



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

AMANDA BEATRIZ SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESVAL DE FABRICAÇÃO ARTESANAL E INFORMAL COMERCIALIZADOS
NO DISTRITO FEDERAL**

**BRASÍLIA, DF
2017**

AMANDA BEATRIZ SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESVAL DE FABRICAÇÃO ARTESANAL E INFORMAL COMERCIALIZADOS
NO DISTRITO FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF
2017

AMANDA BEATRIZ SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS TIPO MINAS
FRESVAL DE FABRICAÇÃO ARTESANAL E INFORMAL COMERCIALIZADOS
NO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof. Msc. Daniel Oliveira Freire
(Faculdade LS)

BRASÍLIA, DF
2017

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as conquistas, sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Neide e Welson por todo o amor, cuidado, apoio, e incentivo incondicional para que os meus sonhos sejam concretizados.

Às minhas irmãs Luana e Ana Júlia que são essenciais em minha vida.

A todos os meus amigos de vida e graduação por estarem sempre presentes.

À minha professora e orientadora Daniela Castilho Orsi por me dar todo suporte necessário para que esse trabalho fosse feito, além disso agradeço pela paciência e generosidade.

À professora e co-orientadora Izabel Cristina Rodrigues da Silva por todo aprendizado e apoio desde o início.

À Universidade de Brasília, principalmente o Campus Ceilândia pela oportunidade.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a qualidade microbiológica de seis amostras de queijos tipo minas frescal de fabricação artesanal e informal comercializados no Distrito Federal. Todas as seis amostras estudadas apresentaram contagens elevadas de microrganismos mesófilos e psicotróficos. Somente as amostras 4 e 5 estavam com contagens de colônias abaixo de $1,0 \times 10^7$ UFC/g. As demais amostras apresentaram falta de qualidade higiênico-sanitária, uma vez que a contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas encontrou-se acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g. Todas as amostras desse estudo apresentaram contagens de *S. aureus* acima do valor permitido pela legislação brasileira (valores entre $4,0 \times 10^3$ e $1,9 \times 10^6$ UFC/g) e, portanto, estavam impróprias para consumo. Foi verificado que 4 amostras continham populações de *S. aureus* acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Esse resultado é preocupante, uma vez que a intoxicação estafilocócica pode ocorrer com a ingestão de alimento contaminado com menos de $1,0 \mu\text{g}$ de toxina produzida por *Staphylococcus aureus*. Essa quantidade de toxina é produzida quando a população desse patógeno é maior ou igual a $1,0 \times 10^5$ UFC/g no alimento e em um meio com atividade de água igual ou superior a 0,86, como é o caso do queijo tipo minas frescal.

Palavras chave: Queijo minas. Controle microbiológico. Análises moleculares.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the microbiological quality of six samples of artisanal and informal cheese “Minas Frescal” (Brazilian cheese) commercialized in Distrito Federal. All six samples studied showed high counts of mesophilic and psychrotrophic microorganisms. Only samples 4 and 5 had colonies counts below 1.0×10^7 CFU / g. The other samples showed a lack of hygienic-sanitary quality, since the count of mesophilic and psychrotrophic bacteria was above 1.0×10^7 CFU / g. All samples from this study showed *S. aureus* counts above the value allowed by Brazilian legislation (values between 4.0×10^3 and 1.9×10^6 CFU / g) and were therefore unfit for consumption. It was found that 4 samples contained *S. aureus* populations above 1.0×10^5 CFU / g. This result is worrying, since staphylococcal intoxication can occur with ingestion of food contaminated with less than 1.0 µg of toxin produced by *Staphylococcus aureus*. This amount of toxin is produced when the population of this pathogen is greater than or equal to 1.0×10^5 CFU / g in the food and in a medium with a water activity equal to or greater than 0.86, as is the case of the cheese “Minas Frescal”.

Key words: cheese “Minas Frescal”, microbiologic quality, molecular analyzes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 Queijo minas frescal: definição, consumo e produção no Brasil	9
1.2 Produção e qualidade do queijo minas frescal	10
1.3 Contaminação microbiológica de queijos tipo minas frescal	13
1.4 Surto de doenças transmitidas por alimentos.....	15
1.5 Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos	19
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. METODOLOGIA.....	21
4.1 Coleta e preparo das amostras.....	21
4.2 Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas	21
4.3 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	22
4.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	24
4.5 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
4.6 Análises moleculares e extração de DNA bacteriano	25
4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR	27
4.8. PCR qualitativo	28
4.9. Eletroforese em gel de agarose	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas	30
5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes.....	32
5.3 Determinação da presença de <i>Salmonella</i> spp.	33
5.4 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	34
6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.....	23
Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos.....	27
Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	28
Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	30
Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	32
Tabela 6. Contagem das colônias no <i>Staphylococcus sp.</i> (colônias fermentadoras de manitol e após coloração de gram), nas amostras de queijos tipo minas frescal.....	35
Tabela 7. Identificação por meio de PCR de bactérias de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas das amostras de queijo minas frescal comercializadas em Brasília – DF.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas do processo de produção de queijo minas frescal.....	12
Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI.....	25

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Genoma completo de <i>E. coli</i>	47
Anexo 2. Sequência de Primer para <i>E. coli</i>	49
Anexo 3. Genoma completo de <i>S. aureus</i> precursor de enteroxina C3.....	50
Anexo 4. Sequência de Primer para <i>S. aureus</i>	51
Anexo 5.	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 Queijo minas frescal: definição, consumo e produção no Brasil

O Brasil ocupa o sexto lugar entre os maiores produtores mundiais de queijo. De acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijos (ABIQ), no ano de 2010 a produção de queijos com selo de inspeção federal foi de 745 mil toneladas (ABIQ, 2011). Estima-se que no Brasil, o consumo médio per capita de queijos aproxima-se de 5,1 quilos por ano, atrás de países como a Argentina com 11 quilos e a França com 25 quilos. Segundo a ABIQ, em 2030, o consumo per capita de queijo no país alcançará 11 quilos (ABIQ, 2014).

O queijo minas frescal é tipicamente brasileiro e é um dos queijos mais consumidos no país por se tratar de um produto de baixo custo e elevada oferta no mercado, apresentando alto rendimento de fabricação e atraindo, assim, o interesse das indústrias produtoras (BRIGIDO et al., 2004; SANGALETTI et al., 2009; VIEIRA et al., 2008).

Entende-se por queijo minas frescal, o queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Apresenta massa crua coalhada, dessorada, não prensada, salgada e não maturada, coloração esbranquiçada e consistência mole (BRASIL, 2004; BRIGIDO et al., 2004; SILVA, 2005; PERRY, 2004).

O queijo minas frescal tem pouca acidez e pelo fato de não ser maturado e ter alta umidade deve ser armazenado em temperatura correta de refrigeração (não superior a 8°C) e apresenta curta vida de prateleira. Esse queijo apresenta um alto teor de umidade >55% (BRASIL, 2004; BRIGIDO et al., 2004; SILVA, 2005; PERRY, 2004).

Normalmente, o queijo minas frescal é vendido na forma cilíndrica, com o peso variando entre 0,5 a 3 kg. O queijo minas frescal acabado apresenta, em média, a seguinte composição: 55 a 58% de umidade, 17 a 19% de gordura, teor de sal entre 1,4 e 1,6% e pH entre 5,0 e 5,3 (SILVA, 2005).

O queijo tipo minas frescal industrializado é elaborado a partir de leite pasteurizado, em indústria de laticínio, acompanhada pelo selo do serviço de inspeção federal e deve atender aos critérios de qualidade estabelecidos pela

Portaria nº 146, de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996).

Já o queijo tipo minas frescal artesanal é produzido em queijarias. Entende-se por "Queijaria" o estabelecimento situado em fazenda leiteira e destinado à fabricação de queijo. O leite destinado à fabricação de queijo fica restrito somente ao obtido na própria fazenda, não se admitindo a utilização de leite de outras propriedades. O queijo deve ser produzido a partir de leite tratado termicamente, quando tiver período de maturação inferior a 60 dias. Assim, a legislação brasileira não permite a comercialização de queijos tipo minas frescal artesanal, produzidos com leite cru, pois estes não passam por nenhum tipo de processo de maturação (BRASIL, 2000).

E ainda existem os queijos informais, de fabricação caseira, que não passam pelos critérios de controle de qualidade, não são inspecionados e comumente são comercializados em feiras livres e por ambulantes, sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante sua produção e conservação (AMORIN, 2013).

Segundo Amorim (2013), os queijos vendidos informalmente não possuem características que estabelecem padrões mínimos de segurança alimentar, como: data de validade e fabricação, descrição da origem do produto e selos de inspeção. Em feiras, é comum esses queijos serem expostos em prateleiras, sem nenhum tipo de refrigeração ou embalagem.

1.2 Produção e qualidade do queijo minas frescal

Devido a seu alto teor de umidade e por ser manipulado, o queijo minas frescal apresenta condições propícias à contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, podendo estas bactérias ser patogênicas e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (MIRANDA et al., 2016). É de se esperar, portanto, uma alta preocupação acerca da qualidade microbiológica do leite e do queijo minas frescal, de forma a garantir um produto seguro para o consumidor (SANTOS & HOFFMANN, 2010).

