

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Nutrição**

**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras  
livres**

**Josiane da Silva Costa**

**Pelotas, 2019**

**Josiane da Silva Costa**

**Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras  
livres**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Lameiro Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Eliézer Ávila Gandra

Pelotas, 2019

Josiane da Silva Costa

Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres

Dissertação aprovada, como requisito, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 20/8/2019

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Lameiro Rodrigues (Presidente)

Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof Dr. Eliézer de Ávila Gandra (Co-orientador)

Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helenice Gonzalez de Lima (Membro efetivo)

Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Augusto Schneider (Membro efetivo)

Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

C837q Costa, Josiane da Silva

Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres / Josiane da Silva Costa ; Kelly Lameiro Rodrigues, orientadora; Eliézer Ávila Gandra, Carlos Castilho de Barros, coorientadores. — Pelotas, 2019.

74 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Alimento. 2. Consumidor. 3. Derivados lácteos. 4. Enterotoxina estafilocócica. 5. Legislação. I. Rodrigues, Kelly

## RESUMO

COSTA, Josiane da Silva. **Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres**. 2019. 74f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Alimentos contaminados representam um risco à saúde dos consumidores, e especialmente à indivíduos imunodeprimidos, idosos e crianças. O queijo é um produto bastante apreciado e consumido em todo o mundo, sendo por vezes elaborado sem padrões de identidade e qualidade e em condições insatisfatórias de higiene. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres no município de Pelotas-RS, e verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas clássicas em cepas isoladas de *Staphylococcus spp.* Um total de 29 amostras de queijos foram coletadas, sendo realizada análise de teor de umidade, pesquisa de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, e contagens de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus coagulase positiva*. As cepas isoladas de *Staphylococcus coagulase positiva* e negativa, foram submetidas ao teste PCR para verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas (EE) A, B, C, D e E. Das 29 amostras analisadas, 13,8% (n= 4) apresentaram quantificações acima do permitido pela legislação para coliformes termotolerantes, e 76% (n=22) para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*. Todas as amostras analisadas apresentaram ausência de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*, estando em conformidade com a legislação vigente. Foram encontrados os genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas B e C, em 6 isolados de *Staphylococcus spp*, sendo para enterotoxina C, um isolado coagulase negativa e três coagulase positiva. Os queijos comercializados em feiras livres mostraram-se impróprios para consumo.

**Palavras-chave:** alimento; consumidor; derivados lácteos; enterotoxina estafilocócica; legislação; leite; segurança dos alimentos.

## ABSTRACT

COSTA, Josiane da Silva. **Microbiological quality of artisanal cheeses marketed in open markets**. 2019. 74p. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos. Faculdade de Nutrição. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Contaminated food poses a risk to the health of consumers, and especially to immunosuppressed individuals, the elderly and children. Cheese is a product widely appreciated and consumed throughout the world, being sometimes elaborated without standards of identity and quality and in unsatisfactory hygiene conditions. The objective of this study was to evaluate the microbiological quality of artisan cheeses marketed in free fairs in the municipality of Pelotas-RS, and to verify the presence of genes producing classical enterotoxins in strains isolated from *Staphylococcus* spp. A total of 29 cheese samples were collected, with moisture content analysis, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, and Thermotolerant coliform counts and coagulase positive *Staphylococcus*. Strains isolated from coagulase positive and negative *Staphylococcus* were submitted to the PCR test to shed the presence of the genes producing staphylococcal enterotoxins (EE) A, B, C, D and E. Of the 29 samples analyzed, 13.8% (n = 4) presented Quantifications above that allowed by the legislation for Thermotolerant coliforms, and 76% (n = 22) for the coagulase positive *Staphylococcus* count. All the samples analyzed presented absence of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*, being in conformity with the current legislation. The encoders genes for staphylococcal enterotoxins B and C were found in 6 isolates of *Staphylococcus* spp, being for enterotoxin C, one coagulase negative isolate and three coagulase positive. The cheeses marketed in free trade fairs proved unsuitable for consumption.

