

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

ARIANE LIMA SIRQUEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COALHOS
ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO
DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, DF

2021

ARIANE LIMA SIRQUEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COALHOS
ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO
DISTRITO FEDERAL**

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

Orientadora: Farmacêutica Esp. Letícia Fernandes Silva Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

BRASÍLIA, DF

2021

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

LS729a LIMA SIRQUEIRA DE SOUZA, ARIANE
AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COALHOS
ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO
DISTRITO FEDERAL / ARIANE LIMA SIRQUEIRA DE SOUZA;
orientador Leticia Fernandes Silva Rodrigues; co-orientador
Daniela Castilho Orsi . -- Brasília, 2021.
36 p.

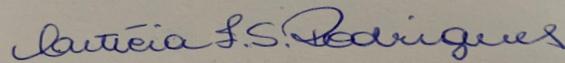
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2021.

1. Queijo coalho. 2. Segurança alimentar. 3. Qualidade
microbiológica. I. Fernandes Silva Rodrigues, Leticia ,
orient. II. Castilho Orsi , Daniela , co-orient. III.
Título.

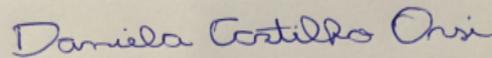
ARIANE LIMA SIRQUEIRA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS COALHOS
ARTESANAIS COMERCIALIZADOS NAS FEIRAS PERMANENTES DO
DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA



Orientadora: Farmacêutica Esp. Leticia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade de Brasília)



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



Farmacêutica Ma. Sabrina Lunara Santos Pavelquesi
(FCE/Universidade de Brasília)



Farmacêutica Esp. Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira
(FCE/Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho à minha família, em especial, à minha mãe, pois graças ao seu esforço posso chegar à conclusão deste trabalho e deste curso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade, pelas pessoas e conhecimento que o curso de farmácia me proporcionou, assim como, a me permitiu a realização deste. Também, agradeço a minha mãe, a pessoa quem mais me apoiou durante todo esse caminho.

Agradeço a farmacêutica e minha orientadora Leticia por ter conduzido esse trabalho com dedicação, paciência e amizade. À minha co-orientadora Daniela, por conceder a oportunidade de vivenciar as rotinas do laboratório de microbiologia, além de toda ajuda com o desenvolvimento do meu trabalho final.

Agradeço a minha família e a minha querida amiga Keis, por darem conselhos para que eu não desistisse, por escutarem e suportarem durante esses anos de graduação.

Agradeço aos meus amigos de curso, por sempre me ajudarem a resistir com humor e leveza todo fim de cada pesado semestre.

À instituição Universidade de Brasília, especialmente, à Faculdade de Ceilândia, ao colegiado de farmácia e também aos professores do ensino fundamental e médio por passarem conhecimento durante a minha vida acadêmica.

RESUMO

O queijo coalho é um alimento tipicamente nordestino. E, devido a influência da cultura nordestina no Distrito federal, esse queijo, comumente produzido de maneira artesanal, é frequentemente vendido em feiras. O objetivo deste trabalho foi analisar a qualidade microbiológica de seis amostras de queijos coalhos artesanais comercializados em feiras permanentes do Distrito Federal. Os parâmetros microbiológicos avaliados foram contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas, quantificação e identificação de coliformes totais e termotolerantes pela técnica de tubos múltiplos. Quanto a *Staphylococcus aureus*, foi feita contagem em ágar Sal Manitol com posterior coloração de Gram das colônias suspeitas. E, para pesquisa de *Salmonella* spp., após o isolamento da cepa foi realizada a confirmação através da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para detecção do gene *invA*. Após pesquisar a contaminação dos queijos por coliformes totais, em todas as amostras analisadas (6) foram encontrados valores acima de 3 log NMP/g e 4 amostras (66,7%) excederam o limite da legislação brasileira para coliformes termotolerantes (3 log NMP/g), portanto, estavam impróprias para consumo. Além disso, 2 dessas amostras também apresentaram contagens de *S. aureus* acima do permitido pela legislação (3 log UFC/g). Desse modo, os achados sugerem uma baixa qualidade higiênicossanitária dos queijos analisados. Visto que a presença de tais agentes patogênicos pode representar risco à saúde pública, há questionamentos acerca do controle e regulamentação de alimentos de produção artesanal, o que salienta a necessidade de implementação e aplicação de boas práticas de fabricação, e inspeção sanitária de órgão regulatório do alimento produzido.

Palavras-chave: Queijo coalho. Segurança alimentar. Qualidade microbiológica.

ABSTRACT

Coalho cheese is a product typical produced and consumed in the northeast states of Brazil. Due to the influence of the Northeast culture in the Federal District, this cheese, commonly produced by hand, is widely sold at fairs. The objective of this work was to analyze the microbiological quality of six samples of artisanal coalho cheeses sold in permanent fairs in the Federal District. The microbiological evaluated parameters were total count of mesophilic and psychrotrophic bacteria, identification and quantification of total and thermotolerant coliforms by the Most Probable Numbers technique (MPN). The count of *Staphylococcus aureus* was done in mannitol salt agar with subsequent Gram staining of the suspected colonies. And, for *Salmonella* spp. research, after the isolation of the strain, confirmation was performed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique for detection of the *invA* gene. After researching the contamination of cheeses by total coliforms, values above 3 log NMP/g were found in all analyzing samples (6). And 4 samples (66.7%) exceeded the limit of Brazilian legislation for thermotolerant coliforms (3 log NMP /g), therefore, were unfit for consumption. In addition, 2 of these samples also had *S. aureus* counts above those allowed by legislation (3 log CFU/g). Therefore, the findings suggest a low hygienic-sanitary quality of the analyzed cheeses. Since the presence of such pathogens can represent a risk to public health, there are questions about the control and regulation of artisanal food production, which highlights the need to implement and apply good manufacturing practices and sanitary inspection of the food.