O leite é a principal matéria prima para fabricação de queijos e a qualidade do leite cru é a primeira condição para que se obtenha um queijo de qualidade (PINTO et al., 2011). O leite cru de boa qualidade pressupõe um gado saudável, boas práticas de higiene na ordenha e no manuseio do leite, higienização eficiente

dos equipamentos e utensílios utilizados e, finalmente, o resfriamento do leite a temperaturas entre 0-4 °C, no máximo 2 horas após a ordenha (PERRY, 2004).

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

Segundo VIEIRA et al. (2008), quando o número de bactérias deteriorativas ou patogênicas iniciais do leite é elevada, a pasteurização não é suficiente para a destruição da maioria desses micro-organismos. O leite com alta carga microbiana inicial é um problema para a indústria de laticínios, uma vez que se torna mais ácido, resultando em produtos de má qualidade e mais perecíveis. Ainda segundo VIEIRA et al. (2008), apesar de a legislação brasileira exigir a utilização de leite pasteurizado no preparo de queijo minas frescal, é bastante frequente a comercialização do queijo minas artesanal ou informal que não atende a essa especificação legal.

As etapas do processo de produção do queijo minas frescal incluem pasteurização do leite, adição de coalho, tratamento da massa com corte da coalhada e liberação do soro, enformagem, salga, embalagem e armazenamento, de forma que se obtenha um queijo fresco não maturado e pronto para o consumo (SILVA, 2005; PERRY, 2004).

O processamento simples, alto rendimento e ausência de maturação no produto final, faz a produção do queijo minas frescal possuir retorno rápido de investimento para o produtor e permite um baixo custo de comercialização (APOLINÁRIO et al, 2014; GRANDI & ROSSI, 2006).

Após a pasteurização do leite é necessário à adição do coalho que provoca coagulação enzimática do leite, dando origem à massa. Com o fim da coagulação, procede ao tratamento de massa, onde a mesma sofre fragmentação, com o objetivo de promover a retirada do soro. Após o procedimento de enformagem, que promove forma cilíndrica ao queijo, como normalmente é comercializado, é realizada a salga em sua superfície, garantindo o sabor, controle da umidade e conservação do produto. Por fim, o produto é embalado, geralmente, em sacos plásticos e armazenado sob refrigeração, a fim de garantir o tempo de validade e retardar o crescimento de micro-organismos contaminantes (SILVA, 2005). A figura 1 apresenta as etapas do processo de produção de queijo minas frescal.



Figura 1 - Etapas do processo de produção de queijo minas frescal. FONTE: SILVA, 2005.

Caso não haja boas práticas de fabricação na produção do queijo, a matéria prima pode ser recontaminada após a pasteurização do leite. Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são essenciais para a garantia de um produto de qualidade (SANGALETTI et al., 2009).

Para o controle microbiológico dos queijos minas frescal, é essencial que se respeite a temperatura adequada de conservação no armazenamento, onde, de acordo com a Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIC) é recomendado, que a temperatura não seja maior que 8°C. Porém, essa temperatura de conservação muitas vezes não é respeitada nos pontos de venda da mercadoria, como mostrou um estudo realizado pelo INMETRO (2006), onde 12 amostras de um total de 21 amostras de queijos minas, o que correspondeu a 57% das amostras, apresentaram temperaturas maiores que 8°C no momento da compra.

Devido a esses diversos fatores, o queijo minas frescal é um produto bastante perecível, mesmo quando corretamente armazenado sob refrigeração, e de curta vida de prateleira, devendo ter sua comercialização imediata à fabricação e consumo nos primeiros quinze dias após a sua produção (GRANDI & ROSSI, 2006; ROCHA et al, 2006; SANGALETTI et al, 2009).

Assim, as condições higiênico-sanitárias e vida útil do queijo minas frescal dependem de vários aspectos entre eles: ausência de um número elevado de micro-organismos no leite *in natura*, pasteurização correta do leite, condições adequadas de fabricação e manutenção da refrigeração ao longo da cadeia produtiva. Tais condições diminuem o risco de o queijo ser um potencial veículo de transmissão de micro-organismos patogênicos e conseqüentemente causar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) pelo seu consumo (LISITA et al., 2009).

1.3 Contaminação microbiológica de queijos tipo minas frescal

Durante a fabricação do queijo minas frescal diversos fatores podem comprometer a qualidade do produto final, dentre eles destaca-se a contaminação microbiológica da matéria-prima, isso porque, o leite é um ótimo meio de cultivo devido a suas características intrínsecas como alta atividade de água, pH próximo ao neutro e riqueza de nutrientes, estando mais suscetível a contaminação microbiológica. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a adoção de técnicas higiênicas inadequadas na manufatura e o uso de temperaturas inadequadas na armazenagem contribuem, também de forma efetiva, para a má qualidade do produto final (APOLINÁRIO et al., 2014; PERRY, 2004; SANGALETTI et al., 2009; SILVA, 2005).

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

Queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. As bactérias do grupo coliforme em altas quantidades são consideradas as principais causadoras de deterioração de queijos, o que causa estufamento precoce dos produtos e

fermentações anormais. Bactérias patogênicas causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. também podem estar presentes nos queijos minas frescal de má qualidade (BRIGIDO et al., 2004; FERREIRA et al., 2011; GRANDI & ROSSI, 2006; PINTO et al, 2011; ROCHA et al., 2006; SANTOS & HOFFMANN, 2010).

O grupo de coliformes compreende os coliformes totais e termotolerantes, sendo que o grupo de coliformes totais é representado por todos os bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos que não formam esporos e que são capazes de fermentar lactose com produção de gás, quando incubados na temperatura de 35-37°C por 24-48 horas. Já os coliformes termotolerantes, também conhecidos como coliformes fecais, compreendem o grupo de bactérias que vivem no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente. Os gêneros encontrados nesse grupo são *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, sendo *E. coli* o melhor e mais conhecido indicador de contaminação de origem fecal (FERREIRA et al, 2011; GRANDI & ROSSI, 2006; PINTO et al, 2011; SANGALETTI et al, 2009). Algumas cepas patogênicas de *E. coli*, ao serem ingeridas, multiplicam-se no intestino e produzem toxinas, sendo uma causa comum de diarreia (FERREIRA et al, 2011).

A contaminação por *Salmonella* spp. causa infecção alimentar a partir da ingestão de bactérias vivas presentes nos alimentos. *Salmonella* spp. é considerada uma das principais bactérias causadoras de DTA em vários países, inclusive no Brasil, sendo responsável por sérios problemas de saúde pública e perdas econômicas. O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e compreende bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, mas não fermentadores de lactose. Sua temperatura ótima de crescimento é em média 38°C, sendo destruída acima de 60°C e não apresentando crescimento em temperaturas abaixo de 5°C, e sua forma de transmissão mais comum é pela via oral-fecal (BORGES et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010). As prováveis fontes de contaminação por esta bactéria são águas contaminadas com fezes ou até mesmo o contato com animais silvestres infectados. *Salmonella* spp. tem como principal habitat o trato intestinal de aves, répteis e seres humanos (FRANCO & LANDGRAF, 2008).

As bactérias *S. aureus* podem ser produtoras de toxinas termo resistentes causando intoxicação alimentar (PINTO et al., 2011; VIEIRA et al., 2008). A bactéria

S. aureus tem como principal habitat a pele, as glândulas e membranas mucosas do homem e dos animais (KOMATSU et al., 2010). A presença desse microrganismo no leite e em seus produtos pode sugerir a utilização de matéria-prima proveniente de animais infectados (mastite) ou uma provável contaminação por manipuladores portadores assintomáticos (LEJEUNE & RAJALA-SCHULTZ, 2009).

Listeria monocytogenes é uma espécie patogênica que causa listeriose, uma enfermidade que pode ser grave em pessoas imunocomprometidas e apresenta como característica a sua capacidade de multiplicação em temperatura de refrigeração e relativa resistência térmica. Apesar da importância da ocorrência da bactéria *L. monocytogenes* em produtos lácticos, existem poucos estudos sobre sua incidência em queijos produzidos no Brasil (PINTO et al., 2011; VACONCELOS e MARIN, 2008).

A legislação brasileira (BRASIL, 2001), que estabelece o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos determina os parâmetros microbiológicos para queijo minas frescal. De acordo com a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001, a quantidade limite para coliformes a 45°C é de 5×10^2 NMP/g, para *Staphylococcus* coagulase positiva é de 5×10^2 UFC/g e *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g do produto (BRASIL, 2001).

Embora a legislação estabeleça os parâmetros microbiológicos para queijos, ainda há uma grande comercialização do produto em desacordo com os padrões vigentes, pois é comum observar a comercialização do “leite informal”, sem inspeção e sem garantia de pasteurização (FERREIRA et al., 2011; QUINTANA & CARNEIRO, 2007; VIEIRA et al, 2008).

1.4 Surtos de doenças transmitidas por alimentos

O Ministério da Saúde considera surto de origem alimentar, um episódio em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sinais/sintomas após ingerir alimentos e/ou água da mesma origem. Leite e derivados representaram 2,6% das fontes de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil entre os anos 2000 e 2016 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). De acordo com VACONCELOS e MARIN (2008), os relatórios anuais de vários países sobre doenças transmitidas por alimentos mostram que leite e derivados são fontes de 1-5% de surtos bacterianos.

