

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Departamento de Nutrição**

**Faculdade de Nutrição**



**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Elaboração e caracterização físico-química e microbiológica de queijos  
artesanais de leite cru e pasteurizado**

**Luiz Hermes da Silva Junior**

Pelotas, 2017

Luiz Hermes da Silva Junior

**Elaboração e caracterização físico-química e microbiológica de queijos artesanais de leite cru e pasteurizado**

Trabalho de Conclusão apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito a aquisição do título de Bacharel em Nutrição.

Data da Defesa:

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Elvira Ferrazza Nardes (Orientador). Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Viçosa

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenice Gonzalez de Lima (Coorientadora). Doutora em Zootecnia pela Universidade Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Leila Fagundes Conter. Mestre Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Rezende Pinto. Doutora em Medicina Veterinária Preventiva pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S111e Silva Junior, Luiz Hermes da

Elaboração e caracterização físico-química e microbiológica de queijos artesanais de leite cru e pasteurizado / Luiz Hermes da Silva Junior ; Rosane Elvira Ferraza Nardes, orientadora ; Helenice Gonzalez de Lima, coorientadora. — Pelotas, 2017.

47 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) — Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Queijo minas frescal. 2. Queijo artesanal. 3. Contaminação. 4. Microbiológica. 5. Composição centesimal. I. Nardes, Rosane Elvira Ferraza, orient. II. Lima, Helenice Gonzales de, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

## RESUMO

JUNIOR, Luiz Hermes da Silva. LIMA, Helenice Gonzalez de. NARDES, Rosane Elmira Ferrazza. **Elaboração e caracterização físico-químicas e microbiológicas de queijos artesanais de leite cru e pasteurizado.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

O queijo Minas Frescal pode ser elaborado de maneira industrial ou artesanal e constitui-se como parte da cultura alimentar de todo país. O queijo de origem artesanal geralmente é feito de leite cru e pouco se observa as condições de higiênicas sanitárias necessárias na hora do processamento, o que pode ocasionar maior contaminação. O objetivo desse trabalho foi elaborar dois queijos Minas Frescal um com leite cru e outro de leite pasteurizado caracterizando-os através de análises físico-químicas e microbiológicas. O leite e os queijos foram obtidos respectivamente da ordenha e elaborados no Núcleo Tecnológico do Leite (NTL) e do Centro Agropecuário da Palma (CAP) da Universidade Federal de Pelotas. As análises centesimais ocorreram no primeiro dia após a produção e nos dias 1, 15 e 30 foram realizadas as microbiológicas: contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e ainda, pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* e contagem de *Lactobacillus* spp. Os dados obtidos para análises físico-químicas encontraram-se dentro dos valores fixados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos estabelecidos pela portaria 146/96 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém os queijos enquadraram-se como magros, e os dados para coliformes totais e termotolerantes foram de  $> 1,1 \times 10^4$  MNP/g e  $4,6 \times 10^2$  MNP/g respectivamente, quando se analisou os queijos no dia 1. O primeiro valor oriundo do queijo de leite cru e o segundo para queijo de leite pasteurizado estando, portanto, o primeiro fora dos limites e o segundo dentro dos limites estabelecidos pela legislação para queijos conforme regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nos 30 dias houveram um decréscimo na contagem de coliformes totais e termotolerantes para queijos de leite cru, isso se deve-se a diminuição do pH ficando o meio desfavorável para crescimento das mesmas provavelmente pela presença dos *Lactobacillus* spp. presentes no queijo. Para a pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* houve ausência em ambos os queijos analisados demonstrando estar de acordo com a legislação vigente. Assim, esse estudo indica a importância do tratamento térmico do leite para queijos artesanais.

**Palavras-chave:** queijo Minas Frescal, queijo artesanal, contaminação, microbiologia, composição centesimal.

## ABSTRACT

JUNIOR, Luiz Hermes da Silva. LIMA, Helenice Gonzalez de. NARDES, Rosane Elvira Ferrazza. **Elaboration and physical-chemical and microbiological characterization of artisanal cheeses of raw and pasteurized milk.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) – Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The Minas Frescal cheese can be processed in an industrial or artisanal way and is part of the food culture of the whole country. The artisanal cheese is usually made from raw milk and the hygienic sanitary conditions necessary at the time of processing are not observed, which can lead to greater contamination. The objective of this study was to prepare two Minas Frescal cheeses, one with raw milk and the other with pasteurized milk, characterized by physical-chemical and microbiological analyzes. Milk and cheeses were obtained from the milking and elaborated at the Milk Technological Center (MTC) and at the Agricultural and Livestock Center of Palma (ALCP) of the Federal University of Pelotas. The centesimal analyzes occurred on the first day after production and on days 1, 15 and 30 the microbiological tests were performed: total coliforms counts, thermotolerant coliforms and *Staphylococcus* coagulase positive, and *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus* spp. The results obtained for physico-chemical analyzes were within the values established by the Technical Regulation on Identity and Quality of Cheeses established by Administrative Rule 146/96 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MALFS) and data for total and thermotolerant coliforms were Of  $>1.1 \times 10^4$  MNP/g and  $4.6 \times 10^2$  MNP/g respectively, when the cheeses were analyzed on day 1. The first value came from raw milk cheese and the second from pasteurized cheese was therefore the first outside the limits and the second within the limits established by the legislation for cheeses according to regulation of the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA). In the 30 days there was a decrease in the total and thermotolerant coliform counts for cheeses of raw milk, this is due to the decrease of pH being the medium unfavorable for growth of the same probably by the presence of *Lactobacillus* ssp. on cheese. For the research of *Salmonella* ssp. and *Listeria monocytogenes* there was absence in both cheeses analyzed proving to be in accordance with the current legislation. Thus, this study indicates the importance of the thermal treatment of milk for artisanal cheeses.

**Keywords:** Minas Frescal cheese, artisanal cheese, contamination, microbiology, centesimal composition.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 Objetivos gerais.....	7
2.2. Objetivos específicos.....	7
<b>3. Hipótese.....</b>	<b>8</b>
<b>4. Projeto de pesquisa.....</b>	<b>9</b>
<b>5. Relatório do trabalho de campo.....</b>	<b>20</b>
<b>6. Artigo 1.....</b>	<b>21</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico de elevado valor nutricional para as espécies mamíferas. Ao ser extraído da glândula mamária de animais sadios<sup>1</sup>. O leite e o queijo, permitiram que as populações sobrevivessem, superando períodos da história da humanidade de extrema escassez de alimentos<sup>2</sup>, nutricionalmente o queijo preserva grande fonte de proteínas de alta qualidade, com alto percentual de gordura, cálcio, fósforo e vitamina A<sup>3</sup>. Dentre os derivados do leite o queijo é o campeão de consumo no Brasil, sendo produzidos tanto em grande escala, na forma industrializada quanto artesanalmente, em muitas vezes se difere por ser elaborados com leite cru.<sup>4</sup>

O consumo de queijos nacionais no Brasil é principalmente de queijos frescos, comuns padronizados, com pouco tempo de maturação, tendo um de seus principais representantes o queijo Minas Frescal.<sup>10,11</sup>

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, entende-se por “Queijo Minas Frescal”, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas”,<sup>5</sup>

Por ser de fabricação simples e de baixo custo, o queijo Minas Frescal representa a maioria dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias, sendo armazenados em sacos plásticos comuns, amarrados ou fechados com um fecho metálico, sem usar vácuo, por este produto apresentar elevado rendimento na fabricação, é comercializado a preço acessível a uma grande faixa da população<sup>6,7,8</sup>. Este tipo de queijo é caracterizado pelo alto teor de umidade, massa branca, consistência mole, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, sabor suave a levemente ácido. Tem elevado valor nutritivo com grande concentração de proteínas, sais minerais e vitaminas além de ser rico em fósforo e cálcio<sup>9</sup>.

A legislação brasileira é clara na exigência da utilização de leite pasteurizado no seu preparo, apesar de que é com frequência a comercialização desses queijos fora das especificações estabelecidas<sup>12</sup>. Quando este produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não

treinadas, pode ocorrer a contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou re-contaminação do produto. Além disso, por não ser maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado<sup>13</sup>.

A ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode trazer graves consequências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública

Os grupos de coliformes totais e fecais que colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os humanos, e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos<sup>14</sup>. Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes em geral, a *Escherichia coli* e os *Estafilococcus*, têm merecido maior consideração<sup>15</sup>. De acordo com ANDREWS *et al.* a despeito dos coliformes serem ou não inadequados indicadores da segurança microbiológica da água e alimentos, os membros desse grupo continuam sendo usados internacionalmente para esse fim.<sup>16</sup>

Diante disto, este estudo tem como objetivo analisar as diferenças microbiológicas e físico-químicas de queijos elaborados artesanalmente a partir de leite cru e pasteurizado

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral.**

Caracterizar queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente a partir de leite cru e leite pasteurizado.

### **2.2 Objetivos Específicos.**

Elaboração de queijos Minas Frescal de leite cru e de leite pasteurizado



Avaliar pelos parâmetros físico-químicos (composição centesimal) e microbiológicos: averiguação das condições higiênicas sanitárias.

### **3 HIPÓTESE**

Estabelecer a importância da pasteurização do leite na elaboração de queijos artesanais, garantindo ao consumidor um produto qualidade.