Keywords: Curd cheese. Food safety. Microbiologic quality.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primer utilizado para identificação de <i>Salmonella</i> spp. com sequência de bases, produto de PCR estimado e espécies alvo.....	21
Tabela 2 - Resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas em amostras de queijo coalho.....	23
Tabela 3 - Resultados da determinação de número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e coliformes termotolerantes e da presença de <i>Salmonella</i> em amostras de queijo coalho.....	25
Tabela 4 - Resultados da contagem de <i>Staphylococcus aureus</i> em amostras de queijo coalho.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIQ	Associação Brasileira das Indústrias de Queijo
Ágar FA	Ágar Fenilalanina
Ágar Lia	Ágar Lisina Ferro
Agar TSI	Ágar Três Açúcares e Ferro
Caldo LB	Caldo Luria Bertani
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
ICMSF	Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods
IN	Instrução Normativa
Kcl	Cloreto de Potássio
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mM	micro molar
MPN	Most Probable Numbers
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Não Detectado
ng	nanograma
NMP/g	Número Mais Provável por Grama
pb	pares de base
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
µL	microlitro
USDA	United States Department of Agriculture

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Queijos brasileiros: produção e consumo.....	11
2.2 Qualidade dos queijos artesanais brasileiros.....	12
2.3 Legislação brasileira e limites microbiológicos para queijos.....	13
2.4 Biologia molecular na identificação de <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> e <i>S. aureus</i> em alimentos.....	15
3 OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4 JUSTIFICATIVA.....	18
5 METODOLOGIA.....	19
5.1 Coleta das amostras.....	19
5.2 Análises microbiológicas.....	19
5.2.1 Contagem de Bactérias Mesófilas e Psicrotróficas.....	19
5.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes.....	19
5.2.3 Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
5.2.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	20
5.3 Análises Moleculares: Identificação molecular de bactérias suspeitas de serem patogênicas.....	21
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
7 CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
ANEXO A- Número Mais Provável (NMP) para três tubos e respectivos intervalos de confiança a nível de 95% de probabilidade.....	35

1 INTRODUÇÃO

O queijo coalho, conforme definição do anexo II da Instrução Normativa nº30 de 26 de junho de 2001, é o “queijo que se obtém por coagulação do leite pasteurizado por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementadas ou não pela ação de bactérias lácticas selecionadas” (BRASIL, 2001). É classificado como um queijo de média a alta umidade (36 a 54%), dito gordo, com o teor de gordura variável entre 35 a 60%. Quanto aos aspectos sensoriais, o produto deve ser de consistência elástica, textura compacta podendo apresentar algumas olhaduras, de cor branca amarelada uniforme, de odor e sabor ligeiramente ácido, o qual pode ser salgado, possui crosta fina e sem trinca, não sendo comum a formação de crosta definida e apresenta-se em formatos variáveis (BRASIL, 2001; NASSU et al., 2006).

No Brasil, existem muitas variedades de queijos e parte de sua produção ocorre de maneira artesanal, sendo estes usualmente elaborados a partir de leite cru e em desacordo com os critérios de boas práticas de fabricação (OLIVEIRA et al., 2010; SOLÓRZANO et al., 2018). Por se tratar de um alimento pronto para o consumo, os queijos artesanais podem estar relacionados com a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (YAMANAKA et al., 2016). Segundo dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde, no Brasil, no ano de 2019, houve 771 casos de DTA, dos quais 32,3% (aproximadamente 249/771) estavam relacionados ao consumo de leite e derivados lácteos (BRASIL, 2021).

A comercialização de queijos artesanais ocorre frequentemente de maneira informal em feiras, muitas vezes sem refrigeração dos produtos, o que favorece o crescimento de micro-organismos, além de realização de venda sem rótulo com informações que garantem o controle de qualidade, tal qual a data de fabricação, data de validade, matéria prima utilizada e selo de inspeção do órgão regulador (BOMFIM et al., 2020; PRATES et al., 2017; SILVA et al., 2018).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Queijos brasileiros: produção e consumo

Entende-se por queijo o produto obtido pela coagulação completa ou parcial do leite por meio de um agente coagulante, seja pela ação física do coalho, por meio de enzimas de bactérias lácticas ou de ácidos orgânicos próprios para uso alimentar. Sua classificação baseia-se em características como o tipo de leite, o tipo de coagulação, o tempo de cura e o teor de gordura. A portaria 146 de Março de 1996 ainda os classifica pela umidade, na qual, aqueles com umidade de até 35,9% são de baixa umidade como o parmesão; entre 36,0 e 45,9% são de média umidade como o queijo muçarela; entre 46% e 54,9% são de alta umidade, como o queijo minas padrão, e os queijos com umidade superior a 55,0%, como Minas frescal, são de muita alta umidade. O queijo coalho é classificado com um queijo de média a alta umidade (36 a 54%) (BRASIL, 1996; BRASIL, 2001; KAMIMURA et al., 2019a; KAMIMURA et al., 2019b).

No Brasil, segundo a ABIQ (Associação Brasileira das Indústrias de Queijo), o consumo estimado de queijo foi de 5,5 kg por pessoa ao ano, em 2019, com tendência de aumento, assim, o país se encontra entre os cinco maiores consumidores do mundo. Os dados sobre o consumo, trazem os Estados Unidos como maior consumidor (em torno de 6,1 milhões de toneladas por ano), seguido pela Alemanha (3 milhões de toneladas por ano) e pela França (1,6 milhões de toneladas por ano). Ao se tratar de produção, o Brasil, também fica entre os cinco maiores do mundo, atrás de países como os Estados Unidos, Alemanha e França. Enquanto a produção no país é de 1,2 milhões de toneladas por ano (igualado à Itália), nos Estados Unidos, o maior produtor, esse número chega a 5,3 milhões por ano. Em seguida aparece a Alemanha, com 2,2 milhões de toneladas e a França com 2 milhões de toneladas (ABIQ, 2019).