No Brasil, a maioria dos casos de surtos alimentares causadores de gastroenterite humana é atribuída à bactéria patogênica *Salmonella* spp. (7,5%) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016; VIEIRA et al., 2008). Surtos de salmonelose atribuídos ao consumo de leite e produtos lácteos têm sido relatados na literatura. Na Suíça, no período de 2006 a 2007, foram relatados dois surtos de *Salmonella enterica*, causados pelo consumo de queijos (PASTORE et al., 2008). Em 2008, houve três surtos de salmonelose na Holanda e envolveram 152 consumidores (DOORDUYN et al., 2008).

Após a *Salmonella* spp., as espécies patogênicas de *E. coli* representam o segundo agente etiológico responsável pelos surtos alimentares no Brasil, compreendendo 7,2% dos casos e a bactéria *S. aureus* ocupa o terceiro lugar, representando 5,8% dos surtos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O grande problema da espécie *S. aureus* é a produção de enterotoxinas em alimentos contaminados por esse patógeno, quando estes permanecem por tempo variável nas condições de temperaturas entre 10 a 46°C, com o ótimo entre 40 e 45°C. Essas toxinas são as causadoras de surtos de intoxicação alimentar, quando há ingestão dos alimentos contaminados (FRANCO & LANDGRAF, 2008). APOLINÁRIO et al (2014) afirmou que o processo de pasteurização diminui a população de micro-organismos presentes no leite, porém toxinas, como a enterotoxina estafilocócica, não são inativadas, podendo causar intoxicações alimentares nos consumidores.

No Estado de Minas Gerais, no ano de 1999, 50 pessoas foram intoxicadas após ingerir queijo minas frescal contaminado por *S. aureus*. Os sintomas de intoxicação alimentar (vômito e diarreia) apareceram 1-2 horas após consumo do queijo contaminado. As análises dos queijos mostraram contagens de *S. aureus* entre $2,4 \times 10^3$ e $2,0 \times 10^8$ UFC/g (CARMO et al., 2002). Segundo registros do Sistema de Informação para a Vigilância das Doenças Transmissíveis por Alimentos na América Latina e Caribe (SIRVETA), entre 1993 e 2002, ocorreram 250 surtos de intoxicação estafilocócica envolvendo produtos lácteos com acometimento de 4.247 pessoas em 11 países dessa região. Há 16 relatos de surtos causados por queijos ocorridos no Brasil, com 86 pessoas acometidas (BORGES et al., 2008; INPPAZ/OPS/OMS, 2006; SANTANA et al., 2010).

Surtos de listeriose relacionados ao consumo de queijos também já foram relatados na literatura (BARANCELLI et al., 2011). Surtos associados ao consumo

de queijos contaminados ocorreram na Suécia (CARRIQUE-MAS et al., 2003), no Japão (MAKINO et al., 2005) e na Suíça (BILLE et al., 2006). Surtos recentes de listeriose na Áustria e Alemanha, atribuídos ao consumo de queijo tipo “Quargel”, resultaram em 4 mortes (FRETZ et al., 2010).

1.5 Biologia molecular na identificação de microrganismos em alimentos

Os testes tradicionais de microbiologia de alimentos para fins de identificação bacteriana compreendem as técnicas realizadas em meios de cultura não-seletivos e seletivos e são complementadas por testes bioquímicos em conjunto com testes sorológicos. Entretanto, apesar dessas técnicas serem relativamente baratas, sensíveis e de fácil padronização, são também, bastante demoradas quando o objetivo é chegar na confirmação do agente patogênico, além disso, podem apresentar variabilidade nos resultados, em razão de fatores ambientais sobre a expressão gênica e podem apresentar riscos de interpretações errôneas. Com isso, fez-se necessário a utilização de técnicas baseadas na amplificação de DNA, como é o caso da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (GANDRA et al, 2008; MENDONÇA, 2016).

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, a qual proporciona enzimaticamente ampliações *in vitro* em milhões de cópias das sequências iniciais de DNA ou RNA (GANDRA et al, 2008). De acordo com ANDRADE et al (2010), a PCR não é vulnerável a reações atípicas e não depende de variações fenotípicas evitando, assim, resultados falso-negativos fornecidos pelas técnicas microbiológicas. GRANDA et al (2008) exaltam maior poder de tipificação e discriminação, maior rapidez, bom limite de detecção, maior seletividade, especificidade, potencial para automação e a possibilidade de trabalhar com espécies de bactérias que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados.

A técnica da PCR é realizada por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores, os chamados *primers*, sobre um DNA molde, visando a produção de milhões de cópias desta sequência. É uma técnica automatizada, onde um aparelho denominado termociclador é capaz de alternar repetidamente entre temperaturas ótimas para cada etapa específica do ciclo de

amplificação: desnaturação, anelamento e extensão (GANDRA et al, 2008; SCHEIDEGGER, 2009).

ZOCHE & SILVA (2012) relataram que em diversos trabalhos tem sido reportado o uso da amplificação *in vitro* do DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), para detecção de patógenos diretamente em alimentos. Porém, embora essa técnica molecular traga resultados rápidos, principalmente frente a surtos alimentares, sua eficácia depende da extração do DNA puro, o que nem sempre é possível, principalmente em alimentos ricos em gorduras e proteínas, como é o caso dos queijos.

No estudo de ZOCHE & SILVA (2012), a PCR foi capaz de detectar em amostras de queijos minas artificialmente contaminadas, contaminação por *S. aureus* portadores dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *selj*, *selm* e *selo* presentes em concentrações $\geq 10^2$ unidades formadoras de colônias por grama de queijo (UFC g⁻¹). Apesar disso, foi relatado que poucos trabalhos descrevem técnicas moleculares para diagnóstico desses microrganismos diretamente em queijos e, que em queijos tipo minas frescal, produto típico brasileiro, não há nenhum relato da literatura.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo minas frescal de fabricação artesanal e informal comercializados no Distrito Federal e, assim, determinar se esses produtos estão sendo distribuídos com qualidade, de forma a garantir a segurança alimentar do consumidor.

2.2 Objetivos específicos

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

3. JUSTIFICATIVA

Grande parte dos locais destinados ao preparo de queijo minas frescal tipo artesanal ou informal, são improvisados, ou seja, não possuem estrutura física adequada e nem indivíduos capacitados para realizar as atividades de manipulação de alimentos. O queijo minas frescal, por se tratar de um alimento altamente perecível, por sofrer muita manipulação e por apresentar características favoráveis ao desenvolvimento de micro-organismos é um alvo importante de contaminação microbiológica. Considerando o alto consumo desse alimento pela população, torna-se importante a realização de pesquisas que avaliem a qualidade microbiológica desses produtos. Nesse contexto, o presente trabalho buscou avaliar a qualidade microbiológica de queijos tipo minas frescal de fabricação artesanal ou informal comercializados no Distrito Federal, de forma a verificar a qualidade e segurança alimentar desses produtos.

4. METODOLOGIA

4.1 Coleta e preparo das amostras

Foram coletadas seis amostras de queijos tipo minas frescal de fabricação artesanal ou informal, comercializadas em diferentes barracas na feira permanente do Gama, DF, no período de fevereiro a abril de 2017. As amostras coletadas foram mantidas refrigeradas e foram levadas para o laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Ceilândia, UnB, para o início das análises.

Para obtenção da primeira diluição (10^{-1}), foram pesadas 25 g das amostras em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) estéril. A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições decimais, em água peptonada 0,1% (p/v), até a diluição 10^{-5} .

4.2. Contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas

As contagens totais de bactérias mesófilas e psicrotróficas foram realizadas a partir da inoculação de 0,1 mL de cada diluição na superfície das placas, contendo o meio de cultivo Agar Padrão para Contagem. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas para identificação de bactérias mesófilas e a 7°C \pm 1°C durante um período de 7 dias para identificação de bactérias psicrotróficas. Para a contagem de colônias, selecionaram-se as placas contendo entre 25 a 250 colônias, multiplicando-se o valor encontrado pelo fator de diluição correspondente, e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

4.3. Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

O método utilizado para determinar os coliformes totais e termotolerantes foi à técnica de Número Mais Provável (NMP). A comparação de tubos com crescimento positivo ou negativo, após a incubação, permite estimar, por cálculo de probabilidade, a densidade original dos microrganismos na amostra (FENG et al., 2002).

Para a determinação do NMP de coliformes, inoculou-se 1 mL de cada diluição em uma série de tubos de ensaio contendo caldo lactosado (lactose 0,5% (p/v), peptona bacteriológica 0,5% (p/v) e extrato de carne 0,3% (p/v)) e tubos de Durham invertidos e a incubou-se a 37°C durante 24 horas. Após a incubação foi verificado os tubos positivos (com turvação e produção de gás nos tubos de Durham) e estes foram considerados prova presuntiva positiva para coliformes (FENG et al., 2002).

