% a 37°C por 24 h (para a confirmação de coliformes totais) e em caldo *Escherichia coli* em banho-maria a 45°C por 24 h (para a confirmação de coliformes termotolerantes).

Para a contagem de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar Sal Manitol a 37°C por 48 h. Após incubação, foram realizados esfregaços das colônias típicas para coloração de Gram.

Para a identificar *Salmonella spp.*, alíquotas do caldo de enriquecimento foram transferidas para caldo selenito cistina e incubadas a 37°C por 24 h. Depois da incubação, foi usado Ágar Salmonella Shigella para isolar os microrganismos. As colônias que apresentaram cor escurecida e que não fermentaram a lactose foram passadas para tubos com meio de cultivo Ágar TSI. As amostras que exibiram reações típicas de *Salmonella* foram sujeitas à identificação molecular através da PCR. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram descritos como média e desvio padrão.

## 4.2. Análises moleculares para identificação de *Salmonella*

Para a identificar a *Salmonella* spp. foi usado o fragmento de 298 pares de base que se refere ao gene *invA* (Tabela 1).

**Tabela 1** - Sequência do primer utilizado e grandeza do produto amplificado na técnica de PCR para identificação do gene *invA*

Primer	Sequência 5'-3'	Produto amplificado	Bactéria
<i>invA foward</i>	CATTGGTGATGGTCTTGTCG	298 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>invA reverse</i>	CTCGCCTTTGCTGGTTTTAG		

Fonte: Oliveira et al, 2017.

Os isolados presuntivos suspeitos de serem patogênicos foram identificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase. Para extração do DNA, as colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem utilizadas na PCR foram 95°C por 2 min para desnaturação inicial; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min; 72°C por 10 min para a extensão final. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub>, 2 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL dos oligonucleotídeos foward e reverse (10 µM), 0,4 µL de Taq DNA Polimerase (Cenbiot®, 5 U/µL), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Análises microbiológicas das amostras dos queijos coalhos artesanais

A Tabela 2 apresenta os resultados dos testes microbiológicos realizados nos queijos tipo coalho artesanais. A legislação brasileira determina como parâmetros microbiológicos para os queijos a quantidade limite para coliformes termotolerantes e para *S. aureus* de 3,0 log NMP ou UFC/g e *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25g do produto (BRASIL, 2019).

**Tabela 2** - Análises microbiológicas das amostras dos queijos coalhos artesanais

Amostras	Bactérias mesófilas (log UFC/g)	Bactérias psicrótróficas (log UFC/g)	Coliformes totais (log NMP/g)	Coliformes termotolerantes (log NMP/g)	<i>S. aureus</i> (log UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.
1	5,78±0,09	3,57±0,24	<b>3,04±0,00</b>	<b>3,04±0,00</b>	<b>4,00±0,40</b>	Ausência
2	5,92±0,05	4,66±0,17	ND	ND	<b>4,30±0,10</b>	Ausência
3	5,87±0,02	4,58±0,07	<b>3,04±0,00</b>	<b>3,04±0,00</b>	<b>4,00±0,27</b>	Ausência
4	6,11±0,26	6,45±0,48	<b>3,04±0,00</b>	2,32±0,46	<b>4,30±0,35</b>	Ausência
5	7,70±0,17	3,00±0,08	<b>3,04±0,00</b>	<b>3,04±0,00</b>	<b>4,30±0,24</b>	Ausência
6	6,04±0,15	4,14±0,03	2,38±0,54	1,87±0,82	<b>4,30±0,24</b>	Ausência

Os resultados foram expressos como médias ± desvio padrão de três repetições; UFC = Unidades Formadoras de Colônias, NMP = Número Mais Provável; ND = não detectado

Para queijos, a legislação brasileira (BRASIL, 2019) não estabelece limites para bactérias mesófilas e bactérias psicrótróficas. A Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 1986), recomenda uma contagem máxima de 7,0 log UFC/g de bactérias totais (o que inclui tanto as bactérias

mesófilas quanto as bactérias psicrotróficas) para os alimentos em geral. Foram encontrados valores de 5,78 a 7,70 log UFC/g para bactérias mesófilas e de 3,00 a 6,45 log UFC/g para bactérias psicrotróficas. Somente 1 amostra apresentou valores de bactérias mesófilas maiores que 7,0 log UFC/g. É interessante observar que a contagem de bactérias mesófilas foi superior em relação a contagem de bactérias psicrotróficas em 5 das 6 amostras analisadas, pois os queijos permanecem em temperatura ambiente durante a comercialização nas feiras permanentes, desrespeitando a legislação brasileira que determina que esses queijos devem ser armazenados em temperatura de 10-12°C (BRASIL, 2001).