Considerando que o mercado de exportação de queijos ainda é liderado pelos EUA e seguido pela Alemanha, o Brasil em média exportou cerca de 4,4 mil toneladas ao ano, nos últimos cinco anos, para treze países. No entanto, boa parte do queijo produzido é direcionado ao consumo próprio e, em cinco anos, o Brasil importou em média 18,6 mil toneladas. Ainda, de acordo com a ABIQ, entre os queijos mais produzidos no Brasil, 65% são de muçarelas, seguido dos queijos frescos como o Minas frescal, os fundidos, o coalho e o queijo ralado. Além disso, há os queijos especiais, como o queijo parmesão,

provolone e gorgonzola, representando 9% da produção (ABIQ, 2016; ABIQ, 2019; SEBRAE, 2008; USDA, 2020).

A produção industrial de queijos movimenta a economia, uma vez que permite a venda em diversas regiões do Brasil. Além desses, os queijos artesanais são expressivos na produção, todavia, por ser de mercado ainda informal, não há dados oficiais (ABIQ, 2019). Dentre esses queijos artesanais pode-se destacar o queijo Minas frescal, o coalho, o queijo manteiga, entre outros denominados segundo sua região, processos de produção e características correspondentes a sua variedade (KAMIMURA et al., 2019a).

O queijo coalho é tipicamente nordestino e muito consumido pela população local. Obtém-se pela coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas. É de média a alta umidade, de massa semi-cozida, de consistência elástica, possui crosta fina, não sendo usual a formação de crosta grossa. As etapas de sua produção incluem pasteurização do leite, adição de coalho, coagulação, corte da coalhada, mexedura, cozimento da massa, salga, enformagem, prensagem e viragem, maturação, embalagem e armazenamento. O produto geralmente é comercializado com até dez dias de fabricação e deve ser mantido em temperatura não superior a 12°C (NASSU et al., 2006; PINEDA et al., 2020).

2.2 Qualidade dos queijos artesanais brasileiros

A produção de queijos artesanais é considerada uma estratégia para o desenvolvimento social e econômico, e boa parte dessa produção ocorre utilizando leite não tratado termicamente, pois, confere ao alimento sabor mais intenso e forte se comparado a quando é feito com o uso de leite pasteurizado. No entanto, a ingestão de queijos contaminados pelo uso do leite cru na produção traz consequências a saúde da população, sendo tal alimento associado a gastroenterites, de modo que a pasteurização é o método mais seguro para destruir os patógenos comumente relatados no leite cru (KAMIMURA et al., 2019a; KAMIMURA et al., 2019b; PRATES et al., 2017).

Os alimentos de produção artesanal vêm sendo alvo de pesquisas ao longo do tempo, uma vez que o processo de produção destes possibilita a contaminação microbiológica, incluindo os queijos artesanais brasileiros, que muitas vezes estão em desacordo com o previsto em lei. Isso ocorre devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras associadas às etapas de processamento que não seguem práticas rígidas de

higiene, caracterizada por uso de utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias de higiene e comercialização em temperaturas inadequadas, sem refrigeração, propiciando transmissão direta e cruzada de patógenos (KAMIMURA et al., 2019a; PINEDA et al., 2020; PRATES et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2010).

2.3 Legislação brasileira e limites microbiológicos para queijos

A qualidade dos queijos está relacionada diretamente à qualidade de sua matéria-prima e condições de processamento e comercialização. Desta forma, a legislação brasileira, por meio da IN n° 60 de 2019 (BRASIL, 2019), dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos e estabelece limites para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. em queijos, e esses são micro-organismos de importância clínica, dado que o consumo de produtos lácteos pode ser associado a surtos de DTA (SANTANA et al., 2008; SOUSA et al., 2014).

O grupo dos coliformes termotolerantes são bactérias da família *Enterobacteriaceae*. São chamados de termotolerantes pois fermentam a lactose produzindo gás a 45°C, compreendendo gêneros de bactérias como *Enterobacter* e *Klebsiella*, sendo *Escherichia coli* a representante dominante deste grupo. Boa parte das cepas de *E. coli* não causam doenças, apesar disso, há sorotipos de *E. coli* patogênicos. Por mais que possam ser introduzidas de outras maneiras nos alimentos, os coliformes termotolerantes são indicadores de contaminação fecal direta e indireta, logo apontam a qualidade microbiológica do alimento (BEZERRA et al., 2017; SILVA; BORTOLUCI; VIVAN, 2019). Conforme a legislação brasileira, o limite estabelecido é de 3,0 log UFC/g (Unidades Formadoras de Colônia) para os queijos (BRASIL, 2019).

Salmonella spp. é uma das causas mais importantes de doenças veiculadas por alimentos no mundo. São bacilos gram-negativos capazes de causar gastroenterites por contaminação alimentar e sua presença é relatada em queijos artesanais por diversos estudos (BEZERRA et al., 2017; PRATES et al., 2017; SANTANA et al., 2008; SOUSA et al., 2014). Além disso, essa bactéria se mantém viável no alimento contaminado por longo período, sendo a pasteurização do leite um método eficiente para eliminá-la (ECKERT; WEBBER, 2016; SOUSA et al., 2014). Assim, a legislação estabelece a ausência de *Salmonella* spp. em queijos (BRASIL, 2019).