Os resultados positivos no caldo lactosado, foram transferidos, simultaneamente, para caldo verde brilhante bile lactose 2% (para a confirmação de coliformes totais) e para caldo *Escherichia coli* (para a confirmação de coliformes termotolerantes). Os tubos contendo caldo verde brilhante bile lactose 2% e tubos de Durham invertidos foram incubados a 37°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes totais. Os tubos contendo caldo *Escherichia coli* e tubos de Durham invertidos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. A presença de gás indicou prova confirmatória positiva para coliformes termotolerantes. Através da Tabela 1 foi obtido o NMP de coliformes totais e de coliformes termotolerantes por grama da amostra (NMP/g) (FENG et al., 2002).

Tabela 1. Número mais provável por grama (NMP/g) para 3 tubos com os inóculos de 0,1, 0,01 e 0,001 ml e os respectivos intervalos de confiança a 95%.

Tabela para 3 tubos, cada um com inoculo de 0.1, 0.01 e 0.001 ml, os NMPs por grama e os intervalos de confiança a 95%.											
Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		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	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

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

4.4. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Quanto a pesquisa de *Salmonella* spp., a diluição 10^{-1} das amostras foi incubada à 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como pré-enriquecimento geral. Após a incubação, alíquotas de 1 ml foram transferidas para caldo selenito-cistina e incubadas a 37°C por 24 horas. Esta fase é caracterizada como enriquecimento seletivo. Após a incubação, procedeu-se à técnica de isolamento, onde a partir de cada tubo, semeou-se em estrias para isolamento, placas de Petri contendo o meio Agar *Salmonella Shigella* (Agar SS).

As colônias não fermentadoras de lactose e/ou com pigmento negro foram reisoladas em Agar *Salmonella Shigella* para obtenção de colônias puras e então estas foram transferidas para meio de cultivo contendo Agar TSI (três açúcares e ferro). Este meio contém três açúcares: glicose (0,1%), lactose (1%) e sacarose (1%), além do indicador vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos. A fermentação de carboidratos é indicada pela mudança da cor do meio de vermelho para amarelo. Se o micro-organismo em estudo for capaz de produzir sulfeto de hidrogênio (H_2S), este se conjuga com um composto de ferro existente no meio, dando origem a sulfeto de ferro que, sendo insolúvel, precipita e tem cor negra (indicado pela cor preta na base do tubo) (ANVISA, 2010).

No Agar TSI, enterobactérias como *E. coli*, *Enterobacter* e *Klebsiella* fermentam a glicose e a lactose e/ou sacarose (2 ou 3 açúcares do meio) tornando a base e a superfície do tubo de cor amarela e geralmente é possível detectar a presença de gás (CO_2) pela formação de bolhas e/ou fragmentação do meio. Quando a superfície do meio está vermelha e a base amarela significa que ocorreu fermentação apenas da glicose (ficando a lactose e a sacarose sem fermentação). Os micro-organismos degradam, preferencialmente, a glicose em primeiro lugar, mas como este substrato está presente em concentração mínima, a quantidade de ácido produzida é limitada e é rapidamente oxidada na superfície. Se houver produção de sulfeto de ferro a base do meio torna-se negra (Figura 2). Essa reação é característica de enterobactérias não fermentadoras de lactose como *Shigella* e também produtoras de H_2S como *Salmonella* (ANVISA, 2010). As colônias suspeitas foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

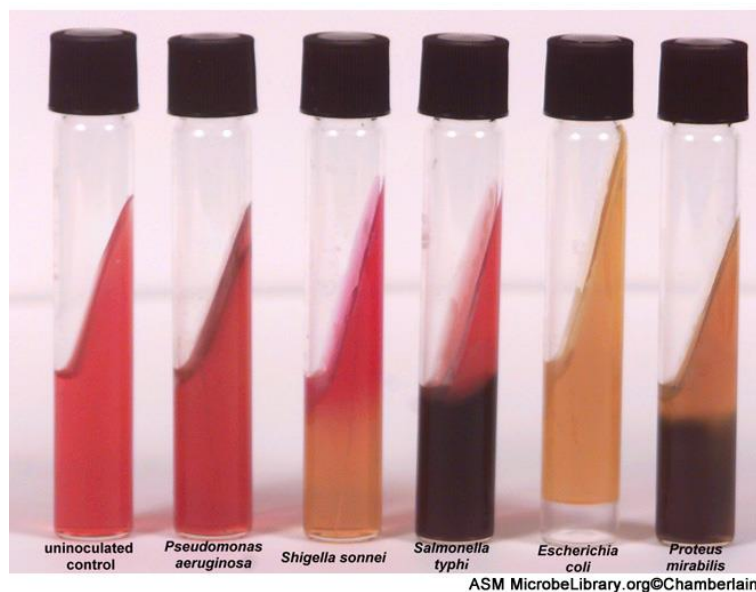


Figura 2. Reações bioquímicas das diferentes espécies de bactérias no Agar TSI (Fonte: ASM microbelibrary.org).

4.5. Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *Staphylococcus*, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Agar PCA suplementado com cloreto de sódio 7,5% (p/v) e incubadas a 37°C por 48 h. Após incubação, as colônias isoladas foram semeadas em Agar Sal Manitol e incubadas em 37°C por 48h. As colônias fermentadoras de manitol foram contadas e posteriormente coradas pelo método de Gram. As colônias suspeitas de serem *S. aureus* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR.

4.6. Análises moleculares e extração de DNA bacteriano

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das soluções reagentes (o tampão AW foi colocado em banho-maria à 50°C), materiais e amostras. As amostras foram representadas pelas colônias de bactérias isoladas das amostras de queijo suspeitas de serem patogênicas e cultivadas por 12 h. em caldo LB.

A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha), com adaptações, descritas a seguir:

Adicionou-se 9,0 mL da amostra (suspensão de células bacterianas em caldo LB) no tubo cônico tipo falcon de 15 mL, centrifugou-se por 7 minutos a 5000 rpm e descartou-se o sobrenadante (com cuidado para não descartar o sedimento). Foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL do tampão CF (tampão de lise celular pré-aquecido a 65°C), encostando a ponteira no Pellet e misturando (este tampão tem como função impedir a formação de grumos celulares). Após isso, os tubos foram homogeneizados em “vortex”, até a completa homogeneização da solução. As amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C, por 30 minutos.

Em seguida, foram adicionados 300 µL do tampão C4 (contém isotiocianato de guanidina), 300 µL de etanol 96%, homogeneizou-se e deixou descansar por 5 minutos (esta etapa é importante para a lise das paredes e das membranas celulares, com liberação do conteúdo da célula).

Na etapa seguinte, enumeraram-se os tubos contendo filtros com sílica (fornecidos pelo kit), transferiu-se o sobrenadante para o filtro e após filtração centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Descartou-se o que foi filtrado, adicionou-se 400 µL do tampão CQW e centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm. Novamente, foi descartado o filtrado. Adicionou-se 700 µL do tampão C5, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtrado (os tampões CQW e C5 contêm isotiocianato de guanidina, em concentrações decrescentes, para facilitar a adsorção do DNA na sílica e a retirada das outras biomoléculas da amostra. Também contêm etanol, para facilitar a precipitação). Por fim, foi feita outra centrifugação com o tubo vazio, por 1 minuto a 15.000 rpm.

Após isto, o filtro contendo DNA foi trocado para um eppendorf de 1,5 mL, onde foi adicionado 100 µL do tampão Elution Buffer CE pré-aquecido a 70°C (este tampão favorece a eluição do DNA). Após uma pré-incubação de 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugou-se por 1 minuto a 15.000 rpm e descartou-se o filtro. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C. 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®).

4.7. Desenho dos oligonucleotídeos para a PCR

A seleção das regiões gênicas específicas a serem analisadas para *E. coli* e *S. aureus* foi realizada conforme busca na literatura, para os quais os oligonucleotídeos foram desenhados no presente estudo:

- EutC: anotação descrita para o gene que codifica a etanolamina amônia liase em *E. coli*
- entC: anotação descrita para o gene que codifica enterotoxina C do *S. aureus*

A partir da descrição das sequências referentes às regiões específicas para uma dada região genômica recuperadas no programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), foram desenhados oligonucleotídeos usando o programa Primer 3 Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Os parâmetros utilizados para a construção dos primers estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos limites mínimos e máximos para a construção dos oligonucleotídeos

Parâmetro	Limite mínimo	Limite máximo
Temperatura de anelamento	58°C	62°C
Conteúdo de GC no oligonucleotídeo	20%	80%
Tamanho do Oligonucleotídeo	18 bases	27 bases
T _m do amplicon	75°C	85°C
Tamanho do amplicon	80 bases	600 bases

Após selecionar os pares de oligonucleotídeos que atendiam a essas condições, foi utilizado o programa Oligo Analyzer da Integrated DNA Technologies (IDT), (<http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>) para verificar a formação de dímeros, dobramento (hairpin) e [Símbolo]G de formação de híbridos. Os primers específicos obtidos para este estudo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos utilizados no estudo

Oligonucleotídeo	Sequência (5´ 3´)	Produto estimado	Espécie
entC_F	TTTTACACCCAACGTATTAGCAGA	401 pb	<i>S. aureus</i>
entC_R	TCCCATTATCAAAGTGGTTTCC		
EutC_F	TCTATGGGCTGTGACTGCTG	113 pb	<i>E. coli</i>
EutC_R	GGCATCCCCATGATGTAGTT		

4.8. PCR qualitativo

Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos.