Outros estudos reportaram elevadas contagens de bactérias mesófilas em amostras de queijos tipo coalho artesanais. Silva *et al.* (2018) reportaram que os valores de bactérias mesófilas variaram de 10,8 a 11,1 log UFC/g, nos queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. Evangelista-Barreto *et al.* (2016) encontraram contagem média de bactérias mesófilas de 8,7 log UFC/g para as amostras de queijo coalho artesanais comercializados no município de Cruz das Almas-BA. Esses autores atribuíram os elevados valores de bactérias mesófilas nesses queijos artesanais devido ao uso de leite cru na produção, as condições sanitárias inadequadas de produção e a falta de temperatura de refrigeração no armazenamento.

Pimentel (2019) analisou 40 amostras de queijo coalho em Manaus-AM, sendo 20 amostras artesanais provenientes de feiras e 20 amostras industrializadas provenientes de supermercados. Os autores encontraram resultados semelhantes ao nosso estudo, com valores menores de bactérias psicrotróficas comparadas às mesófilas em amostras artesanais, já nas amostras industrializadas não houve essa relação. Segundo os autores, isso provavelmente se dá pelo não armazenamento dos queijos artesanais em locais refrigerados, o que não propicia as condições favoráveis para o desenvolvimento e seleção desses microrganismos psicrotróficos. Em contraponto, as amostras coletadas em supermercados mostraram maiores contagens de bactérias psicrotróficas devido ao armazenamento a 9°C.

A legislação brasileira que estabelece os limites microbiológicos em alimentos (BRASIL, 2019) não estabelece limites para coliformes totais em queijos, porém, a

legislação que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (BRASIL, 1996), estabelece o limite de 3,00 log NMP/g. No nosso estudo, quanto à contaminação por coliformes totais, em 66% das amostras analisadas foram encontrados valores acima de 3,00 log NMP/g, indicando falta de qualidade higiênico-sanitária desses queijos.

Outros estudos reportaram elevadas contagens de coliformes totais em amostras de queijos tipo coalho artesanais. Bomfim *et al.* (2020) obtiveram coliformes totais com valores acima de 3,00 log NMP/g em todas as 24 amostras de queijo coalho artesanais comercializados em feiras no município de Vitória da Conquista-BA. Silva *et al.* (2018) também reportaram que os valores de coliformes totais ficaram acima de 3,00 log NMP/g nos queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. E Evangelista-Barreto *et al.* (2016) encontraram coliformes totais acima de 3,00 log NMP/g nas amostras de queijo coalho artesanais comercializados no município de Cruz das Almas-BA. A elevada presença de coliformes totais no queijo coalho pode ser um indicativo do uso de leite in natura sem o devido tratamento térmico anterior à confecção do queijo (EVANGELISTA-BARRETO *et al.*, 2016)

A legislação brasileira determina como parâmetros microbiológicos para os queijos a quantidade limite para coliformes termotolerantes de 3,00 log NMP (BRASIL, 2019). No nosso estudo, 50% das amostras analisadas excederam o limite de coliformes termotolerantes e, portanto, estavam impróprias para consumo segundo a legislação brasileira.

Com resultados similares ao nosso estudo, Torres (2019) analisou 30 amostras de queijo coalho comercializados no comércio varejista do município de Arapiraca-AL e constatou que 83,3% delas continham contagem de coliformes termotolerantes acima do limite aceitável. Bomfim *et al.* (2020) obtiveram coliformes termotolerantes com valores acima de 3,00 log NMP/g em 54,2% (13/24) das amostras de queijo coalho artesanais comercializados em feiras no município de Vitória da Conquista-BA. Já Evangelista-Barreto *et al.* (2016) encontraram coliformes termotolerantes acima de 3,00 log NMP/g em todas as amostras de queijo coalho artesanais comercializados no município de Cruz das Almas-BA.