Outro microrganismo que compromete a qualidade sanitária de produtos lácteos é o *Staphylococcus aureus* (ECKERT; WEBBER, 2016). Especialmente, no caso de leite não tratado termicamente, em que a contaminação do produto ocorre devido a este ser um dos principais agentes etiológicos da mastite, um processo infeccioso que afeta a glândula mamária de bovinos alterando a secreção e composição do leite, e consequentemente do queijo (PINEDA et al., 2020). Por serem causadoras de diversas DTA, a Instrução Normativa nº 60 limita a quantidade de *S. aureus* a 3,0 log UFC/g em queijos (BRASIL, 2019).

Visto que a pasteurização é eficaz na destruição de estafilococos, há a preocupação com a contaminação cruzada durante o processamento quando relacionada às práticas de higiene inadequadas, uma vez que *S. aureus* são comumente encontrados nas fossas nasais e pele de portadores humanos. Além disso, devido ao caráter termorresistente das enterotoxinas estafilocócicas, ainda há o risco de intoxicação alimentar pós-pasteurização (BORGES et al., 2008; SOUSA et al., 2014).

Assim, as boas práticas de fabricação são essenciais para obtenção de produtos próprios para consumo humano, elas são regulamentadas por meio da Portaria 326 de 1997 complementada pela RDC 275 de 2002, as quais estabelecem requisitos gerais de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos produzidos para o consumo humano. E abrangem diversas características da unidade produtora de alimentos, que vão desde a qualidade da matéria-prima e dos ingredientes até as orientações de construção das instalações e de higiene (BRASIL, 1997; BRASIL, 2002).

Essas ações viabilizam um espaço de trabalho eficaz, otimizando o processo de produção de forma geral. Elas são fundamentais para o controle de prováveis meios de contaminação cruzada e para assegurar que o produto a ser ofertado corresponda às exigências de identidade e qualidade. Aliado às boas práticas, outro fator importante a ser considerado é a temperatura que torna viável o crescimento e desenvolvimento de diversos micro-organismos (DE CASTRO et al., 2019). Assim, o queijo coalho deve ser armazenado em temperatura não superior a 12°C (BRASIL, 2001).

2.4 Biologia molecular na identificação de *E. coli*, *Salmonella* e *S. aureus* em alimentos

A microbiologia convencional utiliza para a identificação de micro-organismos: isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica. No entanto, essas técnicas exigem de três a sete dias para confirmação do microrganismo. Diversos patógenos são associados a doenças entéricas de modo que a detecção rápida se torna importante para conter sua disseminação antes que ocorram surtos graves. Muitos métodos rápidos têm sido criados para superar tal dificuldade, e o método da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é amplamente utilizado para detecção de micro-organismos causadores de doença em alimentos, devido a sua rapidez e especificidade (CHEUNG; KAM, 2012; ZHAO et al., 2016).

A reação em cadeia da polimerase é a técnica de amplificação de ácidos nucleicos, a qual pode ser utilizada para detecção de micro-organismos patogênicos. O princípio desta técnica baseia-se na amplificação de pequenas quantidades de DNA, até que se obtenha milhões de cópias da sequência alvo. Para tal, um fragmento de DNA específico é amplificado durante um processo cíclico no qual o DNA alvo é desnaturado em alta temperatura, em seguida, a polimerização é realizada com os oligonucleotídeos (*primers*) como iniciadores para as enzimas e o DNA alvo como molde. Os produtos resultantes são do mesmo tamanho e podem ser identificados por meio de eletroforese em gel de agarose e coloração subsequente com brometo de etídio. Desde sua descoberta, surgiram vários tipos de PCR, que recebem nomes de acordo com o protocolo alterado da PCR original, além disso a técnica é comumente aplicada às análises de DNA cromossômico e perfil plasmidial (GANDRA et al., 2008; ZHAO, et al., 2016).

Os produtos alimentícios de base láctea apresentam-se desafiadores quanto à detecção de patógenos por PCR. Especialmente, aqueles com alto teor de gordura como o queijo, fator que pode afetar a extração de DNA e consequente amplificação. A detecção direta, cuja extração de DNA ocorre diretamente do produto lácteo ou de seus derivados, se mostra rápida e simples, todavia, apresenta limite baixo de identificação, portanto, o correto tratamento da amostra, como o pré-enriquecimento cultural, auxilia na geração de resultados confiáveis (CREMONESI et al., 2007).

Os métodos de PCR se mostram eficientes para detecção de patógenos em alimentos, como os diversos micro-organismos do gênero *Salmonella* spp., causadores de

infecções intestinais em diferentes hospedeiros. Para o diagnóstico de *Salmonella* spp., a microbiologia tradicional se dá por meio de isolamento, identificação bioquímica (TSI e LIA) e caracterização antigênica. Além disso, pode-se inserir a análise molecular por meio da PCR (ANDRADE et al., 2010). Alguns estudos relatam a identificação de *Salmonella* spp. ao empregar pares de iniciadores específicos ou complementares com base na sequência de diferentes genes, como o gene de invasão (*invA*) e gene de virulência (*spvC*), presentes em diversas cepas do gênero (ANDRADE, et al., 2010; CHEUNG;KAM, 2012). Pode-se identificar também a presença dos genes *agfA* e *lpfA* (MOURA et al., 2014).