Foram utilizados, para cada reação de PCR: 2,5 µL de tampão 10x (10mM de Tris e 50mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot, 5U/µL), 1,5 µL de oligonunleotídeos foward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana.

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo e visualizados sob iluminação ultra-violeta. Os marcadores de massa molecular utilizados foram o de 100pb ou de 50pb DNAI/HindIII (JENA®).

4.9. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de extração do DNA e PCR foram analisados em gel de agarose 2%. O tempo de corrida do gel é de aproximadamente 1 hora e 30 minutos, sendo que no início foi usado a voltagem de 50 V e após começar a correr o gel, aumentou-se a voltagem para 100 V. Utilizou-se o marcador de 100 pb (pares de bases). Foi adicionado 3 µL de corante Bromophenol (que tem a função de fazer uma ligação na amostra de DNA e permitir a visualização da corrida no gel de agarose) em 7 µL de amostra. Para o preparo do gel foi utilizado TBE (Tris- Ácido Bórico), agarose e brometo de etídio (que tem função de corar o gel e permitir a visualização do DNA, quando colocado à luz ultravioleta).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas

A tabela 4 apresenta os resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal, expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão.

Tabela 4. Contagem total de bactérias mesófilas e psicotróficas nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	Bactérias Mesófilas		Bactérias Psicotróficas	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	$4,8 \times 10^7$	$7,8 \pm 0,08$	$4,5 \times 10^7$	$7,9 \pm 0,37$
Amostra 2	$4,7 \times 10^7$	$7,5 \pm 0,34$	$3,1 \times 10^7$	$7,3 \pm 0,01$
Amostra 3	$1,2 \times 10^7$	$7,0 \pm 0,05$	$2,6 \times 10^6$	$6,4 \pm 0,05$
Amostra 4	$1,5 \times 10^6$	$6,1 \pm 0,04$	$5,1 \times 10^6$	$5,6 \pm 0,16$
Amostra 5	$1,0 \times 10^5$	$4,9 \pm 0,30$	$7,0 \times 10^5$	$5,8 \pm 0,17$
Amostra 6	$3,8 \times 10^7$	$7,5 \pm 0,09$	$4,2 \times 10^7$	$7,6 \pm 0,06$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata

DP = desvio padrão

A contagem total de bactérias é o método mais utilizado como indicador geral de populações bacterianas em alimentos. Esse método não diferencia os tipos de bactérias, sendo, portanto, realizado para avaliar a qualidade geral dos alimentos, práticas de manufatura, matérias primas utilizadas, condições de processamento, manipulação e vida de prateleira (FRANCO e LANDGRAF, 2008; SANGALETTI et al., 2009).

Ainda que a legislação brasileira não estabeleça limites para contagem total de microrganismos mesófilos e psicotróficos, há uma especificação para essa contagem dada pela Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF, 2002), onde se permite uma contagem máxima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g de microrganismos totais para os alimentos em geral.

Todas as seis amostras estudadas apresentaram-se com número elevado de populações de microrganismos mesófilos e psicrotróficos. Somente as amostras 4 e 5 estavam com contagens de colônias abaixo de $1,0 \times 10^7$ UFC/g. As demais amostras apresentaram falta de qualidade higiênico-sanitária, uma vez que a contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas encontrou-se acima de $1,0 \times 10^7$ UFC/g.

No estudo de SANGALETTI et al. (2009) foi avaliado o prazo de vida útil de três lotes de queijos tipo minas frescal armazenados a 4°C por 30 dias e mesmo sob refrigeração rigidamente controlada, as bactérias mesófilas e psicrotróficas apresentaram um crescimento gradativo. Após 10 dias de estocagem, a contagem de mesófilos variou de 6,5 a 7,3 log UFC/g e a contagem de bactérias psicrotróficas variou de 7,2 a 8,1 log UFC/g, resultados parecidos com os obtidos nas amostras de queijos deste estudo. Os autores concluíram que o aumento de microrganismos psicrotróficos ao longo do tempo de armazenamento é justificado pela característica desses microrganismos crescerem em temperaturas de 2 a 7°C.

Elevadas contagens destes microrganismos em alimentos podem indicar uma matéria-prima altamente contaminada, um processamento insatisfatório do ponto de vista higiênico-sanitário ou que os alimentos foram armazenados em condições inadequadas de tempo e temperatura (LEITE JR. et al., 2000).

5.2 Determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes

Os resultados obtidos nas análises de determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal deste estudo estão demonstrados na tabela 5.

Tabela 5. Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e de coliformes termotolerantes nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	Coliformes Totais		Coliformes Termotolerantes	
	NMP/g	Log NMP/g \pm DP	NMP/g	Log NMP/g \pm DP
Amostra 1	$5,4 \times 10^2$	$2,5 \pm 0,48$	$0,4 \times 10^1$	$0,6 \pm 0,15$
Amostra 2	$2,6 \times 10^1$	$1,4 \pm 0,15$	$2,0 \times 10^1$	$1,1 \pm 0,46$
Amostra 3	$0,4 \times 10^1$	$0,6 \pm 0,14$	$0,3 \times 10^1$	$0,5 \pm 0,00$
Amostra 4	$0,1 \times 10^1$	$1,1 \pm 0,13$	$0,5 \times 10^1$	$0,7 \pm 0,14$
Amostra 5	$0,1 \times 10^1$	$1,1 \pm 0,00$	$<0,3 \times 10^1$	$0,5 \pm 0,00$
Amostra 6	$0,4 \times 10^1$	$0,6 \pm 0,18$	ND	ND

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata

DP = desvio padrão

O grupo dos coliformes termotolerantes é composto principalmente pelas enterobactérias que vivem no trato gastrointestinal de humanos e de animais de sangue quente. Isto inclui pelo menos três gêneros: *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter*. Dentre esses microrganismos, a bactéria *Escherichia coli* é a mais conhecida e a mais facilmente diferenciada dos microrganismos não fecais e é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento (SILVA et al., 2001).

Para queijos de muita alta umidade (>55%), como os tipos minas frescal, a legislação brasileira (BRASIL, 2001), delimita uma tolerância de $5,0 \times 10^2$ NMP/g para coliformes termotolerantes. As amostras deste estudo apresentaram baixa enumeração de coliformes totais e termotolerantes e nenhuma amostra se mostrou

acima do permitido pela legislação brasileira. No entanto, a análise molecular para detecção de *E. coli* revelou que cinco colônias isoladas das amostras 2, 3 e 4 foram positivas para a presença do gene EutC (ANEXO 5, Figura A).

No entanto, outros estudos relataram contagens elevadas de coliformes termotolerantes em amostras de queijos tipo minas frescal. No estudo de VISOTTO et al. (2011) foram analisadas 30 amostras de queijo minas frescal e os resultados obtidos nas análises microbiológicas evidenciam baixa qualidade higiênico-sanitária, onde 90% das amostras apresentaram populações de coliformes totais acima de $1,1 \times 10^3$ NMP/g e 63,4% das amostras apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira. SALOTTI et al. (2006) avaliaram a qualidade microbiológica de 60 amostras de queijos tipo Minas frescal, sendo 30 amostras de produção artesanal e 30 amostras industrializadas. Das 30 amostras de queijo artesanal, 25 amostras (83,3%) apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira, enquanto que para o queijo industrializado, 20 amostras (66,7%) apresentaram populações de coliformes termotolerantes acima do permitido pela legislação brasileira.

Populações elevadas de coliformes totais e termotolerantes no produto final sugerem que o queijo pode ter sido produzido com matéria prima de má qualidade ou que houve falhas ao longo do processo de fabricação e armazenamento do mesmo (LISITA et al, 2009).

5.3 Determinação da presença de *Salmonella* spp.

Neste trabalho não houve detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de queijos tipo minas frescal. A legislação brasileira (BRASIL, 2001) determina que o gênero *Salmonella* spp. deve estar ausente em 25 g da amostra.

Resultados similares foram encontrados nos estudos de PINTO et al. (2011) e VISOTTO et al. (2011), onde também não foram detectadas bactérias *Salmonella* spp. nas amostras de queijos tipo minas frescal analisadas. Segundo BRANT et al. (2007), a ausência de *Salmonella* spp. pode ser determinada pela menor capacidade de competição dessas espécies em relação aos coliformes.

Já no estudo de GRANDI & ROSSI (2006), realizado com 20 amostras de queijos tipo minas frescal, foi verificado uma amostra positiva para *Salmonella* spp.,

que estava imprópria para consumo. Essa contaminação pode estar relacionada à pasteurização inadequada do leite ou recontaminação pós-pasteurização (ROCHA et al., 2006).

Segundo SILVA (2015), a ausência de *Salmonella* em muitos estudos de queijos pode ser explicada em função de sua pequena incidência no leite, sendo necessário para a contaminação, que o rebanho esteja doente ou que o manipulador seja portador ou então, que se utilize água não potável no processamento. Dessa forma, se a contaminação inicial for com um número pequeno de células, esses micro-organismos podem desaparecer ou permanecer em números indetectáveis no queijo.