#### **4 PROJETO DE PESQUISA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Nutrição**



**PROJETO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**Caracterização físico-química e microbiológica de queijos artesanais de  
leite cru e pasteurizado**

Luiz Hermes da Silva Junior

Pelotas, 2017

Luiz Hermes da Silva Junior

**Caracterização físico-química e microbiológica de queijos artesanais de  
leite cru e pasteurizado**

Trabalho de Conclusão  
apresentado ao Curso de Nutrição  
da Universidade Federal de  
Pelotas, como requisito parcial a  
aquisição do título de Bacharel em  
Nutrição.

**Orientadora: Rosane Elvira Ferrazza Nardes**

**Orientadora: Helenice Gonzalez de Lima**

Pelotas, 2017

## 1 INTRODUÇÃO

O leite é um fluido biológico de elevado valor nutricional para as espécies mamíferas. Ao ser extraído da glândula mamária de animais sadios<sup>1</sup>. O leite e o queijo, permitiram que as populações sobrevivessem, superando períodos da história da humanidade de extrema escassez de alimentos<sup>2</sup>, nutricionalmente o queijo preserva grande fonte de proteínas de alta qualidade, com alto percentual de gordura, cálcio, fósforo e vitamina A<sup>3</sup>. Dentre os derivados do leite o queijo é o campeão de consumo no Brasil, sendo produzidos tanto em grande escala, na forma industrializada quanto artesanalmente, em muitas vezes se difere por ser elaborados com leite cru.<sup>4</sup>

O consumo de queijos nacionais no Brasil é principalmente de queijos frescos, comuns padronizados, com pouco tempo de maturação, tendo um de seus principais representantes o queijo Minas Frescal<sup>10,11</sup>.

Segundo o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, entende-se por “Queijo Minas Frescal”, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas<sup>5</sup>.

Por ser de fabricação simples e de baixo custo, o queijo Minas Frescal representa a maioria dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias, sendo armazenados em sacos plásticos comuns, amarrados ou fechados com um fecho metálico, sem usar vácuo, por este produto apresentar elevado rendimento na fabricação, é comercializado a preço acessível a uma grande faixa da população<sup>6,7,8</sup>. Este tipo de queijo é caracterizado pelo alto teor de umidade, massa branca, consistência mole, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, sabor suave a levemente ácido. Tem elevado valor nutritivo com grande concentração de proteínas, sais minerais e vitaminas além de ser rico em fósforo e cálcio<sup>9</sup>.

A legislação brasileira é clara na exigência da utilização de leite pasteurizado no seu preparo, apesar de que é com frequência a comercialização desses queijos fora das especificações estabelecidas<sup>12</sup>. Quando este produto é fabricado de forma artesanal, por pessoas não treinadas, pode ocorrer a

contaminação por diversos microrganismos, comprometendo tanto a sua qualidade como a segurança da saúde do consumidor. Por este motivo, as práticas higiênicas devem ser observadas com rigor, para prevenir uma possível contaminação ou re-contaminação do produto. Além disso, por não ser maturado, é um produto perecível, devendo ser consumido rapidamente após curta estocagem em ambiente refrigerado<sup>13</sup>.

A ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode trazer graves consequências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública

Os grupos de coliformes totais e fecais que colonizam o trato intestinal de animais de sangue quente, incluindo os humanos, e têm sido empregados como indicadores de qualidade higiênica por muitos anos<sup>14</sup>. Apesar das controvérsias com relação aos microrganismos mais representativos da qualidade sanitária de um produto alimentício, os coliformes em geral, a *Escherichia coli* e os *Estafilococcus*, têm merecido maior consideração<sup>15</sup>. De acordo com ANDREWS *et al.* a despeito dos coliformes serem ou não inadequados indicadores da segurança microbiológica da água e alimentos, os membros desse grupo continuam sendo usados internacionalmente para esse fim.<sup>16</sup>

Diante disto, este estudo tem como objetivo analisar as diferenças microbiológicas e físico-químicas de queijos elaborados artesanalmente a partir de leite cru e pasteurizado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral.**

Caracterizar queijos produzidos artesanalmente a partir de leite cru e leite pasteurizado.

### **2.2 Objetivos Específicos.**

Elaborar queijo Minas Frescal de leite cru;

Elaborar queijo Minas Frescal de leite pasteurizado;  
Realizar análises físico-químicas nos queijos cru e pasteurizado;  
Realizar análise microbiológica nos queijos cru e pasteurizado.

### **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Com o objetivo de aumentar os conhecimentos sobre o assunto em pesquisa (Queijo Minas Frescal) procurou-se vários artigos sobre incluindo os de análises físico-químicas e microbiológicas com buscas em bases de dados como Google acadêmico, legislação (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e outras específicas para queijos Minas Frescal) e biblioteca virtual.

Foram utilizados os seguintes termos de busca:

Queijo Minas Frescal  
Elaboração de queijo artesanal  
Análise microbiológica  
Análise físico-química

### **4 MATERIAS E MÉTODOS**

#### **4.1 A obtenção do leite para a elaboração do queijo**

O leite será obtido através de ordenha mecânica do Centro Agropecuário da Palma (CAP), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Alguns litros de leite integral, 6 litros, serão transportados em condições assépticas para o Laboratório do Núcleo Tecnológico do Leite (NTL) do CAP. Em seguida, serão separados 3 litros de leite em recipientes diferentes para elaboração posterior dos queijos. Sendo que 3 litros permaneceram como leite cru e 3 litros foram pasteurizados por pasteurização lenta em recipiente adequado com temperatura de 62° a 65°C por 30 minutos.

#### **4.2. Elaboração dos queijos artesanais**

A partir dos três litros de leite cru em recipiente adequado será elaborado o queijo artesanal de leite cru, aquecido a 37°C e acrescentado coalho enzimático na proporção adequada do rótulo que foi de 0,9 ml/L, fará aproximadamente uma homogeneização por 3 minutos tanto para o leite cru como o coalho. Será colocado em uma estufa a 37°C por 40 a 50 minutos até o ponto de corte da coalhada depois de transcorrido o tempo, onde cortará a coalhada em cubos, mexeu-se lentamente e manteve-se a mesma temperatura de 37°C por 50 minutos, até que os grãos pudessem ser enformados.

O queijo artesanal será feito em recipiente adequado com leite elaborado por pasteurização lenta, aquecido a 37°C por 40 a 50 minutos até o ponto de corte da coalhada. Depois de transcorrido o tempo corta-se a coalhada em cubos de 2-3 cm<sup>3</sup>, próprio para elaboração de queijo Minas Frescal, mexendo lentamente e mantendo a mesma temperatura de 37°C por 50 minutos até o ponto adequado para enformagem na forma apropriada e obtendo-se o queijo mantendo-o a temperatura de 5 a 7°C.

#### 4.3. Análises Físico-Químicas dos Queijos

As amostras dos queijos Minas frescal de leite cru e de leite pasteurizado deverão ser transportadas em condições assépticas até o Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da UFPel, onde realizará as análises físico-químicas da composição centesimal através da metodologia do Instituto Adolfo Lutz. Conforme descritos a seguir:

**Determinação de gorduras:** extrator tipo Soxhlet / éter de petróleo.

**Determinação de umidade:** secagem direta, estufa a 105 °C./6 horas até peso constante.

**Determinação de cinzas:** carbonizadas e incineradas em mufla a 550°C/ 6 horas, cinzas brancas e peso constante.

**Análise de proteína:** determinação da quantidade de nitrogênio proteico pelo método de Kjeldahl, utilizando para o cálculo das proteínas o fator de correção de 6,25.

**Determinação de carboidratos:** por diferença das análises centesimais. Utilizado a equação a seguir:

$\text{Carboidrato} = 100 - (\text{proteína} + \text{gordura} + \text{umidade} + \text{cinzas})$
--

#### 4.4 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas serão realizadas usando as técnicas propostas pela APHA<sup>15</sup>. As diluições e semeaduras ocorrerão de forma asséptica a fim de evitar contaminações e, portanto, alterar o resultado na análise.

As diluições são necessárias para a possível contagem por técnica visual, foram feitas de forma seriadas da forma pura, uma vez que a semeadura direta pode resultar em um número muito alto de colônias, não permitindo separar uma colônia da outra durante o processo de contagem.

As diluições seriadas deverão ser feitas utilizando 25 gramas da amostra de queijo em 225 mL da solução diluente estéril (solução salina peptonada 0,1%). Colocando em Stomacher por 60 segundos. Considera-se a amostra pura como  $10^0$ . Retirando 1 mL dessa diluição resultando assim em uma diluição  $10^{-1}$ . Inoculando 1 mL da diluição em 9 mL de solução diluente, foi obtida a diluída  $10^{-2}$ , repetindo esse processo por mais uma vez para obtenção da diluição  $10^{-3}$ . De acordo com a metodologia de TIMM et. al.

##### 4.4.1 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

A técnica utilizada foi a do número mais provável (NMP) é um método estatístico que estima o número mais provável de bactérias presentes no alimento. É necessária uma etapa presuntiva a fim de favorecer a multiplicação de coliformes injuriados e uma etapa seletiva para diferenciar coliformes totais e termotolerantes. As contagens finais são obtidas com uso de uma tabela de correspondência estatística, tabela em anexo.

A etapa presuntiva refere-se a contagem de coliformes pelo método NMP que foi utilizado o caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSB, *Lauryl Sulfate Broth*), em tubos de ensaio na presença de tubos de Durham invertidos, permitindo que os coliformes utilizem a lactose e formem gás que aparecerá dentro dos pequenos tubos. O tubo será considerado positivo presuntivamente



quando os Durhan apresentarem gás em pelo menos 10% de seu interior. A etapa seletiva foi realizada separadamente para coliformes totais e termotolerantes, os tubos considerados positivos na etapa presuntiva (NMP), foram replicados para o caldo Verde Brilhante (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC), o VB será incubado a 37°C por 48 horas. A leitura realizará observando-se a presença de gás e considerando a positividade dos tubos, os resultados foram levados a uma tabela de número mais provável. O resultado estará expresso em NMP/g.