Keywords: consumer; dairy products; food; food safety; legislation; milk; staphylococcal enterotoxin;

## SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	8
1.1 Objetivos .....	10
1.1.1 Objetivo geral .....	10
1.1.2 Objetivos específicos .....	10
<b>2 Revisão bibliográfica</b> .....	11
2.1 Legislação sobre o queijo .....	11
2.2 Doenças transmitidas por alimentos .....	13
2.3 Microrganismos indicadores de condições de higiene e microrganismos patogênicos .....	15
2.3.1 Microrganismos indicadores .....	15
2.3.2 Microrganismos patogênicos .....	16
2.3.2.1 <i>Salmonella</i> ssp .....	16
2.3.2.2 <i>Listeria monocytógenes</i> .....	17
2.3.3.3 <i>Staphylococcus</i> spp .....	19
<b>3 Projeto de pesquisa</b> .....	21
<b>4 Relatório de campo</b> .....	34
<b>5 Artigo</b> .....	35
<b>6 Considerações finais</b> .....	56
<b>7 Referências gerais</b> .....	57

## 1 Introdução

Os alimentos contaminados representam um risco à saúde dos consumidores, principalmente em indivíduos imunodeprimidos, idosos e crianças e este risco vem impulsionando ao longo das últimas décadas o desenvolvimento de pesquisas e programas para segurança dos alimentos (CALLAWAY et al., 2006). Em sua grande maioria, as enfermidades não são diagnosticadas devido à baixa notificação de surtos, falta de amostragem dos alimentos contaminados envolvidos, ou mesmo pelas limitações e lentidão das metodologias analíticas usualmente empregadas no diagnóstico (CREMONESI et al., 2007).

Dentre os produtos artesanais, os queijos destacam-se como um dos alimentos mais consumidos, apesar de serem elaborados, muitas vezes, em condições insatisfatórias de higiene e sem apresentar padrões de identidade e qualidade estabelecidos pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e da Saúde (MS) (FEITOSA et al., 2003; MORAES et al., 2009). Hábitos alimentares antigos justificam seu elevado consumo, já que parte da população acredita que esses produtos sejam mais saudáveis, além de apresentarem preço acessível (ARIMI et al., 2005).

Estudos mostram que existem deficiências durante a obtenção e elaboração de produtos artesanais, como o queijo. Em consequência dessas deficiências, análises microbiológicas de queijo artesanal resultam em altas contagens de micro-organismos indicadores de higiene, como as bactérias aeróbias mesófilas e os coliformes (FEITOSA et al., 2003; NERO et al., 2009). Sabe-se a importância do leite *in natura* e seus derivados como potenciais veiculadores de agentes patogênicos associados aos alimentos, como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Brucella abortus* e *Campylobacter jejuni* (ARAMI et al., 2005). Outra problemática é o aumento dessas bactérias patogênicas isoladas nos alimentos que apresentam resistência aos antibióticos, especialmente os utilizados na produção animal que acabam afetando o homem (VANEGAS et al., 2009).

Segundo Welker et al. (2010) houve um aumento das doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo devido ao crescimento populacional, grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, crescente necessidade de produção de alimentos em grande escala, e a deficiente fiscalização dos órgãos públicos na produção de alimentos (BRASIL, 2011). De acordo o Ministério da Saúde (MS), dentre



os anos de 2009 e 2018, ocorreram 6.903 surtos de DTA notificados, sendo 122.817 pessoas doentes, 16.817 hospitalizados e 99 óbitos. Ainda conforme o MS, somente no ano de 2018, foram notificados 597 surtos de DTA, com 916 hospitalizados e 9 óbitos. Os alimentos envolvidos em surtos de DTA no período de 2009 a 2018 no Brasil foram os alimentos mistos (25,5%), água (21,2%), múltiplos alimentos (10,7%) e leite e seus derivados (7,9%). No mesmo período, os agentes etiológicos mais identificados nesses surtos de DTA, foram *Escherichia coli* (24,0%), *Salmonella spp* (11,2%), *Staphylococcus aureus* (9,5%) e coliformes (6,5%) (BRASIL, 2019).