5.4 Contagem de *Staphylococcus aureus*

A tabela 6 apresenta os resultados da contagem de *Staphylococcus aureus* em ágar sal nas amostras de queijos tipo minas frescal, expressos como média de UFC/g e log de UFC/g com o desvio padrão. A maioria das colônias contadas no ágar sal foi cultivada em ágar sal manitol (apresentando como resultado fermentação do manitol) e teve coloração de gram feita (apresentando como resultado cocos gram positivos no arranjo típico de *Staphylococcus*), sendo assim confirmada a presença de *Staphylococcus aureus*. Então, os resultados obtidos no ágar sal foram considerados como contagem de *S. aureus*.

Tabela 6. Contagem de *Staphylococcus aureus* em ágar sal nas amostras de queijos tipo minas frescal

Amostras de Queijo Minas	<i>Staphylococcus aureus</i> em ágar sal (colônias fermentadoras de manitol, após coloração de Gram)	
	UFC/g	Log UFC/g ± DP
Amostra 1	$1,9 \times 10^5$	$5,29 \pm 0,02$
Amostra 2	$9,6 \times 10^4$	$4,94 \pm 0,07$
Amostra 3	$1,9 \times 10^6$	$6,28 \pm 0,02$
Amostra 4	$4,0 \times 10^3$	$3,56 \pm 0,18$
Amostra 5	$1,1 \times 10^6$	$3,00 \pm 0,04$
Amostra 6	$1,0 \times 10^6$	$5,79 \pm 0,49$

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata

DP = desvio padrão

Foi verificado que 4 amostras de queijos minas tipo frescal continham populações de *S. aureus* acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Esse resultado é preocupante, uma vez que a intoxicação estafilocócica pode ocorrer com a ingestão de alimento contaminado com menos de $1,0 \mu\text{g}$ de toxina produzida por *Staphylococcus aureus*. Essa quantidade de toxina é produzida quando a população desse patógeno é maior ou igual a $1,0 \times 10^5$ UFC/g do alimento e em um meio com atividade de água igual ou superior a 0,86, como é o caso do queijo tipo minas frescal (VISOTTO et al., 2011).

Para queijos de muita alta umidade (>55%), como os tipos minas frescal, a legislação brasileira (BRASIL, 2001), delimita uma tolerância de $5,0 \times 10^2$ UFC/g para *Staphylococcus aureus*. Neste estudo, as amostras mostraram contagens de *S. aureus* entre $4,0 \times 10^3$ e $1,9 \times 10^6$ UFC/g. Todas as amostras desse estudo apresentaram contagens de *S. aureus* acima do valor permitido pela legislação brasileira e, portanto, estavam impróprias para consumo.

Resultados similares foram obtidos no trabalho de PASSOS et al. (2009), onde das 45 amostras de queijo minas frescal analisadas, 42 amostras (93,3%) encontraram-se com contagens de *S. aureus* acima do valor permitido pela legislação brasileira. A ocorrência de altas contagens de *S. aureus* foi maior nos

queijos sem selo de inspeção federal quando comparada à dos queijos inspecionados. No estudo de VISOTTO et al. (2011), das 30 amostras de queijo minas frescal analisadas, 4 amostras (13,4%) continham populações de *S. aureus* acima de $1,0 \times 10^5$ UFC/g.

A intoxicação alimentar estafilocócica causada pela ingestão de derivados lácteos é comum, sendo frequentemente reportada (BORGES et al., 2008; CARMO et al., 2002; INPPAZ/OPS/OMS, 2006; SANTANA et al., 2010). Um dos fatores responsáveis é o fácil acesso das bactérias *S. aureus* ao leite, uma vez que esse microrganismo é o agente mais comum de mastite bovina (CENCI-GOGA et al., 2003; ZSCHÖCK et al., 2005). Além disso, *S. aureus* pode ser veiculado ao leite pasteurizado ou ao queijo, através de contaminação por meio de práticas deficientes de higiene e manipulação (ZOCHE e SILVA, 2012).

Quanto à análise molecular, foi observado todas as doze colônias suspeitas de *S. aureus*, isoladas das amostras 1 a 6, foram confirmadas na análise de PCR para a presença do gene *entC*, ou seja, são potenciais produtoras de enterotoxina C, conforme descrito na tabela 7 e ANEXO 5 (Figura B).

Tabela 7. Identificação por meio de PCR de bactérias de *Staphylococcus aureus* isoladas das amostras de queijo minas frescal comercializadas em Brasília – DF.

Número da colônia	Amostra	Resultado Molecular
AM25	1	<i>S. aureus</i> +
AM26	1	<i>S. aureus</i> +
AM27	2	<i>S. aureus</i> +
AM28	2	<i>S. aureus</i> +
AM29	3	<i>S. aureus</i> +
AM30	3	<i>S. aureus</i> +
AM31	4	<i>S. aureus</i> +
AM32	4	<i>S. aureus</i> +
AM33	5	<i>S. aureus</i> +
AM34	5	<i>S. aureus</i> +
AM35	6	<i>S. aureus</i> +
AM36	6	<i>S. aureus</i> +
CP	Controle Positivo S. aureus ATCC 33862	<i>S. aureus</i> +
MA1	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
MA2	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
MA3	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
MA4	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
MA5	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
MA6	Controle Positivo	<i>S. aureus</i> +
CN	<i>S. aureus</i> -	<i>S. aureus</i> -

6. CONCLUSÕES

As seis amostras de queijos tipo minas frescal de fabricação artesanal ou informal, comercializadas nas barracas da feira permanente do Gama, DF, foram reprovadas para o consumo e apresentaram contagens de *S. aureus* em níveis suficientes para haver produção de enterotoxinas e risco de causar intoxicação alimentar no consumidor. Esse estudo levantou preocupações acerca da qualidade desses queijos que são bastante consumidos pela população do DF. Assim, como sugestão para trabalhos futuros, espera-se montar um projeto de pesquisa que vise um aprofundamento desse estudo com maior número de amostragens em locais diversos para determinar se os queijos minas frescal comercializados nas feiras do DF oferecem segurança alimentar ao consumidor.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Avanços e perspectivas da indústria brasileira de queijos. 2011.** Disponível em: http://www.abiq.com.br/imprensa_1er.asp?codigo=1003&codigo_categoria=2&codigo_subcategoria=17.

ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Mercado de queijos cresce no país e atrai estrangeiros. 2014.** Disponível em: <http://alfonsin.com.br/mercado-de-queijos-cresce-no-pas-e-atrai-estrangeiros/>

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

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

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Manual de Microbiologia Clínica para Serviços de Saúde**, Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos, Módulo IV, Brasília, 2010.

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

APOLINÁRIO, T. C. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais, **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155-168, 2011.

BILLE, J. et al. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.91-93, 2006.

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

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão, **Boletim do CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 71-86, 2008.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1 570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aditivos no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal**. Instrução Normativa nº 4, de 01 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 5 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de janeiro de 2001.

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

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

BRIGIDO, B. M.; FREITAS, V. P. S.; MAZON, E. M. A.; PISANI, B.; PRANDI, M. A. G.; PASSOS, M. H. C. R. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 177-85, 2004.

CARMO, L. S. et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v.19, n.1, p.9-14, 2002.

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

CARRIQUE-MAS, J.J. et al. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese - an outbreak of listeriosis? **Epidemiology and Infection**, v.130, n.1, p.79-86, 2003.

DOORDUYN, Y.; HOFHUIS, A.; JAGER, C. M. de; van der ZWALUW, W. K.; NOTERMANS, D. W.; van PELT, W. *Salmonella* Typhimurium outbreaks in the netherlands in 2008. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 44, p. 1-3, 2008.

FAGUNDES H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1315-1320, jul-ago, 2004.

FENG, P; WEAGENT, SD; GRANT, MA. **Bacteriological Analytical Manual Online: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria**, 2002. Disponível em:

www.lib.ncsu.edu/pubweb/www/ETDdb/web_root/collection/available/etd04102005213953/unrestricted/etd.pdf.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. Editora Atheneu, São Paulo, 2008.

FRETZ, R. et al. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese 'Quargel' Austria and Germany 2009. **Euro Surveillance**, v.15, n.5, p.1-2, 2010.

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

GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. **Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia-MG**. In: ENCONTRO INTERNO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6, 2006, Uberlândia-MG. *Anais*. Uberlândia, 2006.

ICMSF – Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Microrganisms in Foods 7: Microbiological testing in food safety management**. New York: Kluwer Academic, 2002.

INMETRO. **Queijo Tipo Minas Frescal e Padrão**. SFDK Laboratório de Análise de Produtos Ltda, São Paulo, 2006. Disponível em: http://infoconsumo.gov.br/consumidor/produtos/queijo_Minas.asp#nor.

INPPAZ/OPS/OMS. Instituto Panamericano de Protección de los Alimentos y Zoonosis / Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud. Vigilancia Epidemiológica. **Sistema de información regional para la vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos [SIRVETA]**. Disponível em: <http://www.panalimentos.org/sirveta/e/salida2.asp>.

KOMATSU R. S. et al. Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos minas frescal produzidos em Uberlândia-MG. **Bioscience Journal**, v. 26, n. 2, p. 316-321, 2010.