Os coliformes termotolerantes têm como principal representante a espécie *Escherichia coli* e sua fonte de contaminação em alimentos advém principalmente de



origem fecal. Assim, a presença de coliformes termotolerantes em quantidades elevadas nos alimentos é sugestiva de contaminação fecal e pode indicar manuseio, armazenamento e transporte incorretos (MARGARETE *et al.*, 2016). Dessa forma, concentrações de coliformes termotolerantes fora dos limites estabelecidos em legislação vigente podem representar riscos de contaminação por microrganismos patogênicos entéricos, podendo levar a infecções e intoxicações alimentares nos consumidores (SILVA *et al.*, 2018). Segundo Souza (2016), *E. coli* é amplamente distribuída na natureza e faz parte da flora intestinal natural do ser humano e de outros animais, contudo há vários sorotipos patogênicos para animais e humanos, denominadas de *E. coli* diarreio gênicas.

Em todas as amostras analisadas neste estudo, os resultados encontrados para a contagem de *S. aureus* excederam o limite estabelecido na legislação de 3,00 log UFC/g, com valores de 4,00 a 4,30 log UFC/g, e, portanto, as 6 amostras de queijos coalhos artesanais estavam impróprias para consumo. Outros estudos também relataram elevadas contagens de *S. aureus* em queijos coalhos. Bomfim *et al.* (2020) analisaram 24 amostras coletadas em duas feiras livres no município de Vitória da Conquista/BA e identificaram que 91,7% das amostras encontravam-se com valores de *S. aureus* acima de 3,00 log UFC/g. Com resultados similares ao nosso estudo, Filho *et al.* (2020) analisaram 10 amostras de queijos coalhos coletados em feiras livres do município de Recife/PE e obtiveram valores acima de 4,39 log UFC/g em todas as amostras. Pereira *et al.* (2017) realizaram a coleta de queijos tipo coalho em sete queijarias artesanais localizadas no município de São Rafael/RN e verificaram elevadas contagens de *S. aureus* entre 4,52 e 6,66 log UFC/g.

A espécie *aureus* é a mais relacionada do gênero *Staphylococcus* a casos e surtos de intoxicação alimentar, devido à habilidade de muitas de suas cepas produzirem enterotoxinas, principalmente quando presentes em elevadas concentrações no alimento (ANDRADE *et al.*, 2011). Um dos principais problemas do uso do leite cru na fabricação dos queijos artesanais é a possibilidade da elevada presença de microrganismos potencialmente patogênicos como *S. aureus*. A contaminação do leite cru com *S. aureus* pode ser atribuída a uma higienização deficiente na ordenha, ao uso de água não potável, limpeza inadequada de utensílios e equipamentos e falta de armazenamento do leite a baixas temperaturas

(DORES *et al.*, 2012; FREITAS *et al.*, 2013). No leite cru, uma importante fonte de contaminação provém da mastite bovina, na qual *S. aureus* é o principal agente etiológico (SOUSA *et al.*, 2014).

Além do leite, outras vias de contaminação dos queijos com *S. aureus* podem ser o manipulador e o ambiente de processamento, revelando falhas na adoção das BPF. A pasteurização do leite é um processo eficiente na destruição de estafilococos. Assim, supõe-se que a contaminação do queijo com *S. aureus* após a pasteurização do leite possa ocorrer nas etapas pós-processo, revelando contaminação cruzada, ou pode ser resultante de uma pasteurização não eficiente do leite. Em razão de estafilococos serem comumente encontrados nas fossas nasais, garganta e pele de portadores humanos, estudos epidemiológicos de surtos de intoxicação estafilocócica têm apontado os manipuladores como a principal fonte de contaminação dos alimentos. Outro agravante para o aumento da contaminação do queijo com *S. aureus* é a forma de armazenamento durante a comercialização dos queijos artesanais que são expostos a temperaturas inadequadas (temperatura ambiente) e somente no final do dia são armazenados sob refrigeração (SOUSA *et al.*, 2014).