A detecção de estafilococos enterotoxigênicos, tanto em cultura quanto em alimentos, destaca-se pela busca do marcador específico, o gene *femA*, o qual codifica o fator de resistência a metilina e está universalmente presente em cepas de *S. aureus*. Além disso, pode ser feita a busca por genes relacionados à síntese de enterotoxinas, tais como *agr*, *seb*, *sec*, *sed*, *sea* e *sej* (BORGES et al., 2008; CREMONESI et al., 2007; SANTANA et al., 2020). Quanto a *E. coli*, os genes alvos comumente selecionados são *stx1* e *stc2*, codificadores de toxina shiga e o gene *afa* (NGUYEN et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

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

3.2 Objetivos específicos:

- Realizar 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*, pesquisa de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp.
- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação de *Salmonella* spp.

4 JUSTIFICATIVA

Os queijos produzidos de maneira artesanal, frequentemente, passam por diversas etapas de manipulação sem condições sanitárias adequadas, o que propicia a contaminação com micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Muitas vezes os locais de comercialização desses queijos não ofertam condições higiênicas e sanitárias adequadas no armazenamento e manipulação do produto. Esses fatos, aliados à qualidade da matéria prima e ao elevado consumo dos queijos obtidos em feiras pela população brasileira, sobretudo no Distrito Federal, justificam o estudo de avaliação microbiológica dos queijos tipo coalho artesanais comercializados nas feiras permanentes do Distrito Federal.

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta das amostras

As seis amostras de queijo coalho de fabricação artesanal foram coletadas em três diferentes Feiras Permanentes do Distrito Federal durante o mês de Janeiro de 2021 e foram levadas ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Ceilândia/UnB.

Para o preparo, foram pesadas 25g da amostra em 225mL de água peptonada 0,1% (p/v), após foi realizada homogeneização, obtendo-se a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição foram realizadas as demais diluições seriadas até a diluição 10^{-4} .

5.2 Análises microbiológicas

Todas as amostras foram avaliadas através das 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.

5.2.1 Contagem de Bactérias Mesófilas e Psicrotróficas

Para a contagem total de bactérias aeróbicas, as amostras foram semeadas em meio de cultivo Ágar Padrão para Contagem, com incubação das diluições -2,-3 e -4 a 37°C por 24 horas para mesófilas, e as diluições -1,-2 e -3 foram incubadas a 7°C \pm 1°C por 7 dias para psicrotróficas. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão de log UFC/g.

5.2.2 Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes

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, para teste

presuntivo. A positivação foi verificada pela turvação e produção de gás em tubos de Durham. As 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), em ambos, foi determinado o valor de NMP/g por meio da tabela de números mais prováveis constante no anexo A. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão de log NMP/g.

5.2.3 Contagem de *Staphylococcus aureus*

Para a contagem de *S. aureus*, as diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) das amostras foram semeadas em meio de cultivo Ágar Sal de Isolamento (Ágar Padrão de Contagem suplementado com 6% de Cloreto de Sódio) a 37°C por 48 h. As colônias das diluições (10^{-2} e 10^{-3}) foram semeadas em tubos contendo Ágar Sal Manitol, incubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação, foram realizados esfregaços das colônias típicas para coloração de Gram. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

5.2.4 Pesquisa de *Salmonella spp.*

Para a pesquisa de *Salmonella spp.*, alíquotas da água peptonada (diluição 10^{-1}) incubada a 37°C por 24 horas foram transferidas para caldo selenito cistina e incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, os microrganismos foram isolados em Ágar Salmonella Shigella. As colônias com pigmento preto e não fermentadoras de lactose foram repicadas e transferidas para o meio de cultivo Ágar TSI (três açúcares e ferro) (Kasvi®), LIA(Lisina-Ferro) (Kasvi®) e FA (Fenilalanina) (Kasvi®) com o auxílio de uma alça bacteriológica de níquel cromo esterilizada. As colônias com reações típicas de *Salmonella spp.* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

5.3 Análises Moleculares: Identificação molecular de bactérias suspeitas de serem patogênicas

As colônias isoladas suspeitas de *Salmonella* spp. foram confirmadas por Reação em Cadeia de Polimerase. Sendo que, um gene bem-aceito para detecção das cepas de *Salmonella* spp., o qual foi escolhido para esse estudo, é o *invA*, gene bem preservado em bactérias desse gênero, o qual possibilita a invasão de células epiteliais (ANDRADE, et al., 2010; NCBI, 2020). A Tabela 1 apresenta o primer utilizado para identificação de *Salmonella* spp.

Tabela 1- Primer utilizado para identificação de *Salmonella* spp. com sequência de bases, produto de PCR estimado e espécies alvo.

Gene	Sequência de Primer (5'-3')	Amplificação (pares de bases)	Espécie
<i>invA</i> forward	GCTGATGCCGGTGA AATTAT	445 pb	<i>Salmonella</i> spp.
<i>InvA</i> reverse	CGACAAGACCATCA CCAATG		

Fonte: Araújo, 2015.

As colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, em caldo Luria Bertani (LB) (Kasvi®) e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial NucleoSpin Food Kit (Macherey- Nagel, Düren, Alemanha). A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por quantificação em espectrofotômetro NanoDrop.

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 de desnaturação inicial de 95°C por 2 min e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 60 seg, seguida por 60°C por 60 seg, para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 60 seg

para a extensão dos fragmentos, e 72°C por 10 min para extensão final. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 1,26 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP (2,5 mM), 0,5 µL dos oligonucleotídeos forward e reverse (10µM), 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 ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a contagem de bactérias mesófilas e psicrotróficas estão expressos na Tabela 2. Para queijos, a legislação brasileira (BRASIL, 2019) não estabelece limites para bactérias mesófilas e bactérias psicrotróficas. 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. Nessa análise, foram encontrados valores de 6,67 a 7,67 log UFC/g para bactérias mesófilas e de 2,89 a 6,39 log UFC/g para bactérias psicrotróficas.