LAMAITA, H. C. Contagem de *Staphylococcus sp.* e detecção de enterotoxinas estafilocócica e toxina da síndrome do choque em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.5, p.702-709, 2005.

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

LEJEUNE, J. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Unpasteurized milk: a continued public health threat. **Clinical Infectious Disease**, v. 48, n. 1, p. 93–100, 2009.

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

MAKINO, S.I.; KAWAMOTO, K.; TAKESHI, K.; OKADA, Y.; YAMASAKI, M.; YAMAMOTO, S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. **International Journal of Food Microbiology**, v.104, n.2, p.189-196, 2005.

MENDONÇA, J. F. M. **Detecção de células viáveis de *Salmonella spp.* e *Staphylococcus aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real.** Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, MG, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**, 2016. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>

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

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

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

PASTORE, R.; SCHMID, H.; ALTPETER, E.; BAUMGARTNER, A.; HÄCHLER, H.; IMHOF, R.; SUDRE, P.; BOUBAKER, K. Outbreak of *salmonella* serovar Stanley infections in switzerland linked to locally produced soft cheese, september 2006 – february 2007. **Euro Surveillance**, v. 13, n. 37, p. 1-6, 2008.

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

PINTO, F. G. S. et al., Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

QUINTANA R. C.; CARNEIRO, L. C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos – GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, n.3, p. 205-211, 2007.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

SALOTTI, B. M. et al. Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no Município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto de Biologia**, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SANGALETTI, N.; PORTO, E.; BRAZACA, S. G. C.; YAGASAKI, C. A.; DALLA DEA, R. C.; SILVA, M. V. Estudo da vida útil de queijos minas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 262-269, 2009.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos, **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, V. A. Q.; HOFFMANN, F. L. Evolução da microbiota contaminante em linha de processamento de queijos Minas frescal e ricota. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 1, p. 38-46, 2010.

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

SILVA, L. M. **Perfil microbiológico de queijo minas frescal industrializado e artesanal comercializado em Goiânia, Goiás,** Tese (Mestrado), UFG, 982 p., 2015.

SILVA, M. A.; MARVULO, M. F. V.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R. A importância da ordem Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a conservação da diversidade biológica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 573-580, 2010.

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

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 3ª Ed. São Paulo: Logomarca Varela, 2001. 105 p.

TAMARAPU, S. MCKILLIP, J. L.; DRAKE, M. Development of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection and differentiation of *Staphylococcus aureus* in dairy products. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 5, p. 664-668, 2001.

VASCONCELOS, R. M.; MARIN, V. A. *Listeria monocytogenes* em Queijo Minas Frescal e Critérios para a Avaliação de Risco. **Revista Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 15 n. 2, p. 32-45, 2008.

VIEIRA, K. P. et al., Contaminação do queijo minas frescal por bactérias patogênicas: um risco à saúde. **Conscientiae Saúde**, v. 7, n. 2, p. 201-206, 2008.

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

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727 - 736, 1997.

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

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

ANEXOS

Anexo 1. Genoma completo de *Escherichia coli*.

Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome

GenBank: CP015138.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#)

```

LOCUS       CP015138               308 bp    DNA     linear   BCT 08-APR-2016
DEFINITION  Escherichia coli strain Ecol_732, complete genome.
ACCESSION   CP015138 REGION: 3347690..3347997
VERSION     CP015138.1  GI:1016298593
DBLINK      BioProject: PRJNA316786
             BioSample: SAMN04621897
KEYWORDS    .
SOURCE      Escherichia coli
ORGANISM    Escherichia coli
            Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
            Enterobacteriaceae; Escherichia.
REFERENCE   1 (bases 1 to 308)
AUTHORS     Stoesser,N., Sheppard,A., Peirano,G., Sebra,R., Lynch,T., Anson,L.,
            Kasarskis,A., Motyl,M., Kazmierczak,K., Crook,D. and Pitout,J.
TITLE       Direct Submission
JOURNAL     Submitted (07-APR-2016) Department of Microbiology (Research), John
            Radcliffe Hospital, University of Oxford, Headley Way, Oxford OX3
            9DU, United Kingdom
COMMENT     Bacteria available from Johann Pitout, University of Calgary
            Laboratory Services, Calgary, Alberta, Canada, or Nicole Stoesser,
            Department of Microbiology, John Radcliffe Hospital, Headley Way,
            Oxford, UK.
            Annotation was added by the NCBI Prokaryotic Genome Annotation
            Pipeline (released 2013). Information about the Pipeline can be
            found here: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\_prok/

##Genome-Assembly-Data-START##
Assembly Method      :: HGAP v. 2.2.0
Genome Coverage      :: 1x
Sequencing Technology :: PacBio
##Genome-Assembly-Data-END##

##Genome-Annotation-Data-START##
Annotation Provider  :: NCBI
Annotation Date      :: 04/08/2016 11:05:46
Annotation Pipeline  :: NCBI Prokaryotic Genome
                    Annotation Pipeline
Annotation Method    :: Best-placed reference protein
                    set; GeneMarkS+
Annotation Software revision :: 3.1
Features Annotated   :: Gene; CDS; rRNA; tRNA; ncRNA;
                    repeat_region
Genes (total)       :: 5,476
CDS (total)         :: 5,363

    Genes (coding)      :: 5,243
    CDS (coding)       :: 5,243
    Genes (RNA)        :: 113
    rRNAs              :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
    complete rRNAs     :: 8, 7, 7 (5S, 16S, 23S)
    tRNAs              :: 86
    ncRNAs             :: 5
    Pseudo Genes (total) :: 120
    Pseudo Genes (ambiguous residues) :: 0 of 120
    Pseudo Genes (frameshifted) :: 52 of 120
    Pseudo Genes (incomplete) :: 63 of 120
    Pseudo Genes (internal stop) :: 19 of 120
    Pseudo Genes (multiple problems) :: 12 of 120
##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..308
                     /organism="Escherichia coli"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="Ecol_732"
                     /host="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:562"
                     /country="Thailand: Bangkok"
                     /lat_lon="13.76 N 100.50 E"
                     /collection_date="2012"
                     /collected_by="Merck Study for Monitoring of Antimicrobial
                     Resistance Trends (SMART)"
     gene              <1..>308
                     /locus_tag="A4X18_16425"
     CDS               <1..>308

```



```

/locus_tag="A4X18_16425"
/inference="EXISTENCE: similar to AA
sequence:RefSeq:WP_080769998.1"
/note="with EutC catalyzes the formation of acetaldehyde
and ammonia from ethanolamine; Derived by automated
computational analysis using gene prediction method:
Protein Homology."
/codon_start=1
/transl_table=11
/product="ethanolamine ammonia-lyase"
/protein_id="AMX14968.1"
/db_xref="GI:1816381681"
/translation="MKLKTTLPGNVYQFKDVKEVLAKANELRSGDVLGVAASSQER
VAAKQVLEMTVADIRNMPVIAYEDDCVTRLIQDOVNETAYNQIKNWSISELREYVLS
DETSVDDIAFTRKGLTSEVVAQVAKICSNADLIYGAKMPVIKKANTTIGIPGTF SAR
LQPNDRDDVQSIAAQIYEGLSFGVGDVIGVNPVTDQVENLSRVLDTIYGVIDKFNI
PTQGCILAHVTTQIEAIRRGAPGGLIFQSIGSEKGLKEFGVELAMLDEARAVGAEPN
RIAGENCLYFETGQSSALSAGANFGADQVTMEARNYGLARHYDPFIVNTVVGFIGPEY
LYNDRQIIRAGLEDHFMGKLSGISMGDCDCYTNHADADQNLNENLMILLATAGCNVIM
GMPLGDDIIMLVQTTAFHDTATVRQLLNLRPSPEFERNLESIMGIHANGRLTKRAGDPS
LFF"
ORIGIN
   1 tatctctaca acgaccgcca gattatccgc gcaggcttag aagatcactt tatgggcaaa
   61 ctgagcggca tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca accacgctga cgtgaccag
  121 aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc gccaccgca gctgcaacta catcatgggg
  181 atgccgctgg gcgatgacat catgctcaac tatcagacca ccgcattcca cgacactgcc
  241 actgtgctgc agttactgaa tctgcgcccc tcaccggagt ttgaacgctg gctggaaaagc
  301 atgggcat
//

```

Anexo 2. Sequência de Primer para E. coli.