#### 4.4.2 Pesquisa de *Salmonella* spp

Serão pesados e homogeneizados 25 g da amostra e misturada em 225 mL de Água Peptonada Tamponada incubado a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 16 a 20 horas. Este meio não seletivo possui peptona, cloreto de sódio e fosfato dissódico e monopotássico, o que favorece a recuperação de células bacterianas injuriadas e a sua multiplicação. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo, sendo transferida uma alíquota de 1 mL para um tubo de ensaio, contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e 0,1 mL contendo 10 mL de caldo tetracionato, incubados em banho maria a  $42^\circ\text{C}$ , por 24 horas. A partir do crescimento no meio de enriquecimento seletivo, alíquotas do inóculo foram semeadas em placas contendo ágar verde-brilhante vermelho-de-fenol-lactose-sacarose e em ágar XLD e incubados a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas.

No enriquecimento seletivo foi aplicado 2 tipos de caldo, o RV tem presente verde malaquita e de cloreto de magnésio que atuaram como, agentes seletivos, enquanto a presença de triptona, cloreto de sódio e fosfato monopotássio favorecem e estimulam a multiplicação de *Salmonella*. Já no caldo TT, a seletividade é pelo verde brilhante, pelos sais biliares e pelo iodeto de potássio, e o favorecimento da *Salmonella* pela polipeptona, carbonato de cálcio e tiosulfato de sódio.

O isolamento é baseado em colônias típicas de salmonelas, utilizasse duas placas com semeadura em meio XLD e outra de BPLS. Em ambos os meios de cultura o reagente de cor é o vermelho de fenol e a semeadura é feita por esgotamento na superfície das placas com incubação em estufa a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após a incubação verificou-se se houve

crescimento de colônias com aspecto compatível com *Salmonella*. No XLD são observados em colônias rosas algumas colônias se apresentam enegrecidas. No BPLS as colônias são incolores ou rosadas entre translúcida a ligeiramente opacas ágar e ainda pode apresentar colônias com coloração verde/amarelada. As colônias isoladas não eram caracterizadas de *Salmonella*.

#### 4.4.3 Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*

Após ter feito as devidas diluições do queijo em Solução Salina, inoculou-se 0,3 e 0,4 mL em três placas com meio ágar Baird-Parker, com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo hochey, espalhando o inoculo por toda superfície do meio até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 30 a 48 horas, havendo o crescimento de *Staphylococcus*, a característica esperada será de colônias negras rodeadas ou não por alo de opacidade e alo branco.

A leitura foi realizada em placas de 20 a 200 colônias, selecionou-se 3 colônias características de colônias típicas e atípicas de cada placa e inoculou-se em caldo de crescimento BHI (Brain Heart Infusion). Os tubos foram incubados de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os tubos com turvamento foram utilizados para a realização da prova da coagulase, utilizando plasma de coelho  $36 \pm$  por 6 horas, no decorrer do tempo, a presença de coágulos deve ser verificada periodicamente pois o coágulo poderá ser desfeito devido a presença de outra enzima produzida por SCP, estafiloquinase. Com o resultado do teste da coagulase foi feito uma regra de três, e obtidas as contagens.

#### 4.4.4 Pesquisa de *Listeria monocytogenes*.

Primeiramente realizará o enriquecimento seletivo primário pesados assepticamente 25 g da amostra e acrescentados 225/mL de caldo (UVM, Modified Listeria Enrichment Broth). Em seguida, homogeneizados em stomacher por 60 segundos e incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Posteriormente prepara-se o enriquecimento seletivo secundário, obtendo-se 0,1 mL da cultura do caldo UVM e transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser incubando a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24 a 48 horas, após incubação o caldo passa da coloração amarelada para marrom escura. A partir

deste caldo foi feito o isolamento onde uma alíquota foi replicada para placas de ágar Oxford e de ágar Palcam, utilizando a semeadura de esgotamento, de forma a proporcionar a obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. Se houve presença de *Listeria ssp.* no ágar Palcam aparecerá colônias verdes–amareladas ou verdes-acinzentadas, rodeadas por zonas escuras. No ágar Oxford as colônias de *Listeria ssp.* apresentam se pretas rodeadas halo negro ou escuro a confirmação da *Listeria ssp.* é feita pela prova da catalase onde se coloca em uma placa de petry uma lamina de vidro, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% misturado a uma colônia captada com ajuda da alça de platina a presença de bolhas de oxigênio é catalase positiva indicando a presença de *Listeria*.

Nas amostras testadas não houve o crescimento de colônias características, sendo interrompida análise.

#### 4.4.5 Contagem de Lactobacilos

A contagem de Lactobacilos será realizada em ágar rogosa (Oxoid) conforme metodologia preconizada por Rogosa et al. Colocando 1 mL de cada diluição nas respectivas placas de Petri e acrescentado o meio, homogeneizado. Após solidificação do meio, será colocado uma cobertura de ágar para favorecer o crescimento dos lactobacilos (microaerófilos). Este meio deve ser incubado a  $30^\circ\text{C}$  por cinco dias.

## 5 REFERÊNCIAS

01. REINBOLD, G.W. Indicator organisms in dairy products. Food Technology, v.37,n.6, p.111-3, 1983
02. Kosikowski F. Cheese and Fermented Milk Foods, Ed. 2 Michigan: Edwads Brothers, Inc. 700p.1982
03. Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; Muller, M.T.; Silveira, K.C.S.; Almeida, T.N.; Medeiro, C.F. Avaliação Microbiológica de Queijo tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Higiene Alimentar, v.16, n 101, p. 32-36, 2002.

04. FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.162-165, 2003. Suplemento
05. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de março de 2004
06. HOFFMAN, F.L.; CRUZ, C.H.G.; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica de queijos comercializados na região de São José do Rio Preto-SP. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.50, p.42-47, 1995
07. SENA, M.J.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; MORAIS, C.F.A.; CORRÊA, E.S.; SOUZA, M.R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife-PE. *Higiene Alimentar*, v.14, n.74, p.41-44, 2000
08. BARROS, P.C.O.G.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, E.M.; CHIAPPINI, C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.32-37, Julho, 2004.
09. TRONCO, Vânia Maria. Aproveitamento do leite: Elaboração de seus derivados na propriedade rural. Guaíba: Ed. Agropecuária, 1996
10. REZENDE, D. C. de. **Estratégia de coordenação e qualidade na cadeia dos queijos finos**. 2004. 181 p. Tese (Doutorado em: Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade)-Instituto VELEN de Ciências Humanas e Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004
11. VIVAN, A. M.; AVILA, M. L. O mercado de queijos finos no Brasil e sua relação com o comportamento estrategista das agroindústrias oligopolistas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília, v. 37, n. . abr./jun.,1999.
12. PEREIRA, M.L., LARA, M.A., DIAS, R.S. et al. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo "tipo Minas". *Rev Microbiol*, São Paulo, v.22, p.349-350, 1991.

13. SILVA, C.A.M., LEITÃO, M.F. de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo de vida útil de queijo tipo "Minas Frescal". In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. **Programa Oficial, Resumos...** Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p.186.
14. CALCI, K.R., BURKHARDT III, W., WATKINS, W.D. et al. Occurrence of male-specific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human-associated waste waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.12, p.5027-5029, dec, 1998.
15. SHARF, J.M. Exame microbiológico de alimentos. São Paulo : Polígono, 1972. Cap.16: Índices de sanidade: p.173-186.
16. ANDREWS, W.H., DURAN, A.P., McCLURE, F.D. *et al.* Use of two rapid A-1 methods for the recovery of fecal coliforms and *Escherichia coli* from selected food types. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.1, p.289-293, 1979.

## **5 RELATÓRIO DE CAMPO**

O trabalho realizado neste estudo inicialmente apresentou algumas dificuldades, as quais não estavam previstas como a mufla do Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal de Pelotas que estava danificada, sendo realizada em outro local. Todas as atividades previstas foram realizadas como preconizadas. Através desse estudo adquiriu-se o conhecimento sobre diversas técnicas microbiológicas específicas para queijos, sendo pouco desenvolvidas durante a graduação em Nutrição. Ressalto que foi de suma importância toda a experiência adquirida no decorrer do Trabalho de Conclusão de Curso.

## 6 ARTIGO

Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista de Nutrição.

## RESUMO

### Objetivos

Caracterizar queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente a partir de leite cru e leite pasteurizado nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

### Métodos

Foram separados três litros de leite em recipientes diferentes para elaboração posterior dos queijos, após a ordenha mecânica. Sendo que três litros permaneceram como leite cru e três litros foram pasteurizados por pasteurização lenta de forma artesanal. As análises centesimais ocorreram no primeiro dia após a produção e nos dias 1, 15 e 30 foram realizadas as microbiológicas: contagem de coliformes totais, coliformes termotolerantes e contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e ainda, pesquisa de *Salmonella* spp. e de *Listeria monocytogenes* e contagem de *Lactobacillus* spp.

### Resultados

Os dados obtidos para análises físico-químicas encontraram-se dentro dos valores fixados pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos estabelecidos pela portaria 146/96 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), porém os queijos enquadraram-se como magros. Perante os dados para coliformes totais e termotolerantes, o queijo de leite cru enquadra-se fora dos limites estabelecidos pela legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nos 30 dias houveram um decréscimo na contagem de coliformes totais e termotolerantes para queijos de leite cru, isso se deve-se provavelmente pela presença dos *Lactobacillus* ssp. presentes no queijo. Para a pesquisa de *Salmonella* ssp. e *Listeria monocytogenes* houve ausência em ambos os queijos analisados demonstrando estar de acordo com a legislação vigente.