Algumas cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva podem causar intoxicação alimentar pela produção de enterotoxinas estafilocócicas (EE), que ocorrem em 95% dos surtos (CUNHA et al., 2006). Estas não são inativadas pelo calor e são divididas em diferentes tipos sorológicos, sendo as EEs clássicas (A, B, C, D e E) as mais estudadas em pesquisas, e as técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e multiplex PCR (mPCR) têm sido uma importante ferramenta na detecção destes diferentes genes de EEs (STAMFORD et al., 2006; GERMINI et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; RODRIGUEZ et al., 2011). Cabe ressaltar a importância de *Staphylococcus aureus*, um agente patogênico amplamente envolvido em casos de intoxicações alimentares (SILVA et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2008).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza somente a análise de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, sendo as espécies mais estudadas, entretanto, espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa têm sido envolvidas em uma variedade de infecções humanas e animais, inclusive em função de fatores ambientais cepas coagulase positiva podem não produzir coagulase (BRASIL, 2001; CUNHA et al., 2006; JUNQUEIRA et al., 2009).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar os parâmetros microbiológicos de queijos artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas-RS e verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E em cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas destes queijos.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Determinar a umidade das amostras de queijo;
- Avaliar os parâmetros microbiológicos de queijos artesanais comercializados em feiras livres por meio da contagem de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus spp.*, pesquisa de *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*;
- Verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E nas cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas dos queijos artesanais.

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Legislação sobre queijo**

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Queijos, regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Portaria 146 de 1996, o queijo é definido como 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 bactéria específica, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e, ou especiarias e, ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Ainda, conforme o MAPA entende-se por queijo fresco o que está pronto para o consumo logo após sua fabricação e por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo. Sendo que a denominação queijo está reservada aos produtos em que a base láctea não contenha gordura e/ou proteínas de origem não láctea.

As queijarias devem estar situadas em região de indicação geográfica registrada e em propriedade certificada como livre de tuberculose e brucelose, participar do Programa de Controle de Mastite, Programa de Boas Práticas de Ordenha e de Fabricação, cloração e controle de potabilidade da água utilizada nas atividades (BRASIL, 2013). Para os queijos elaborados a partir de leite cru, o MAPA estabelece um período de maturação não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996). Este período poderá ser inferior quando, estudos técnico-científicos comprovem que a redução do período de maturação, não compromete a qualidade e a inocuidade do produto (BRASIL, 2013).

O MAPA preconiza que os queijos devem obedecer aos requisitos físicos, químicos e sensoriais próprios de cada variedade, estabelecidos no padrão individual correspondente e poderão ser acondicionados ou não, e, dependendo da variedade de queijo, apresentarão envases ou envoltórios bromatologicamente aptos recobrimo a sua casca, aderindo ou não à mesma. Podem ser utilizados na elaboração de queijos, aditivos e coadjuvantes de tecnologia relacionados na lista a que indica a classe de queijo para a qual ou as quais estão autorizadas (BRASIL, 1996). Para os produtos colocados à venda, os padrões microbiológicos seguem a Resolução da

Diretoria Colegiada (RDC) nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, incluindo os queijos produzidos a partir de leite pasteurizado, visando prevenir a ocorrência de veiculação de patógenos pelos alimentos (ANVISA, 2001).

Os queijos classificam-se de acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco e conteúdo de umidade em percentagem, como pode ser observado na tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Classificação dos queijos conforme conteúdo de umidade em percentagem.