Primer3Plus		Primer3Manager	Help
pick primers from a DNA sequence		About	Source Code
WARNING: Numbers in input sequence were deleted.			
< Back			
Pair 1:			
<input checked="" type="checkbox"/>	Left Primer 1:	<input type="text" value="Primer_F"/>	
Sequence:	<input type="text" value="tc tatgggctgtgactgctg"/>		
Start: 73	Length: 20 bp	Tm: 60.0 °C	GC: 55.0 % ANY: 5.0 SELF: 2.0
<input checked="" type="checkbox"/>	Right Primer 1:	<input type="text" value="Primer_R"/>	
Sequence:	<input type="text" value="ggc atccccatgatgtagtt"/>		
Start: 185	Length: 20 bp	Tm: 59.6 °C	GC: 50.0 % ANY: 5.0 SELF: 3.0
Product Size: 113 bp	Pair Any: 5.0	Pair End: 0.0	
Send to Primer3Manager	Reset Form		
1	tatctotaca	acgacggcca	gattatcgc gcaggcttag aagatcactt
51	tatgggcaaa	ctgagggca	tctctatggg ctgtgactgc tgctacacca
101	accacgctga	cgctgaccag	aacctcaacg aaaacctgat gatcctgctc
151	gccacggcag	gctgcaacta	catcatgggg atgccgctgg gcgatgacat
201	catgctcaac	tatcagacca	cgcattcca cgacactgcc actgtgcgctc
251	agttactgaa	tctgogcccg	tcacggagt ttgaacgctg gctggaaagc
301	atgggcat		
<input type="checkbox"/>	Select all Primers		

Anexo 3. Genoma completo de *S. aureus* precursor da enterotoxina C3.

Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C variant v4 (sec) gene complete cds

GenBank: KX168615.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#)

```

LOCUS       KX168615                801 bp    DNA     linear   BCT 08-JUN-2016
DEFINITION  Staphylococcus aureus strain SAI48 staphylococcal enterotoxin C
            variant v4 (sec) gene, complete cds.
ACCESSION   KX168615
VERSION     KX168615.1
KEYWORDS    .
SOURCE      Staphylococcus aureus
  ORGANISM  Staphylococcus aureus
            Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Staphylococcaceae;
            Staphylococcus.
REFERENCE   1 (bases 1 to 801)
  AUTHORS   Johler,S., Sihto,H.M., Macori,G. and Stephan,R.
  TITLE     Sequence Variability in Staphylococcal Enterotoxin Genes seb, sec,
            and sed
  JOURNAL   Toxins (Basel) 8 (6) (2016)
  PUBMED   27258311
  REMARK    Publication Status: Online-Only
REFERENCE   2 (bases 1 to 801)
  AUTHORS   Johler,S., Sihto,H.-M., Macori,G. and Stephan,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (01-MAY-2016) Institute for Food Safety and Hygiene,
            University of Zurich, Winterthurerstrasse 272, Zurich, Zurich 8057,
            Switzerland
COMMENT     ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..801
                     /organism="Staphylococcus aureus"
                     /mol_type="genomic DNA"
                     /strain="SAI48"
                     /isolation_source="human (infection)"
                     /db_xref="taxon:1280"
                     /country="Switzerland"
                     /collection_date="2010"
     gene             1..801
                     /gene="sec"
     CDS              1..801
                     /gene="sec"
                     /codon_start=1
                     /transl_table=11
                     /product="staphylococcal enterotoxin C variant v4"
  
```

```

/protein_id="AN116442.1"
/translation="MNKSRFISCVILIFALILVLFPMVLAESQPDPTDELHKSSEF
TGTMGNMKYLDDHYVSATKVMVSDKFLAHDLIYNIISOKKLNVDKVKTELLNEDLAK
KVKDEWVDVYGSNYVNCYFSSKDNVGVKVTGGKTCMYGGITKHEGNHFDNSNLQNVLI
RVYENKRNITISFEVQTDKKSQVTAQELDIKARNFLINKKNLYEFNSSPYETGVYKFIEN
NGNTFWYDMMPAPGDKFDQSKYLMYNDONKTVDKSKSVKIEVHLTTKNG"

ORIGIN
  1 atgaataaga gtcgatttat ttcatgcgta attttgatat tcgcacttat actagttcctt
  61 ttacaccca acgtatttagc agagagccaa ccagacccta cccagatga gttgcacaaa
 121 tcaagtgagt ttactggtac gatgggtaat atgaaatatt tatatgatga tcattatgta
 181 tcagcaacta aagttatgtc ttagataaaa tttttggcac atgatttaat ttataacatt
 241 agtgataaaa aactaaaaaa ttatgacaaa gtgaaaacag agttattaaa tgaagattta
 301 gcaaagaagt acaaagatga agtagttgat gtgtatggat caaattacta tgtaaaactgc
 361 ttttttcat ccaaagataa ttaggtataa gttacaggtg gtaaaacttg tatgtatgga
 421 ggaataacaa aacatgaagg aaaccacttt gataatggga acttacaaaa tgtacttata
 481 agagtttatg aaaataaaaag aaacacaatt tcttttgaag tgcaaaactga taagaaaagt
 541 gtaacagctc aagaactaga cataaaaagct aggaattttt taattaataa aaaaaatttg
 601 tatgagttta acagttcacc atatgaaaca ggatatataa aattttattga aaataacggc
 661 aataactttt ggtatgatat gatgcctgca ccaggcgata agtttgacca atctaaatat
 721 ttaatgatgt acaacgacaa taaaacagtt gattctaaaa gtgtgaagat agaagtccac
 781 cttacaacaa agaatggata a

//

```

Anexo 4. Sequência de Primer para *S. aureus*.

Primer3Plus

[Primer3Manager](#)
[About](#)

[Help](#)
[Source Code](#)

pick primers from a DNA sequence

Unrecognized base in input sequence

[< Back](#)

Pair 1:

Left Primer 1:

Sequence:

Start: 60 Length: 24 bp Tm: 60.0 °C GC: 37.5 % ANY: 4.0 SELF: 0.0

Right Primer 1:

Sequence:

Start: 460 Length: 22 bp Tm: 60.1 °C GC: 40.9 % ANY: 5.0 SELF: 1.0

Product Size: 401 bp Pair Any: 3.0 Pair End: 1.0

[Send to Primer3Manager](#)
[Reset Form](#)

```

1      atgaataaga gtcgatttat ttcatgcgta attttgatat tcgcacttat
51     actagttcctt ttacaccca acgtatttagc agagagccaa ccagacccta
101    ogccagatga gttgcacaaa tcaagtgagt ttactggtac gatgggtaat
151    atgaaatatt tatatgatga tcattatgta tcagcaacta aagttatgtc
201    ttagataaaa tttttggcac atgatttaat ttataacatt agtgataaaa
251    aactaaaaaa ttatgacaaa gtgaaaacag agttattaaa tgaagattta
301    gcaaagaagt acaaagatga agtagttgat gtgtatggat caaattacta
351    tgtaaaactgc ttttttcat ccaaagataa ttaggtataa gttacaggtg
401    gtaaaacttg tatgtatgga ggaataacaa aacatgaagg aaaccacttt
451    gataatggga acttacaaaa tgtacttata agagtttatg aaaataaaaag
501    aaacacaatt tcttttgaag tgcaaaactga taagaaaagt gtaacagctc
551    aagaactaga cataaaaagct aggaattttt taattaataa aaaaaatttg
601    tatgagttta acagttcacc atatgaaaca ggatatataa aattttattga
651    aaataacggc aataactttt ggtatgatat gatgcctgca ccaggcgata
701    agtttgacca atctaaatat ttaatgatgt acaacgacaa taaaacagtt
751    gattctaaaa gtgtgaagat agaagtccac cttacaacaa agaatggata
801    a//

```

Select all Primers

ANEXO 5

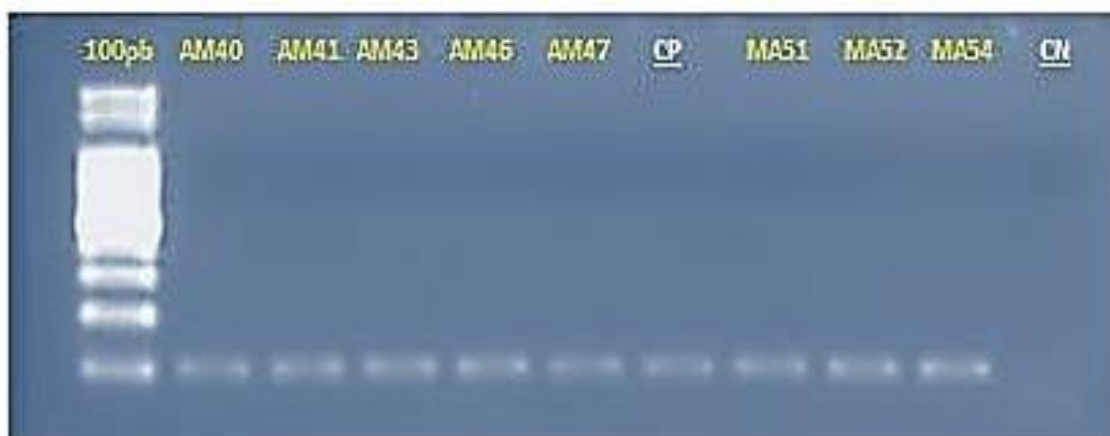


Figura A. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *EutC* de *E. coli*. 100pb = marcador de 100 pb; AM40 a AM47 = amostras deste estudo com amplicons de *EutC* (113 pb); CN = Controle Negativo; CP= Controle positivo ATCC 29213; MA51 a MA54 = controles internos do laboratório.



Figura B. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR qualitativo para a presença do gene *entC* de *S. aureus*. 100pb = marcador de 100 pb; AM25 a AM36 = amostras deste estudo com amplicons de *entC* (401 pb); CP= controle positivo ATCC 33862; MA1 a MA6 = controles internos do laboratório; CN= Controle Negativo.