### Conclusão

Assim, esse estudo indica a importância do tratamento térmico do leite para queijos artesanais para aquisição de produtos sem riscos à saúde do consumidor.

**Palavras-chave:** queijo Minas Frescal, queijo artesanal, contaminação, microbiologia, composição centesimal.



## INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados merecem grande destaque na mesa da população brasileira por fazerem parte do grupo de alimentos de grande valor nutricional, uma vez que são fontes consideráveis de proteínas de alto valor biológico e gorduras, além de conterem vitaminas e sais minerais<sup>1</sup>. Conforme estudos da Food and Agriculture Organization (FAO)<sup>2</sup>, o consumo habitual desses alimentos é recomendado por serem fontes de cálcio, fundamental na formação e na manutenção da estrutura óssea do organismo.

Existem três maneiras de o leite fluido chegar à mesa dos consumidores, industrializado esterilizado, pasteurizado e ainda de leite cru. A pasteurização pode ser rápida utilizando temperaturas entre 72°C e 75°C, por cerca de 15 a 20 segundos, e /ou pasteurização lenta 62 a 65°C por 30 minutos, esse tratamento térmico elimina os microrganismos patogênicos do leite, porém uma grande quantidade de saprofitos se mantém vivos<sup>3, 4</sup>.

Entre os derivados do leite, o queijo é o mais consumido no Brasil. A arte da fabricação de queijo teve início há milhares de anos, surgindo a partir da domesticação de animais produtores de leite<sup>5</sup>. O princípio básico da fabricação de queijo é comum a quase todos os tipos, mas existem muitas variações dependendo das raças produtoras de leite, tipo de fabricação e tempo de maturação<sup>4</sup>.

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos estabelecidos pela portaria 146/96 do (MAPA)<sup>6</sup>. “Entende-se por queijo, o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes”<sup>6</sup>.

O queijo Minas Frescal é tipicamente brasileiro, um dos mais consumidos no país. É um queijo com alto teor de umidade, consistência branda, macia, odor suave e característico, de excelente rendimento e

consumo rápido<sup>1</sup>. Esse queijo é obtido por coagulação enzimática ou ácida<sup>4</sup>. Seu custo é relativamente baixo o que faz com que a procura no mercado se torne viável ao consumidor. O mercado brasileiro apresenta queijos com qualidades definidas e existem os industrializados comuns, finos e os artesanais<sup>7</sup>.

Esses queijos artesanais também chamados coloniais surgiram como uma alternativa dos pequenos produtores para melhorar a renda familiar e como geralmente é feito de leite cru pode apresentar todo o tipo de bactérias inclusive as patogênicas<sup>8</sup>, por isso normas rigorosas de higiene e o acompanhamento da saúde dos animais, que dão origem a qualidade do leite, bem como as condições higiênicas sanitárias durante o processamento, devem ser adequadas e acompanhados até a refrigeração e comercialização<sup>9</sup> por isso. Criou-se a instrução normativa nº30/2013, para permitir que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto<sup>10</sup>.

O queijo Minas Frescal além de apresentar elevado teor de umidade e ser altamente perecível, passa por muita manipulação fornecendo condições mais propícias para a contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana. Muitas dessas bactérias podem ser patogênicas ou produzirem metabólitos microbianos e causarem intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos<sup>11</sup>.

A pasteurização aplicada ao leite cru antes de ser utilizado na produção do queijo diminui a população de microrganismos presentes, porém algumas toxinas não são inativadas, podendo causar intoxicações alimentares como gastroenterites, e tornar um problema de saúde pública. Os indicadores microbiológicos, comuns são os coliformes totais e coliformes termotolerantes.<sup>3,9,12</sup>. A contaminação microbiana de queijos merece destacada atenção ao considerar bactérias patogênicas como *Salmonella*, *Staphilococcus* e *L. monocytogenes* que são agentes causadores de enfermidades graves em homens e animais<sup>13</sup>.

Tendo em vista os diferentes fatores que podem levar à contaminação do queijo, especialmente do tipo Minas Frescal pode-se dizer que é de suma

importância à análise microbiológica desse alimento como forma de prevenir riscos que este pode representar para a saúde do consumidor. A composição centesimal que fornece as características físico-químicas do queijo aliadas a presença de microrganismos são fatores que indicam a qualidade ou as possíveis alterações do queijo<sup>11</sup>.

O presente estudo teve como objetivo comparar as características entre os queijos Minas Frescal elaborados com leite cru e leite pasteurizado, através de análises físico-químicas e microbiológicas, avaliando-se assim a qualidade higiênica sanitária dos queijos Minas Frescal produzidos artesanalmente.

## **METODOLOGIA**

### **A obtenção do leite para a elaboração do queijo**

O leite foi obtido através de ordenha mecânica das vacas do Centro Agropecuário da Palma (CAP), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Foram coletados seis litros de leite integral do tanque de leite em condições assépticas e levados até o laboratório do Núcleo Tecnológico do Leite (NTL) do CAP. A seguir foram separados três litros de leite em recipientes diferentes para elaboração posterior dos queijos. Sendo que três litros permaneceram como leite cru e três litros foram pasteurizados por pasteurização lenta em panela adequada com temperatura de 62° a 65°C por 30 minutos, de forma artesanal.

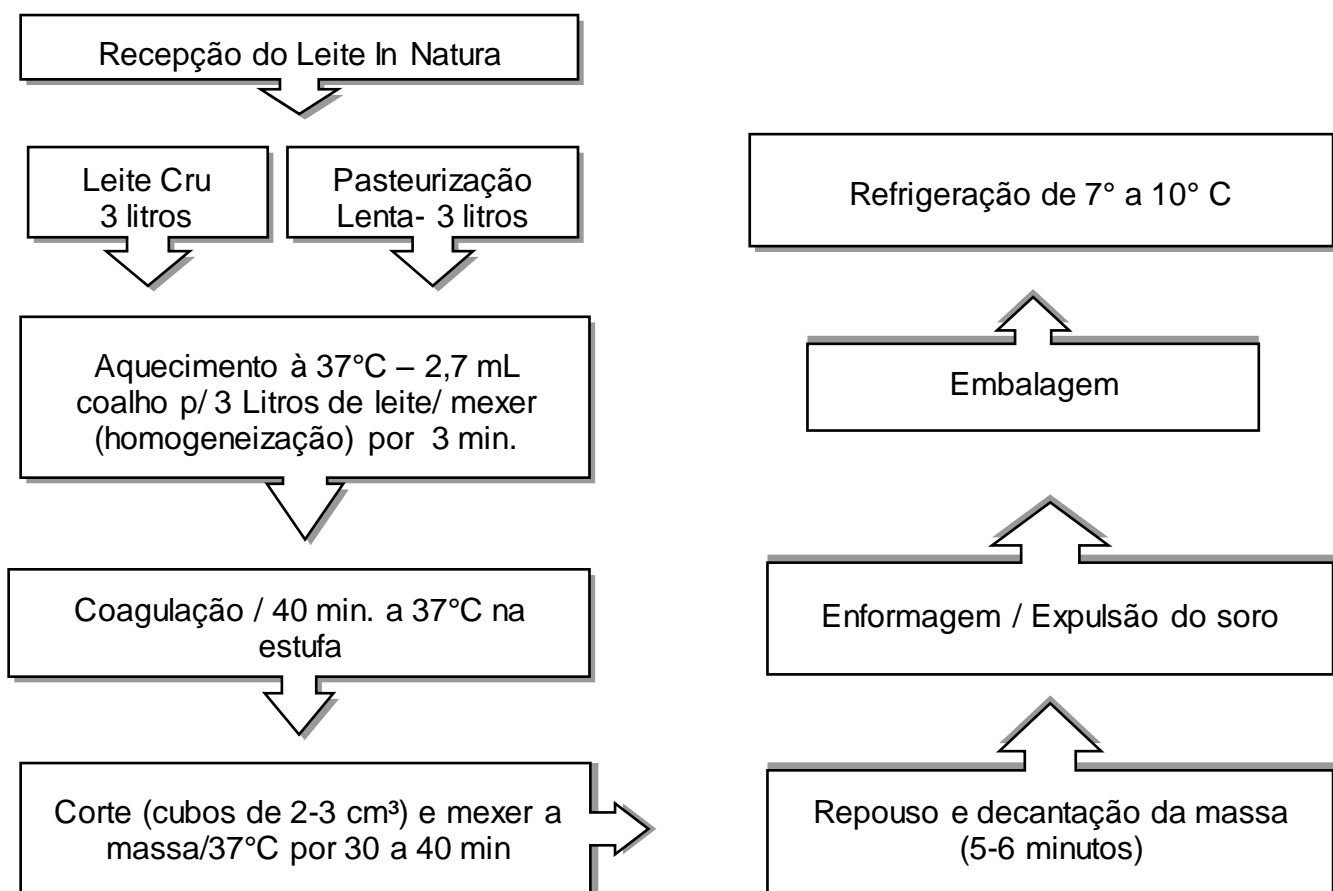
### **Elaboração dos queijos artesanais**

A partir dos três litros de leite cru em recipiente adequado foi elaborado o queijo artesanal de leite cru, aquecido a 37°C e acrescentado coalho enzimático na proporção adequada do rótulo que foi de 0,9 ml/L, mexeu-se por aproximadamente por três minutos para homogeneização do leite cru com o coalho. A seguir, colocou-se em uma estufa a 37°C por 40 a 50 minutos até o ponto de corte da coalhada depois de transcorrido o tempo, cortou-se a coalhada em cubos, mexeu-se lentamente e manteve-se a mesma temperatura de 37°C por 50 minutos, até que os grãos pudessem ser enformados.