Tabela 2- Resultados da contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas em amostras de queijo coalho

Amostras de Queijo Coalho	Bactérias Mesófilas (log UFC/g)	Bactérias Psicrotróficas (log UFC/g)
Amostra 1	7,48 ± 0,02	3,47 ± 0,31
Amostra 2	6,67 ± 0,16	3,34 ± 0,45
Amostra 3	6,98 ± 0,61	2,89 ± 1,16
Amostra 4	7,67 ± 0,11	4,28 ± 1,39
Amostra 5	6,84 ± 1,15	4,25 ± 0,33
Amostra 6	7,30 ± 0,12	6,39 ± 0,11

Resultados expressos em média de log UFC/g seguidos dos valores de desvio padrão. Valor de referência para bactérias totais: 7 log UFC/g (ICSMF, 1986).

Bactérias mesófilas são aquelas capazes de crescer em temperaturas de 35-37°C e indicam a qualidade do alimento, dado que, a presença destes micro-organismos em excesso sugere situações em que há falta de condições básicas de higiene (SILVA et al., 2018). Neste estudo, 3 amostras (50%) apresentaram bactérias mesófilas maior que 7,0 log UFC/g. No estudo de Silva et al. (2018), os queijos coalhos comercializados em 4 feiras livres do município de Petrolina-PE mostraram elevadas contagens de bactérias mesófilas variando de 10,7 a 11,1 log UFC/g.

Torres e colaboradores (2021) ao analisarem queijos coalho comercializados em Arapiraca-AL, obtiveram contagens de mesófilos entre 3 e 7 log UFC/g. Segundo os

autores a utilização do leite cru para a produção de queijos coalho artesanais é um importante fator que diminui a qualidade higiênicossanitária desses alimentos. E para agravar o problema das condições higiênicas dos queijos, as feiras possuem situações favoráveis para o crescimento e proliferação de micro-organismos, como falta de infraestrutura adequada e comercialização dos produtos de maneira incorreta pelos feirantes (sem refrigeração por exemplo).

É interessante observar que a contagem de bactérias mesófilas foi superior em relação a contagem de bactérias psicrófilas em todas as amostras analisadas nesse estudo, 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).

A legislação brasileira (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 log NMP/g. No nosso estudo, ao pesquisar a contaminação dos queijos por coliformes totais, em todas as amostras analisadas foram encontrados valores acima de 3 log NMP/g, indicando falta de qualidade higiênicossanitária desses queijos (Tabela 3). Bezerra et al. (2017) reportaram resultados similares ao nosso estudo e as 15 amostras de queijo coalho provenientes de cinco pontos de venda localizados em uma feira livre no município de Sousa/PB apresentaram coliformes totais acima de 3 log NMP/g.

A legislação brasileira determina como parâmetros microbiológicos para os queijos a quantidade limite para coliformes termotolerantes de 3 log NMP/g (BRASIL, 2019). Observou-se que 4 amostras de queijos coalho (66,7%) excederam o limite de coliformes termotolerantes (Tabela 3) e, portanto, estavam impróprias para consumo segundo a legislação brasileira. Resultados similares ao nosso estudo foram reportados na literatura. Torres et al. (2021), ao analisarem queijos comercializados em mercados varejistas de Arapiraca-AL observaram que 83,3% (25/30) das amostras de queijo coalho apresentaram coliformes a 45°C acima de 3,7 log NMP/g, logo, também estavam impróprias para consumo segundo a legislação brasileira. No estudo de Silva et al. (2018), das 36 amostras de queijos coalhos comercializados em 4 feiras livres do município de Petrolina-PE, 22 amostras (61,1%) apresentaram coliformes a 45°C acima do permitido.

Tabela 3- Resultados da determinação de número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e coliformes termotolerantes e da presença de *Salmonella* em amostras de queijo coalho.

Amostras de Queijo Coalho	Coliformes Totais (log NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (log NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp.
Amostra 1	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 2	3,04 ± 0,21	2,66 ± 0,48	Ausente
Amostra 3	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 4	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente
Amostra 5	3,04 ± 0,33	2,20 ± 0,77	Ausente
Amostra 6	3,04 ± 0,00	3,04 ± 0,00	Ausente

Resultados expressos em média de log NMP/g seguido dos valores de desvio padrão. Valor de Referência para coliformes termotolerantes: 3,0 log NMP/g (BRASIL, 2019).

Valor de Referência para coliformes totais: 3,0 log NMP/g (BRASIL, 1996).

Valor de Referência para *Salmonella* spp.: Ausente/25 g de amostra (BRASIL, 2019).

No estudo de Rodrigues et al. (2016), a qualidade microbiológica de queijos coalhos comercializados em feiras livres e supermercados nas cidades de Feira de Santana e Cruz das Almas, BA, revelou que 77,9% das amostras (53/68) estavam contaminadas por *E. coli* e 22% das amostras estavam contaminadas pelo sorotipo de *E. coli* O157 que é uma bactéria patogênica com graves repercussões na saúde pública, sendo que a amostras provenientes de ambos os estabelecimentos indicavam condições de higiene insatisfatórias.

De acordo com Silva et al. (2018) a contagem de coliformes totais é utilizada como indicador higiênico dos alimentos e sua elevada presença é sugestiva de contaminação durante o processamento e o armazenamento. Além disso, a presença de coliformes termotolerantes e *E. coli* nas amostras indica que houve, de forma direta ou indireta, contato de material fecal com o alimento, e o excesso de coliformes termotolerantes nos alimentos pode indicar que outros patógenos entéricos podem estar presentes.