No estudo de Araújo *et al.* (2017) com o intuito de prever a cinética de crescimento bacteriano em amostras de queijo coalho comerciais, chegou-se à conclusão de que os queijos coalho possuem condições de pH e atividade de água que permitem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos como a *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *S. aureus*, sendo que na grande maioria dos casos, os queijos são armazenados em condições sem refrigeração que não impedem o crescimento bacteriano.

## **5.2. Análise moleculares: Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Foram realizadas análises moleculares em todas as cepas que foram consideradas suspeitas de *Salmonella* spp. através dos testes microbiológicos. Em nenhum dos casos foi apresentado resultado positivo, atendendo a legislação brasileira (BRASIL, 2019) que estabelece ausência de *Salmonella* spp. em queijos e outros derivados de leite.

Com resultados similares ao nosso estudo, Evangelista-Barreto *et al.* (2016) analisaram 14 amostras de queijo coalho e relataram ausência de *Salmonella* spp. em todas as amostras e, segundo os autores, quando comparada a coliformes e *Staphylococcus*, *Salmonella* apresenta baixa capacidade competitiva de desenvolvimento em queijos.

Pereira *et al* (2017) analisou amostras de queijo coalho de sete queijarias e obteve resultados similares aos nossos, em que nenhuma das amostras encontrava-se contaminada por *Salmonella*. Segundo os autores, o cozimento do queijo em soro quente durante a fabricação e o aquecimento à 55 °C no processo de dessoramento, justificam a ausência do patógeno nas amostras.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através das análises microbiológicas deste estudo evidenciaram que 100% das amostras de queijos coalhos de fabricação artesanal comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal excederam o limite aceitável para *S. aureus* e, portanto, estavam impróprias para consumo segundo a legislação brasileira. Além disso, 50% das amostras excederam o limite aceitável para coliformes termotolerantes e 66% das amostras excederam o limite aceitável para coliformes totais. A ausência de *Salmonella* é um resultado esperado para queijos tipo coalho, devido ao cozimento na produção e a umidade do produto em relação a outros tipos de queijos. Tais dados demonstram que os queijos coalho comercializados em feiras permanentes carecem de melhores práticas de higiene. As possíveis fontes de contaminação desses queijos incluem a produção em condições higiênico-sanitárias inadequadas, o uso de leite não pasteurizado na produção desses queijos, além do armazenamento sem refrigeração durante a comercialização. Os resultados evidenciam a necessidade de aumento da fiscalização por agências reguladoras desses tipos de queijos artesanais, a fim de garantir a segurança alimentar do consumidor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ (2017) Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <https://cienciadoleite.com.br/noticia/4069/abiq-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil>. Acesso em: 08/05/2021 às 21:03.

ABIQ (2019) Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <https://g1.globo.com/mg/sul-de-minas/minas-dos-queijos/noticia/2019/05/20/com-25percent-da-producao-nacional-mg-aposta-no-queijo-como-saida-para-crise-e-geracao-de-renda.ghtml>. Acesso em: 08/05/2021 às 21:05.

ANDRADE, A. P. C.; BORGES, M. F.; FIGUEIREDO, E. A. T.; MACHADO, T. F.; PORTO, B. C. Perfil de *Staphylococcus* Coagulase Positiva e Negativa Contaminantes de Queijo de Coalho. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Agroindústria Tropical**. 18 p. 2011.

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

ARAÚJO, V.G. *et al.* Predicting and modelling the growth of potentially pathogenic bacteria in coalho cheese. **Journal of Food Protection**, v. 80, n. 7, p. 1172–1181, 2017.

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.

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, p. e020015, 2020.

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

BRASIL. (2001) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa número 30 de 26 de junho de 2001**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 16 jul. 2001.

BRASIL. (2019). Atos do Poder Legislativo. **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 União, Brasília, 18 de julho de 2019.

BRASIL. (2019) 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.

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

CHAPAVAL, L. **Detecção de enterotoxinas estafilocócicas produzidas por *Staphylococcus aureus* no leite bovino por eletroforese capilar e identificação dos isolados enterotoxigênicos via PCR**. 130 f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

CHAPAVAL, L. et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2010.