O queijo artesanal de leite pasteurizado foi elaborado em recipiente

adequado a partir do leite pasteurizado, aquecido a 37°C por 40 a 50 minutos até o ponto de corte da coalhada. Depois de transcorrido o tempo cortou-se a coalhada em cubos de 2-3 cm<sup>3</sup>, próprio para elaboração de queijo Minas Frescal, mexeu se lentamente mantendo a mesma temperatura de 37°C por 50 minutos até o ponto adequado para enformagem. Colocou-se na forma apropriada e obteve se o queijo que se manteve a temperatura de 5 a 7°C, conforme o fluxograma abaixo<sup>4</sup>. A seguir foram realizadas as análises físico-químicas no dia 1 e microbiológicas nos quatro tempos.

Figura 1. Fluxograma da elaboração do soro do queijo.



### Análises físico-químicas dos queijos

Uma amostra de 80 gramas dos queijos Minas frescal de leite cru e de leite pasteurizado foram transportadas, após a aquisição, em condições assépticas e encaminhados para o Laboratório de Bromatologia da Faculdade

de Nutrição da UFPEl/Pelotas, seguindo a Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA ,onde foram realizadas as análises físico-químicas da composição centesimal através da metodologia do Instituto Adolfo Lutz<sup>14</sup>. Conforme descritos a seguir:

- Determinação de gorduras: extrator tipo Soxhlet / éter de petróleo;
- Determinação de umidade: secagem direta em estufa a 105 °C./6 horas até peso constante;
- Determinação de cinzas: carbonizadas e incineradas em mufla a 550°C/ 6 horas, cinzas brancas e peso constante;
- Análise de proteína: determinação da quantidade de nitrogênio protéico pelo método de Kjeldahl, utilizando para o cálculo das proteínas o fator de correção de 6,25;
- Determinação de carboidratos: por diferença das análises centesimais. Utilizado a equação a seguir:

$\text{Carboidrato} = 100 - (\text{proteína} + \text{gordura} + \text{umidade} + \text{cinzas})$
--

### **Análises microbiológicas**

O transporte e armazenamento das amostras seguiram os Padrões Microbiológicos para Alimentos da Resolução - RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata usando as técnicas propostas pela APHA<sup>15</sup>. As diluições e semeaduras foram de forma asséptica a fim de evitar contaminações e, portanto, alterar o resultado na análise.

As diluições são necessárias para a possível contagem por técnica visual, foram feitas de forma seriadas da forma pura, uma vez que a semeadura direta pode resultar em um número muito alto de colônias, não permitindo separar uma colônia da outra durante o processo de contagem.

As diluições seriadas foram feitas utilizando 25 gramas da amostra de queijo em 225 mL da solução diluente estéril (solução salina peptonada 0,1%). Colocando em Stomacher por 60 segundos. Considera-se a amostra pura como 10°. Retirando 1 mL dessa diluição resultando assim em uma diluição 10<sup>-1</sup>. Inoculando 1 mL da diluição em 9 mL de solução diluente, foi obtida a diluída

10<sup>-2</sup>, repetindo esse processo por mais uma vez para obtenção da diluição 10<sup>-3</sup> de acordo com a metodologia de TIMM et al. <sup>16</sup>.

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

A técnica utilizada foi a do número mais provável (NMP) é um método estatístico que estima o número mais provável de bactérias presentes no alimento. É necessária uma etapa presuntiva a fim de favorecer a multiplicação de coliformes injuriados e uma etapa seletiva para diferenciar coliformes totais e termotolerantes. As contagens finais são obtidas com uso de uma tabela de correspondência estatística, tabela em anexo.

A etapa presuntiva refere-se a contagem de coliformes pelo método NMP que foi utilizado o caldo Lauril Sulfato de Sódio (LSB, *Lauryl Sulfate Broth*), em tubos de ensaio na presença de tubos de Durham invertidos, permitindo que os coliformes utilizem a lactose e formem gás que aparecerá dentro dos pequenos tubos. O tubo será considerado positivo presuntivamente quando os Durham apresentarem gás em pelo menos 10% de seu interior. A etapa seletiva foi realizada separadamente para coliformes totais e termotolerantes, os tubos considerados positivos na etapa presuntiva (NMP), foram replicados para o caldo Verde Brilhante (VB) e caldo *Escherichia coli* (EC), o VB foi incubado a 37°C por 48 horas. A leitura foi realizada observando-se a presença de gás e considerando a positividade dos tubos, os resultados foram levados a uma tabela de número mais provável. O resultado foi expresso em NMP/g.

### **Pesquisa de *Salmonella* spp.**

Foram pesados e homogeneizados 25 g da amostra e misturada em 225 mL de Água Peptonada Tamponada incubado a 36± 1°C por 16 a 20 horas. Este meio não seletivo possui peptona, cloreto de sódio e fosfato dissódico e monopotássico, o que favorece a recuperação de células bacterianas injuriadas e a sua multiplicação. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo, sendo transferida uma alíquota de 1 mL para um tubo de ensaio, contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e 0,1 mL contendo 10 mL de caldo

tetracionato, incubados em banho maria a 42° C, por 24 horas. A partir do crescimento no meio de enriquecimento seletivo, alíquotas do inóculo foram semeadas em placas contendo ágar verde-brilhante vermelho-de-fenol-lactose-sacarose e em Agar XLD e incubados a 37° C por 24 horas.

No enriquecimento seletivo foi aplicado 2 tipos de caldo, o RV tem presente verde malaquita e de cloreto de magnésio que atuaram como, agentes seletivos, enquanto a presença de triptona, cloreto de sódio e fosfato monopotássio favorecem e estimulam a multiplicação de *Salmonella*. Já no caldo TT, a seletividade é pelo verde brilhante, pelos sais biliares e pelo iodeto de potássio, e o favorecimento da *Salmonella* pela polipeptona, carbonato de cálcio e tiosulfato de sódio.

O isolamento é baseado em colônias típicas de salmonelas, utilizasse duas placas com semeadura em meio XLD e outra de BPLS. Em ambos os meios de cultura o reagente de cor é o vermelho de fenol e a semeadura é feita por esgotamento na superfície das placas com incubação em estufa a 36± 1°C por 24 horas. Após a incubação verificou-se se houve crescimento de colônias com aspecto compatível com *Salmonella*. No XLD são observados em colônias rosas algumas colônias se apresentam enegrecidas. No BPLS as colônias são incolores ou rosadas entre translúcida a ligeiramente opacas ágar e ainda pode apresentar colônias com coloração verde/amarelada. As colônias isoladas não eram caracterizadas de *Salmonella*. A expressão dos resultados foi de ausência de *Salmonellaspp* em 25 g.

### **Contagem de *Staphylococcus coagulase positiva***

Após ter feito as devidas diluições do queijo em Solução Salina, inoculou-se 0,3, 0,3 e 0,4 mL em três placas com meio ágar Baird-Parker, com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo hochey, espalhando o inóculo por toda superfície do meio até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 36± 1°C por 30 a 48 horas, havendo o crescimento de *Staphylococcus*, a característica esperada será de colônias negras rodeadas ou não por alo de opacidade e alo branco.

A leitura foi realizada em placas de 20 a 200 colônias, selecionou-se 3

colônias características de colônias típicas e atípicas de cada placa e inoculou-se em caldo de crescimento BHI (Brain Heart Infusion). Os tubos foram incubados de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Os tubos com turvamento foram utilizados para a realização da prova da coagulase, utilizando plasma de coelho  $36 \pm$  por 6 horas, no decorrer do tempo, a presença de coágulos deve ser verificada periodicamente pois o coágulo poderá ser desfeito devido a presença de outra enzima produzida por SCP, estafiloquinase. Com o resultado do teste da coagulase foi feita uma regra de três, e obtidas as contagens.

### **Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

Primeiramente foi realizado o enriquecimento seletivo primário pesados asepticamente 25 g da amostra e acrescentados 225/mL de caldo (UVM, Modified Listeria Enrichment Broth). Em seguida, homogeneizados em stomacher por 60 segundos e incubados a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Posteriormente foi preparado o enriquecimento seletivo secundário, obtendo-se 0,1 mL da cultura do caldo UVM e transferido para um tubo contendo 10 mL de caldo Fraser incubando a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 24 a 48 horas, após incubação o caldo passa da coloração amarelada para marrom escura. A partir deste caldo foi feito o isolamento onde uma alíquota foi replicada para placas de ágar Oxford e de ágar Palcam, utilizando a sementeira de esgotamento, de forma a proporcionar a obtenção de colônias isoladas. As placas foram incubadas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas. Se houve presença de *Listeria* spp. no ágar Palcam aparecerá colônias verdes-amareladas ou verdes-acinzentadas, rodeadas por zonas escuras. No ágar Oxford as colônias de *Listeria* spp. apresentam-se pretas rodeadas halo negro ou escuro a confirmação da *Listeria* spp. é feita pela prova da catalase onde se coloca em uma placa de petry uma lamina de vidro, uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% misturado a uma colônia captada com ajuda da alça de platina a presença de bolhas de oxigênio é catalase positiva indicando a presença de *Listeria*.