Pontarolo et al. (2017) descreveram que o queijo artesanal serrano, produzido a partir de leite cru de bovinos, é um produto típico dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul. No entanto, a sua comercialização na grande maioria ocorre às margens da legislação, por ser fabricado com leite cru e não possuir um período mínimo de maturação.

Então, o estudo de Pontarolo et al. (2017), analisou a qualidade microbiológica dos queijos com 14 e 28 dias de maturação, produzido em 31 propriedades da Serra Catarinense. Contagens de *E. coli* superiores ao aceitável foram observadas em 45,2% (14/31) e 48,4% (15/31) das amostras analisadas após 14 e 28 dias de maturação, respectivamente. Os autores concluíram que o período de maturação não demonstrou ser efetivo na redução de contaminações microbiológicas a níveis aceitáveis. A presença de bactérias patogênicas indicou a necessidade de adequação do sistema de produção do queijo artesanal serrano mediante a profissionalização do produtor e adoção de medidas de boas práticas de fabricação.

Prates et al. (2017) ao avaliarem amostras de leite e queijo coalho, encontraram maiores níveis de contaminação para coliformes termotolerantes nas amostras de leite cru, contudo, a pasteurização do leite utilizado no preparo dos queijos foi eficiente, e as amostras de queijos coalho apresentaram de 1,4 a 2,8 log NMP/g de coliformes termotolerantes. Assim, reforça-se a importância da necessidade de pasteurização do leite antes da fabricação dos queijos como medida que elimina as bactérias patogênicas da matéria prima.

No nosso estudo, após as análises de PCR para a detecção do gene *invA*, não foi observado a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de queijo coalho. Pontarolo et al. (2017) também não detectaram *Salmonella* spp. nas amostras de queijo artesanal serrano (produzido a partir de leite cru de bovinos), após 14 e 28 dias de maturação. No estudo de Yamanaka e colaboradores (2016), *Salmonella* spp. foi detectada em 6,3% das 32 amostras de queijos artesanais, adquiridos em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras. No estudo de Prates et al. (2017) a eficácia da pasteurização foi evidenciada através da análise de *Salmonella* spp., onde a bactéria foi detectada em uma amostra de leite cru, mas não foi detectada após a pasteurização do leite. A contaminação do leite cru por *Salmonella* spp. está associada a práticas higiênicas deficientes na ordenha, uma vez que *Salmonella* spp. pode ser encontrada nas fezes das vacas. Assim, as boas práticas são essenciais para evitar a contaminação do leite por *Salmonella* spp. nas fazendas.

Em relação a *Staphylococcus aureus*, a legislação brasileira limita sua presença em queijos a 3 log UFC/g (BRASIL, 2019). Neste estudo, 2 amostras de queijos coalho (33,33%) apresentaram contagens de *S. aureus* acima de 3 log UFC/g (Tabela 4) e essas amostras já estavam impróprias para o consumo pelo excesso de coliformes termotolerantes.

Tabela 4- Resultados da contagem de *Staphylococcus aureus* em amostras de queijo coalho.

Amostras de Queijo	<i>S. aureus</i>
Coalho	(log UFC/g)
Amostra 1	4,0 ± 2,30
Amostra 2	ND
Amostra 3	4,0 ± 2,30
Amostra 4	3,0 ± 1,73
Amostra 5	ND
Amostra 6	ND

Resultados expressos em média de log UFC/g seguidos dos valores de desvio padrão.
 Valor de referência para *S. aureus*: 3 log UFC/g (BRASIL, 2019).
 ND: Não Detectado.

Outros trabalhos também reportaram contagens elevadas de *S. aureus* em amostras de queijos artesanais. Pontarolo et al. (2017) reportaram que 54,8% (17/31) e 51,6% (16/31) das amostras de queijo artesanal serrano, apresentaram após 14 e 28 dias de maturação valores acima de *S. aureus* acima de 3 log UFC/g. Em outro trabalho, Yamanaka e colaboradores (2016) obtiveram contagens de *S. aureus* superior ao previsto em legislação em 34,4% das 32 amostras de queijos artesanais, adquiridos em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras.

De acordo com Pontarolo et al. (2017), *S. aureus* é um dos patógenos mais comuns que infectam vacas leiteiras e um importante agente causador da mastite. Este micro-organismo é comumente isolado de leite cru e representa um risco potencial para a saúde pública devido à possibilidade da produção de toxina estafilocócica. *S. aureus* pode produzir toxina quando atinge 10^5 a 10^6 UFC/g. Portanto, o armazenamento de queijo em temperatura ambiente pode permitir a multiplicação de *S. aureus* até atingir concentrações de células suficientes para produzir toxinas estafilocócicas (Prates et al., 2017)..

7 CONCLUSÃO

Os resultados das análises microbiológicas deste estudo apontam que 4 amostras (1, 3, 4 e 6), 66,7%, excederam o limite da legislação brasileira para coliformes termotolerantes e, portanto, estavam impróprias para consumo, indicando provável contato direto ou indireto com matéria fecal. Ainda que não constatada a presença de *Salmonella* spp. todas as amostras apresentaram valores para coliformes totais acima do preconizado.

As amostras 1 e 3 apresentaram elevadas contagens de *S. aureus*, as quais podem ser relacionadas a matéria prima não tratada termicamente e práticas de higiene inadequadas, somados a esses, os resultados encontrados em nosso estudo revelaram que os queijos enumerados 1, 4 e 6 tinham contagens elevadas de bactérias mesófilas, resultado associado às elevadas temperaturas de armazenamento do produto. Portanto, os achados sugerem uma baixa qualidade higiênicossanitária da matéria prima, fabricação e controle de temperatura de armazenamento dos queijos analisados.