DIAS, J. N.; FONTINELLE, L. L.; MACHADO, S. M. O.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, G. P.; PEREIRA, A. C. T. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo Coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 277-284, 2015.

DIEDRICH, C.; POZZOBON, A.; KICH, D. M.; AGOSTINI, C.; BUSTAMANTE FILHO, I. C.; SOUZA, C. F. V. Detecção de *S. aureus* em amostras de leite cru. **Alimentos e Nutrição**, v.24, n.3, p. 291-296, 2013.

DORES, M. T.; FERREIRA, C. L. L. F. Queijo Minas artesanal, tradição centenária: ameaças e desafios. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, Viçosa, v.2, n.2, p.26-34, 2012.

EVANGELISTA-BARRETO *et al.* Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p. 55 – 67, 2016.

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

FREITAS. W. C.; TRAVASSO, A. E. R.; MACIE, J. F. Avaliação microbiológica e físico-química de leite cru e queijo de coalho, produzidos no estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.15, n.1, p.35-42, 2013.

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

GARCIA, J.K.S.; PRATES, R.P.; FARIAS, P.K.S.; GONÇALVES, S.F.; SOUZA, C. N. Qualidade microbiológica de queijos frescos artesanais comercializados na região do norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.58–65, 2016.

GIAZZI, A. **Identificação de microrganismos potencialmente patogênicos e resistentes a antimicrobiano, isolados e queijos**. 41 p., Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2013.

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

ICMSF. **Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications**. 2. ed. London: Blackwell Scientific Publications, 1986. 131p.

LEITE, D. C. B. **Feiras como espaços de hospitalidade e identidade coletiva: Feira permanente da Ceilândia/DF**. 2015. 165 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Turismo), Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MARGARETE, J. R. *et al.* ***Escherichia coli* O 157 in curd cheese**. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 5, p. 407–415, 2016.

MENEZES, M. F.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C. R. **Microbiota e conservação do leite**. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 76–89, 2014.

MURRAY, P. R.; PFALLER, M. A.; ROSENTHAL, K. S. **Microbiologia Médica**, 8ª Ed., 8883 p., Editora Elsevier, 2017.

OLIVEIRA *et al.* **Microbiological evaluation and development of quality index method (QIM) scheme for farmed pintado fish (*Pseudoplatystoma corruscans*)**. **African**



**Journal of Microbiology Research.** Laboratory of Food Control, University of Brasília (UNB/FCE), 2017.

OLSON, M. E. *et al.* *Staphylococcus aureus* nuclease is a SaeRS-dependent virulence factor. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 4, p. 1316–1324, 2013.

PEDROSA, A. *et al.* *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

PEREIRA, T. M. F. *et al.* *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* 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.

PIMENTEL, E. T. **Qualidade de queijo coalho comercializado em Manaus**, 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

RODRIGUES, C. R. F.; FERREIRA, L. C. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária – MG. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 57-61, 2016.

FILHO, J.R.F. *et al.* Avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos de queijo coalho comercializados em feiras livres. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 7, p. 166-181, 2020.

SÁ, J. F. O. de. **Caracterização microbiológica de doce de leite, leite condensado e queijo minas padrão por metodologia clássica e padronização de multiplex para detecção de patógenos por PCR em tempo real**. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, 2012.

SILVA, G. S. *et al.* Aspectos microbiológicos de queijos coalhos comercializados em feiras livres do município de Petrolina-PE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 12, n. 1, p. 2613–2626, 2018.

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

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

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

SOUSA, A. Z. B. de *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. 1, p. 30-35, 2014.

SOUZA, C.O. *et al.* *Escherichia coli* enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.7, n. 2, p. 79-91, 2016.

TORRES, A. R. S. **Ocorrência de *Listeria* spp. e aspectos microbiológicos em queijos coalho e manteiga comercializados fatiados no comércio varejista de Arapiraca-AL**. 46 f., Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Alagoas, 2019.

YAMANAKA, E. H. U.; COGO, L. L.; DALZOTO, P. R.; PIMENTEL, I. C. Microbiological quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, v.75, p.1-9, 2016.

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