Nas amostras testadas não se encontraram crescimento de colônias características, sendo interrompida análise.

### **Contagem de Lactobacilos**



A contagem de Lactobacilos foi realizada em ágar rogosa (Oxoid) conforme metodologia preconizada por Rogosa et al. Foi colocado 1 mL de cada diluição nas respectivas placas de Petri e acrescentado o meio, homogeneizado. Após solidificação do meio, foi acrescentada uma cobertura de ágar para favorecer o crescimento dos lactobacilos (microaerófilos). Este meio foi incubado a 30°C por cinco dias<sup>16</sup>.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Análises físico-químicas**

As análises físico-químicas foram realizadas para verificar a composição centesimal dos queijos, sendo de suma importância para que o consumidor verifique os constituintes que apresentam-se no produto, dentre sua composição, a proteína e a gordura fazem parte do rendimento dos mesmos. Os resultados obtidos nas análises físico-químicas dos queijos Minas Frescal artesanal de leite cru e leite pasteurizado estão sumarizados na Tabela 1.

O teor de umidade indica o rendimento, em função da prensagem e não maturação, isso explica o motivo do queijo Minas Frescal ser mais acessível ao consumidor, por apresentar maior quantidade no grão do coalho..

Quanto aos teores de umidade, os valores dos dois queijos apresentaram-se acima de 55%, 56,1 e 61,82% respectivamente para queijo de leite cru e queijos de leite pasteurizado caracterizando-os, como queijos de muita alta umidade<sup>19</sup>. Em estudo realizado por Dias et al.<sup>20</sup>, analisando cinco amostras de queijos industrializados e cinco queijos artesanais comercializados em supermercados, todos apresentaram teores superiores de 55%.

A concentração de proteína no queijo depende da variedade, sendo que a proteína predominante é a caseína. Nesse estudo foram similares 15,29, porém no de leite pasteurizado houve uma maior concentração, provavelmente pelo tratamento térmico<sup>7</sup>.

Segundo a IN nº4/2004<sup>19</sup>, o queijo Minas Frescal é classificado como um queijo “semi-gordo”, correspondendo a teores de 25,0 e 44,9% desse nutriente<sup>6</sup>, no entanto, esses valores podem variar dependendo da matéria-prima e da elaboração. Os resultados desse trabalho para queijos cru e pasteurizado ficaram entre 19,74% e 23,1%, respectivamente, classificando-os

como queijo magro, 10 a 24,9%<sup>6</sup>, semelhante ao estudo realizado por Sandri et al.<sup>21</sup> encontrou resultados de 20 a 29% em diversos queijos Minas Frescal produzido no estado do Mato Grosso do Sul.

Entre os sais minerais de maior destaque nos queijos estão o cálcio, o magnésio e o fósforo, os teores de cinzas corresponderam-se a 3,5 e 3,2% para o queijo de leite pasteurizado e de leite cru, respectivamente resultados encontraram-se próximos<sup>21</sup>.

A quantidade de carboidratos presentes nos queijos corresponde a lactose (açúcar do leite) residual presente nos mesmos, já que a maior quantidade deste dissacarídeo é eliminada no soro do queijo durante o processamento<sup>18</sup>. A Instrução Normativa (IN) N°4, de 01 de março de 2004<sup>19</sup>, não especifica a quantidade de carboidratos na composição físico-química.

Tabela 1. Análises físico-químicas da composição centesimal do queijo cru e pasteurizado, realizadas no Laboratório de Bromatologia da UFPel-Pelotas/RS.

<b>DETERMINAÇÕES</b>	<b>QUEIJO</b>	
	<b>PASTEURIZADO</b>	<b>CRU</b>
<b>Umidade (g/100g)</b>	56,18	61,82
<b>Proteína (g/100g)</b>	15,29	11,65
<b>Gordura (g/100g)</b>	23,1	19,74
<b>Cinzas (g/100g)</b>	3,5	3,2
<b>Carboidratos (g/100g)</b>	1,93	3,59

### **Análises microbiológicas**

Os dados apresentados na Tabela 2 mostram os valores obtidos após elaboração dos queijos, a partir de leite cru e de leite pasteurizado. Na Tabela 3, estão os valores de referência para os parâmetros microbiológicos, com base na Resolução – RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001<sup>20</sup>. A qualidade do queijo Minas Frescal envolve uma soma de fatores: a ordenha na fazenda e na fábrica, onde é importante desde a sanidade do animal, higiene dos funcionários, equipamentos e utensílios durante o processamento. A importância da avaliação da qualidade de um alimento principalmente a microbiológica, só é justificada pelos aspectos de saúde pública e interesse econômico<sup>18</sup>.

A análise desses dados revela que as amostras elaboradas a partir do leite cru apresentaram uma carga microbiana total elevada, com relação ao queijo elaborado com leite pasteurizado, quanto aos parâmetros para coliformes totais e termotolerantes, permanecendo-se como um produto inadequado de acordo com o padrão estabelecido pela ANVISA<sup>20</sup>, para queijos de muito alta umidade (> 55%) encontrado na tabela 3.

Tabela 2. Número Mais Provável das análises Microbiológicas do queijo artesanal Minas Frescal elaborados com leite cru e leite pasteurizado produzido no NTL-CAP-UFPel.

Dias	QUEIJO					
	CRU			PASTEURIZADO		
Determinações	1	15	30	1	15	30
<b>Contagem Coliformes totais NMP*/g</b>	>1,1 x 10 <sup>4</sup>	>1,1 x 10 <sup>4</sup>	4,6 x 10 <sup>3</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>	4,6 x 10 <sup>2</sup>
<b>Coliformes Termotolerantes NMP*/g</b>	≥1,1 x 10 <sup>4</sup>	>1,1 x 10 <sup>4</sup>	3,0 x 10 <sup>3</sup>	< 3,0 x 10 <sup>2</sup>	<3,0 x 10 <sup>1</sup>	<3,0 x 10 <sup>1</sup>
<b>Contagem Lactobacilos UFC*/g</b>	2,3 x 10 <sup>2</sup>	3,1 x 10 <sup>2</sup>	2,6 x 10 <sup>2</sup>	<2,5 x 10 <sup>2</sup>	<2,5 x 10 <sup>2</sup>	<2,5 x 10 <sup>2</sup>
<b>Staphylococcus coagulase positiva (UFC*/g)</b>			3,5 x 10 <sup>3</sup>			2,5 x 10 <sup>2</sup>

\*UFC -Unidade Formadora de Colônia / grama \*\* NMP/g – Número mais provável/ grama.

Tabela 3. Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos para queijos de muito alta umidade: umid> 55%, com base na Resolução – RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001.

Parâmetros	Limites*
<b>Coliformes totais (NMP/g)</b>	Sem parâmetro estabelecido
<b>Coliformes termotolerantes (NMP/g)</b>	< 5,0 x 10 <sup>2</sup>
<b>Contagem Staphylococcus coagulase positiva (NMP/g)</b>	< 5,0 x 10 <sup>2</sup>
<b>Pesquisa Salmonella spp.</b>	Ausência
<b>Pesquisa de Listeria monocytogenes</b>	Ausência

A maior parte das doenças infecciosas transmitidas pelos alimentos tem origem entérica, e por isso, um dos maiores perigos ao qual o consumidor está exposto é a contaminação por materiais fecais humanas ou animais. No Brasil em trabalho semelhante, Santos *et al.*<sup>23</sup>, relatou altas contagens de coliformes termotolerantes em amostras de queijo Minas. O número elevado de coliformes totais em alimentos processados indica processamento inadequado, recontaminação pós-processamento e/ou proliferação microbiana. Já a contagem de coliformes termotolerantes fornece, além das informações sobre as condições higiênicas do produto, também indicação da eventual presença de micro-organismos enteropatogênicos<sup>24</sup>. Em estudo de Pereira *et al.*<sup>25</sup> com 8 amostras de queijo Minas Frescal, evidenciou que todas estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação, representando um controle de qualidade efetivo. Dias *et al.*<sup>20</sup>, analisando queijos Minas Frescal produzidos industrialmente e artesanalmente comercializados na região Sul de Goiás, relatou que os resultados obtidos nas análises microbiológicas pelo Número Mais Provável (NMP/g) de coliformes totais e termotolerantes, destacou que cinco amostras industrializadas (50%) e duas amostras artesanais (20%) estavam em desacordo com os padrões estabelecidos.

A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva no produto pasteurizado está dentro das especificações exigidas pela legislação, enquanto o elaborado com leite cru obteve resultado oposto, de acordo com as tabelas acima. Santana *et al.*<sup>23</sup> estudando queijo coalho comercializado no Mercado Tradicional de Aracaju, encontrou todos os resultados fora do preconizado pela legislação, enquanto Arruda *et al.*<sup>24</sup> estudando queijo 84 amostras de queijos Minas Frescal e Padrão nas feiras livres de Goiânia, verificou valor médio de  $1,1 \times 10^3$  UFC/g, representando um risco para produção de enterotoxinas, portanto estudos das bibliografias pesquisadas, todos os valores para *Staphylococcus* coagulase positiva apresentam-se fora dos preconizados pela ANVISA, quando queijos elaborados com leite cru, confirmando, assim, a importância da pasteurização para produção de queijo.

Quanto à pesquisa de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* nas amostras, obteve-se “ausência” na totalidade das análises realizadas, sendo este resultado satisfatório já que legislação vigente estabelece sua ausência.