Visto que a presença de tais agentes patogênicos pode representar risco à saúde pública, há questionamentos acerca do controle e regulamentação de alimentos de produção artesanal, o que salienta a necessidade de implementação e aplicação de boas práticas de fabricação e inspeção sanitária de órgão regulatório do alimento produzido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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: 19/03/2021

ABIQ (2016) Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Disponível em: <[https://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/#:~:text=A%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20brasileiras%20ainda%20s%C3%3o,%25\)%20e%20Taiwan%20\(12%25](https://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/#:~:text=A%20exporta%C3%A7%C3%B5es%20brasileiras%20ainda%20s%C3%3o,%25)%20e%20Taiwan%20(12%25)>. Acesso em: 19/03/2021

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

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.

BEZERRA, L. D. E. et al. Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa - Paraíba. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 1, n. 37, p. 85, 2017.

BOMFIM, A. P. et al. Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos Coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 27, p. 1-10, 2020.

BRASIL. (2021) Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Brasília, DF, 2021. Disponível em: <<https://antigo.saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos#:~:text=Doen%C3%A7as%20transmitidas%20por%20alimentos>>

%20(DTA,toxinas%2C%20v%C3%ADrus%20e%20outros%20parasitas.> Acesso em: 22 mar 2021.

BRASIL. (2019) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução normativa n° 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. (2002) Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n.º 275 de 21 de Outubro de 2002, **Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos.** Brasília, DF, 2002.

BRASIL. (2001) Instrução Normativa no 30 de 26 de junho de 2001 do Departamento de Inspeção de produtos de origem animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **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. (1997) Ministério da Saúde. Portaria n° 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 30 jul. 1997.

BRASIL. (1996) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 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.

BORGES, M. F. et al. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 26, n. 1, 2008.

CHEUNG, P-Y.; KAM, K. M. *Salmonella* in food surveillance: PCR, immunoassays, and other rapid detection and quantification methods. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 802-808, 2012.

CREMONESI, P. et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p.586-591, 2007.

DE CASTRO, L. M. E. et al. Aspectos do queijo de coalho com ênfase na importância das Boas Práticas de Fabricação no sistema de produção. **Brazilian Journal of Development**, n. 1, p. 67–93, 2019.

ECKERT, R. G.; WEBBER, M. Controle de qualidade microbiológico de queijos maturados comercializados na feira do pequeno produtor da cidade de Cascavel-PR. **Revista Higiene Alimentar**, v. 30, n. 252/253, p. 80–85, 2016.

GANDRA, E. Á. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 30, n. 1, p. 109–118, 2008.

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

KAMIMURA, B. A. et al. Brazilian Artisanal Cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2019a.

KAMIMURA, B. A. et al. Large-scale mapping of microbial diversity in artisanal Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 80, n. p. 40–49, 2019b.

MEDEIROS, R. S. et al. Identificación de bacterias lácticas aislado de queso Coalho artesanal producidos en el Nordeste Brasileño. **CYTA - Journal of Food**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 613–620, 2016.

MOURA, M.S. et al. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p. 1367-1375, 2014.

NASSU, R. T, et al. **Queijo de coalho**. Embrapa Informação Tecnológica; Brasília, 2006.

NCBI. "Inva Type III Secretion System Export Apparatus Protein Inva [Salmonella Bongori] - Gene - NCBI". **Ncbi.Nlm.Nih.Gov**. Disponível em:
< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/61369727> >. Acesso em: Março de 2021.

NGUYEN, T. T.; VAN GIAU, V.; VO, T. K. Multiplex PCR for simultaneous identification of *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in food. **3 Biotech**, v. 6, n. 205, p. 1-9, 2016.

OLIVEIRA, K. A. et al. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

PINEDA, A. P. A. et al. Overview on diversity and microbiological safety of Brazilian artisanal cheeses. **Preprints**, v. 1, n. p. 1–24, 2020.

PONTAROLO, G. H. et al. Quality and safety of artisan cheese produced in the serrana region of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 739-748, 2017.

PRATES, D. F. et al. Microbiological quality and safety assessment in the production of moderate and high humidity cheeses. **Ciência Rural**, v. 47, n. 11, p. 9–14, 2017.

RODRIGUES, et al. Escherichia coli O 157 em queijo. **Jornal Africano de Pesquisa Agrícola**, v. 11, n. 5, pág. 407-415, 2016.

SANTANA, R. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p.1517-1522, 2008.

SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2020

SEBRAE. National cheeses: Market researches. **Sebrae**, [s. l.], p. 34, 2008.

SILVA, L. F. B.; BORTOLUCI, F.; VIVAN, A. C. P. Análise microbiológica de queijos tipo Minas frescal oriundos de diferentes formas de produção **Revista Salusvita**, v. 38, n. 2, p. 329–343, 2019.

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.

SOLÓRZANO, J. V. S. et al. La implementación de procedimientos estandarizados en la prevención de enfermedades transmitidas por los alimentos. Conteo microbiológico del *Staphylococcus aureus* en quesos frescos. **Revista Médica Eletrônica**, v. 40, n. 2, p. 371-382, 2018.

SOUSA, A. Z. B. et al. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 1, p. 30–35, 2014.

USDA (2020) United States Department of Agriculture. Brazil: Dairy and Products Annual | USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/data/brazil-dairy-and-products-annual-7>>. Acesso em: Abril de 2021.

TORRES, A. R. S. et al. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos coalho e manteiga comercializados fatiados no comércio varejista de Arapiraca – AL. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, e26410111775, 2021.

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.

ZHAO, X. et al. Research advance in rapid detection of foodborne *Staphylococcus aureus*. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 5, p. 827-833, 2016.

ANEXO

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

Tubos positivos			NMP/ g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	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	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

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