Resultados semelhantes foram obtidos por Nicolau *et al.*<sup>25</sup> e Bairros *et al.*<sup>26</sup> que não identificaram *Salmonellaspp.* quando avaliaram amostras de queijo Minas Frescal comercializadas no Rio de Janeiro e Goiás, respectivamente. A contaminação com *Salmonella spp.*, pode estar relacionada a diferentes fontes, porém, a pasteurização é capaz de eliminá-la, o mesmo para a *L. monocytogenes*. No queijo Minas Frescal, a contaminação pode estar relacionada à ineficiência da pasteurização, manipuladores da fábrica portadores, da doença ou da utilização de água não potável no processamento<sup>21</sup>.

Peresiet *al.*<sup>28</sup> ao pesquisar queijo Minas adquirido em feiras livres de São José do Rio Preto, não encontrou *L. monocytogenes* no alimento, mas verificou a presença de *Salmonellaspp.* em duas das sessenta amostras analisadas. Essa indeterminação de presença desses microrganismos presentes no queijo se dão, segundo Brant *et al.*<sup>29</sup>, a ausência de *Salmonella spp.* e de *L. monocytogenes* que pode ser determinada pela menor capacidade de competência desses microrganismos em relação aos coliformes e aos *Staphylococcuspp.*, e que a ocorrência desses micro-organismos em alimentos está, na maioria das vezes, associada a contagens menores de outros contaminantes. A ausência de *Salmonella spp.* nas amostras também pode estar relacionada à presença de bactérias lácticas, que tornam o queijo um meio adverso à sobrevivência de micro-organismos patogênicos ou mesmo devido a condição estressante advinda do processamento e estocagem a que o alimento foi submetido, por exemplo a temperatura.

Quanto a contagem de Lactobacilos, expressos na Tabela 2, nos tempos de 1 a 30 dias, não houveram diferenças nos dois queijos analisados, estando de acordo com os resultados encontrados por Ribeiro *et al.*<sup>30</sup> que estudou queijos Minas Frescal estocados até 21 dias em condições assépticas, indicando, portanto, que são um meio adequado para sobrevivência desses microrganismos. Para Nardes<sup>31</sup>, analisando os *Lactobacillus sp.* em Meio Rogosa em queijos durante 180 dias, observou que havia um aumento no crescimento dos mesmos e verificando que com a diminuição do pH, e conseqüentemente aumento da acidez, o meio tornava-se desfavorável para a proliferação de bactérias patogênicas, que pode ser explicada pela produção

de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico, pois os Lactobacilos são produtores dessa substância<sup>30-32</sup>.

## **CONCLUSÃO**

Perante os resultados das análises físico-químicas, os queijos apresentaram-se de acordo com a legislação para umidade, como queijos de muita alta umidade, e quanto aos teores de gordura, como magro, divergindo da classificação dos queijos Minas Frescal como semi-gordos. A qualidade microbiológica do queijo Minas frescal de leite cru e leite pasteurizado é comprometido principalmente quando se produz de maneira artesanal. Pelos dados obtidos da microbiota dos queijos analisados nesse trabalho verificou-se que a contaminação do queijo elaborado com leite cru é maior que quando se utiliza leite pasteurizado, portando deve se seguir a legislação para elaboração de queijos sempre com leite pasteurizado, mas evitando o máximo a contaminação cruzada que pode ocorrer pelo manipulador ou quando se utiliza utensílios em condições assépticas inadequadas, é importante salientar e se concluir que a instrução normativa nº 30 do MAPA, que admite colocar no mercado consumidor queijos artesanais deve ser seguida adequadamente.

## **REFERÊNCIAS**

01. Muniz LC, Madruga SW, Araújo CL. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2013;18:12.
02. FAO. Food and Agriculture Organization. Milk and dairy products in human nutrition. Rome; 2013.
03. Landgraf M. Microorganismos indicadores. In: Franco, B. D. G. de M; Lamdgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 3 p 27 – 31.
04. Furtado MM. Problemas típicos do queijo minas frescal. *Princípios*

problemas dos queijos; causas e prevenção. São Paulo – SP . Fonte comunicação, 1999 p 155- 160.

05. Perry, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. Quim. Nova. Vol. 27, No. 2, 293- 300, 2004.
06. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.
07. Furtado MM. A arte e a ciência do queijo. In. Qualidade do leite. 2 ed. São Paulo: Globo, 1991. P 21- 33.
08. Carvalho JDG; Viotto WH; Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. Food Control, Reading, v.18, n. 3,p. 262-267, 2007
09. Loguercio AP; Aleixo JAG. Microbiologia de queijos tipo Minas Frescal produzidos artesanalmente. Ciência Hoje, v. 31, n 6, p. 1063 – 1067, 2001.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro, Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013.
11. Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; Muller, M.T.; Silveira, K.C.S.; Almeida, T.N.; Medeiro, C.F. Avaliação Microbiológica de Queijo tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Higiene Alimentar, v.16, n 101, p. 32-36, 2002.
12. Pena, E. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal fabricado em Minas Gerais em 2008. In: Congresso Nacional de Laticínios, 26., 2009, Juiz de Fora. Anais Eletrônicos. Juiz de Fora; Epaming/ ILCT, 2009. 1 CD- ROM.
13. Pinto F.G. S., Souza M., Saling, Moura A.C. Qualidade Microbiológica de Queijo Minas Frescal Comercializado no Município de Santa Helena,

- PR, Brasil. Arq. Inst. Bio, São Paulo, v 78, n2, p 191-198, abr./jun.,2011.
14. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008
  15. American Public Health Association – APHA. Standart methods for examination of dairy products, 18. Ed. Whashington, DC: 1992. 433p.
  - 16 Timm, C D; Lima,H G de Cereser N.D. Manual de Técnicas Microbiológicas em Leites e Derivados Livros didáticos LipoaVol II. UFPel 2017
  - 17 Rogosa, M.; Mitchell, J.A. Wiseman, R.F. A selective médium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *Journal Bacteriology*, 62;132-133, 1951.
  - 18 Oliveira, LE, Silva O, Pascoal GB. Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos minas frescal (tradicional e light). *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 2014:69(4): 280-288.
  - 19 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no 04 de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade em Queijo Minas Frescal – Alteração na “Classificação”. Diário da República Federativa do Brasil, p.12, 2004.Dias BF, Ferreira SM, Carvalho VS, Batista DS. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo Minas Frescal artesanal e industrial, *Cassilândia* 2016:3(3):57-64.
  - 20 Sandri DO et al. Análise físico-química do queijo Minas Frescal produzido no estado do Mato Grosso. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. 2015:2.
  - 21 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2001.



- 22 Santos M.; Silva TV, Gaioski LJ, Pelozato E., Dallasanta HS. Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do município de Guarapuava e Região. In: Salão De Cultura e Extensão, 2008, Guarapuava-PR. *Anais*. Guarapuava, 2008.
- 23 Reis DL, Couto EP, Ribeiro JL, Nero LA, Ferreira MA. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(6):3161-3172. 21.
- 24 Pereira RB. Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros [monografia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
- 25 Santana RF, Santos DM, Martinez, Lima AS. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializados em Aracaju, SE. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(6):1571-1522.
- 26 Arruda MLT, Nicolau ES, Reis AP, Araújo AS, Mesquita AJ. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. *RevInst Adolfo Lutz*. 2007;66(3):2007.
- 27 Nicolau ES; Bueno VFF; Mesquita AJ; Coelho KO; Couto DV. Qualidade microbiológica dos queijos tipo Minas Frescal, Prato e Mussarela comercializados em Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. Juiz de Fora: CEPEL/ILCT/Epamig, 2001.:200-205.
- 28 Bairros JV, Destri K, Vargas B, Nascente PS. Análise de bolores e leveduras em queijos tipo Minas, produzidos artesanalmente e comercializados em feiras livres na cidade de Pelotas/RS. In: Congresso de Iniciação Científica *Anais*. Pelotas, 2007.
- 29 Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. Porto Alegre-RS: Artmed; 2000.
- 30 Peresi JIM, Gaciano RAS, Almeida IAZC, Lima SI, Ribeiro AK, Carvalho IS. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade

microscópica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos.  
*Revista Higiene Alimentar*. 2001;15(83):63-70

- 31 Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007;59(6):1570-1574.
- 32 Souza CHB. Influência de uma cultura starter termofílica sobre Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as Características de Queijo Minas Frescal Probiótico. Universidade de São Paulo, Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2006
- 33 Ribeiro EP, Simões LG, Jurkiewicz CH. Desenvolvimento de Queijo Minas Frescal Adicionado de *Lactobacillus acidophilus* Produzido a Partir de Retentados de Ultrafiltração. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(1):19-23, jan-mar. 2009
- 34 Nardes REF. Caracterização do Queijo Samorano de OP sobre condições de maturação acelerada por modificações na temperatura. Tese de Doutorado, Viçosa, MG Brasil, 2002. UFV 230P

## ANEXO

Tabela dos valores de NMP para três tubos.

Número de tubos positivos			NMP/mL ou g
$10^0$	$10^1$	$10^2$	
0	0	0	< 0,3
0	0	1	0,3
0	1	0	0,3
0	1	1	0,61
0	1	0	0,62
0	2	0	0,94
1	3	0	0,36
1	0	1	0,72
1	0	2	1,1
1	1	0	0,74
1	1	1	1,1
1	2	0	1,1
1	2	1	1,5
1	3	0	1,6
2	0	0	0,92
2	0	1	1,4
2	0	2	2,0
2	1	0	1,5
2	1	1	2,0
2	1	2	2,7
2	2	0	2,1
2	2	1	2,8
2	2	2	3,5
2	3	0	2,9
2	3	1	3,6
3	0	0	2,3
3	0	1	3,8
3	0	2	6,4
3	1	2	4,3
3	1	1	7,5
3	1	2	12
3	1	3	16
3	2	0	0,93
3	2	1	15
3	2	2	21
3	2	3	29
3	3	0	24
3	3	1	46

Fonte: Timm et al. Manual de técnicas microbiológicas em leite e derivados (2017).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. REINBOLD, G.W. Indicator organisms in dairy products. *Food Technology*, v.37, n.6, p.111-3, 1983.
02. Kosikowski F. *Cheese and Fermented Milk Foods*, Ed. 2 Michigan: Edwads Brothers, Inc. 700p.1982.
03. Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; Muller, M.T.; Silveira, K.C.S.; Almeida, T.N.; Medeiro, C.F. Avaliação Microbiológica de Queijo tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Higiene Alimentar*, v.16, n 101, p. 32-36, 2002.
04. FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.23, p.162-165, 2003. Suplemento.
05. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. *Diário Oficial da União*, Brasília, 05 de março de 2004.
06. HOFFMAN, F.L.; CRUZ, C.H.G.; VINTURIM, T.M. Qualidade microbiológica de queijos comercializados na região de São José do Rio Preto-SP. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.50, p.42-47, 1995.
07. SENA, M.J.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; MORAIS, C.F.A.; CORRÊA, E.S.; SOUZA, M.R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife-PE. *Higiene Alimentar*, v.14, n.74, p.41-44, 2000.
08. BARROS, P.C.O.G.; NOGUEIRA, L.C.; RODRIGUEZ, E.M.; CHIAPPINI, C.C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município do Rio de Janeiro, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.18, n.122, p.32-37, Julho, 2004.
09. TRONCO, Vânia Maria. Aproveitamento do leite: Elaboração de seus derivados na propriedade rural. Guaíba: Ed. Agropecuária, 1996.
10. REZENDE, D. C. de. **Estratégia de coordenação e qualidade na cadeia dos queijos finos**. 2004. 181 p. Tese (Doutorado em: Desenvolvimento, Agricultura e Sociedade)-Instituto VEBLEN de Ciências Humanas e

Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2004

11. VIVAN, A. M.; AVILA, M. L. O mercado de queijos finos no Brasil e sua relação com o comportamento estrategista das agroindústrias oligopolistas. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, Brasília, v. 37, n. . abr./jun.,1999.
12. PEREIRA, M.L., LARA, M.A., DIAS, R.S. et al. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo “tipo Minas”. *Rev Microbiol*, São Paulo, v.22, p.349-350, 1991.
13. SILVA, C.A.M., LEITÃO, M.F. de F. Influência da temperatura de armazenamento na proliferação microbiana e no tempo devida útil de queijo tipo “Minas Frescal”. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 4, 1980, Rio de Janeiro. **Programa Oficial, Resumos...** Rio de Janeiro : Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1980. p.186.
14. CALCI, K.R., BURKHARDT III, W., WATKINS, W.D. et al. Occurrence of male-specific bacteriophage in fecal and domestic animal wastes, human feces and human-associated waste waters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.64, n.12, p.5027-5029, dec, 1998.
15. SHARF, J.M. Exame microbiológico de alimentos. São Paulo : Polígono, 1972. Cap.16: Índices de sanidade: p.173-186.
16. ANDREWS, W.H., DURAN, A.P., McCLURE, F.D. *et al.* Use of two rapid A-1 methods for the recovery of fecal coliforms and *Escherichia coli* from selected foods types. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.1, p.289-293, 1979.
17. Muniz LC, Madruga SW, Araújo CL. Consumo de leite e derivados entre adultos e idosos no Sul do Brasil: um estudo de base populacional. *Ciência & Saúde Coletiva*. 2013;18:12.
18. FAO. Food and Agriculture Organization. Milk and dairy products in human nutrition. Rome; 2013.
19. Landgraf M. Microorganismos indicadores. In: Franco, B. D. G. de M; Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 3 p 27 – 31.
20. Furtado MM. Problemas típicos do queijo minas frescal. Princípios e problemas dos queijos; causas e prevenção. São Paulo – SP . Fonte comunicação, 1999 p 155- 160.

21. Perry, K.S.P. Queijos: Aspectos Químicos, Bioquímicos e Microbiológicos. *Quim. Nova*. Vol. 27, No. 2, 293- 300, 2004.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07/03/96. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.
23. Furtado MM. A arte e a ciência do queijo. In. *Qualidade do leite*. 2 ed. São Paulo: Globo, 1991. P 21- 33.
24. Carvalho JDG; Viotto WH; Kuaye AY. The quality of Minas Frescal cheese produced by different technological processes. *Food Control*, Reading, v.18, n. 3,p. 262-267, 2007
25. Loguercio AP; Aleixo JAG. Microbiologia de queijos tipo Minas Frescal produzidos artesanalmente. *Ciência Hoje*, v. 31, n 6, p. 1063 – 1067, 2001.
26. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Gabinete do Ministro, Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013.
27. Câmara, S.A.V.; Amaral, G.B.; Muller, M.T.; Silveira, K.C.S.; Almeida, T.N.; Medeiro, C.F. Avaliação Microbiológica de Queijo tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. *Higiene Alimentar*, v.16, n 101, p. 32-36, 2002.
28. Pena, E. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal fabricado em Minas Gerais em 2008. In: Congresso Nacional de Laticínios, 26., 2009, Juiz de Fora. *Anais Eletrônicos*. Juiz de Fora; Epaming/ ILCT, 2009. 1 CD- ROM.
29. Pinto F.G. S., Souza M., Saling, Moura A.C. Qualidade Microbiológica de Queijo Minas Frescal Comercializado no Município de Santa Helena, PR, Brasil. *Arq. Inst. Bio*, São Paulo, v 78, n2, p 191-198, abr./jun.,2011.
30. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV edição. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008
31. American Public Health Association – APHA. *Standart methods for examination of dairy products*, 18. Ed. Whashington, DC: 1992. 433p.
32. Timm, C D; Lima,H G de Cereser N.D. *Manual de Técnicas Microbiológicas em Leites e Derivados Livros didáticos LipoaVol II*. UFPel 2017
33. Rogosa, M.; Mitchell, J.A. Wiseman, R.F. A selective médium for the isolation of oral and fecal lactobacilli. *Journal Bacteriology*, 62;132-133, 1951.

34. Oliveira, LE, Silva O, Pascoal GB. Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos minas frescal (tradicional e light). *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 2014;69(4): 280-288.
35. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa no 04 de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade em Queijo Minas Frescal – Alteração na “Classificação”. Diário da República Federativa do Brasil, p.12, 2004. Dias BF, Ferreira SM, Carvalho VS, Batista DS. Qualidade microbiológica e físico-química de queijo Minas Frescal artesanal e industrial, *Cassilândia* 2016;3(3):57-64.
36. Sandri DO et al. Análise físico-química do queijo Minas Frescal produzido no estado do Mato Grosso. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos. 2015:2.
37. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2001.
38. Santos M.; Silva TV, Gaioski LJ, Pelozato E., Dallasanta HS. Avaliação microbiológica de queijos fabricados por pequenos produtores rurais do município de Guarapuava e Região. In: Salão De Cultura e Extensão, 2008, Guarapuava-PR. *Anais*. Guarapuava, 2008.
39. Reis DL, Couto EP, Ribeiro JL, Nero LA, Ferreira MA. Qualidade e segurança microbiológica de derivados lácteos fermentados de origem bovina produzidos no Distrito Federal, Brasil. *Rev. Semina: Ciências Agrárias*. 2014;35(6):3161-3172. 21.
40. Pereira RB. Caracterização microbiológica de alguns tipos de queijos regionais brasileiros [monografia]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
41. Santana RF, Santos DM, Martinez, Lima AS. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializados em Aracaju, SE. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2008;60(6):1571-1522.
42. Arruda MLT, Nicolau ES, Reis AP, Araújo AS, Mesquita AJ. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO. *RevInst Adolfo Lutz*. 2007;66(3):2007.
43. Nicolau ES; Bueno VFF; Mesquita AJ; Coelho KO; Couto DV. Qualidade microbiológica dos queijos tipo Minas Frescal, Prato e Mussarela

- comercializados em Goiás. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS. Juiz de Fora: CEPEL/ILCT/Epamig, 2001.:200-205.
44. Bairros JV, Destri K, Vargas B, Nascente PS. Análise de bolores e leveduras em queijos tipo Minas, produzidos artesanalmente e comercializados em feiras livres na cidade de Pelotas/RS. In: Congresso de Iniciação Científica *Anais*. Pelotas, 2007.
  45. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. Porto Alegre-RS: Artmed; 2000.
  46. Peresi JIM, Gaciano RAS, Almeida IAZC, Lima SI, Ribeiro AK, Carvalho IS. Queijo Minas Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. *Revista Higiene Alimentar*. 2001;15(83):63-70
  47. Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2007;59(6):1570-1574.
  48. Souza CHB. Influência de uma cultura starter termofílica sobre Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e as Características de Queijo Minas Frescal Probiótico. Univerisade de São Paulo, Dissertação de Mestrado, São Paulo, 2006
  49. Ribeiro EP, Simões LG, Jurkiewicz CH. Desenvolvimento de Queijo Minas Frescal Adicionado de *Lactobacillus acidophilus* Produzido a Partir de Retentados de Ultrafiltração. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(1):19-23, jan-mar. 2009
  50. Nardes REF. Caracterização do Queijo Samorano de OP sobre condições de maturação acelerada por modificações na temperatura. Tese de Doutorado, Viçosa, MG Brasil, 2002. UFV 230P