Classificação	Umidade (%)
Queijo de baixa umidade – massa dura	Até 35,9
Queijo de média umidade – massa semi-dura	Entre 36,0 e 45,9
Queijo de alta umidade – massa branda ou macio	Entre 46,0 e 54,9
Queijo de muita alta umidade – massa branda ou mole	Superior a 55,0

Fonte: MAPA, 1996

De acordo com estudos realizados, o queijo colonial artesanal se apresenta, em sua maioria, na faixa de média umidade, podendo também se encaixar na faixa de baixa ou alta umidade (NHUCH et al., 2004; SILVEIRA JR. et al., 2012). Os microrganismos com parâmetros estabelecidos por legislação para queijos de média, alta e muita alta umidade são coliformes a 45°C, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp., assim como para queijos de baixa umidade, exceto a pesquisa de *Listeria monocytogenes* (BRASIL, 2001). O produto deve ser elaborado de acordo com o Código Internacional de Práticas Gerais de Higiene de Alimentos, que preconiza que o leite deve ser higienizado mecanicamente e tratado termicamente, assegurando-se a inocuidade do produto. Ficando excluída a obrigatoriedade destes processos o leite que se destine à elaboração dos queijos maturados a uma temperatura superior a 5° C, durante um tempo não inferior a 60 dias (BRASIL, 1996).

## 2.2 Doenças transmitidas por alimentos

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) configuram um termo genérico, aplicado a uma síndrome geralmente constituída de anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída a ingestão de alimentos e/ou água contaminados. Sintomas digestivos não são as únicas manifestações dessas doenças, podendo ocorrer, ainda, em diferentes órgãos como: rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido. Sob o aspecto etiológico podem ser causadas por toxinas, bactérias, vírus, parasitas e substâncias tóxicas (BRASIL, 2010).

Nos municípios brasileiros há um crescimento exponencial de empregos informais a cada ano. Observa-se um aumento do número de vendedores ambulantes e feiras-livres nas cidades, comercializando ou preparando alimentos. Em contraponto, esse tipo de comércio pode constituir um risco à saúde da população, proporcionando condições favoráveis para o aumento do risco de ocorrência de DTA, pois os alimentos podem ser facilmente contaminados por microrganismos patogênicos, devido às condições inadequadas do local de preparo e a falta de conhecimento técnico dos comerciantes para realizar uma manipulação adequada (SOTO, 2008).

Entre os anos 2009 e 2018 foram notificados 6.809 surtos de DTA, com 99 óbitos. Só no ano de 2018, ocorreram 503 surtos notificados envolvendo nove óbitos, sendo a região Sudeste a região que mais casos notificou no decorrer dos nove anos, representando 39% das notificações de surtos alimentares, ocorridos em sua maioria (37,2%) em residências (BRASIL, 2018). Os dados também mostram que, em 2018 os agentes etiológicos responsáveis por 80 surtos confirmados laboratorialmente foram *Escherichia coli* (27,5%), seguido por Norovírus (25,0%), e observa-se no mesmo período que *Staphylococcus aureus* é o terceiro agente etiológico mais identificado nos surtos de DTA (9,4%). Os alimentos mistos ocupam o topo dos alimentos incriminados em surtos de DTA dentre os anos citados acima (25,5%), seguido pela água (21,1%) e por múltiplos alimentos (10,7%). Já o leite e seus derivados, representam 7,8% desses alimentos (BRASIL, 2018).

O Ministério da Saúde observa que a incidência de DTA cresce anualmente, porém a maioria ainda não é notificada, pois muitos microrganismos patogênicos

presentes nos alimentos causam sintomatologias leves, fazendo com que o paciente não procure auxílio médico. Além disso, alimentos contaminados, normalmente, têm aparência, odor e sabores normais, o que dificulta a identificação do mesmo nos episódios de DTA (BRASIL, 2017).

A suscetibilidade para ocorrência de DTA é maior em grupos como crianças com menos de 15 anos de idade, idosos, indivíduos imunodeprimidos, pessoas com acloridria gástrica e gestantes (BRASIL, 2010). A contaminação dos alimentos pode ocorrer na fase de obtenção da matéria-prima e permanecer ou ocorrer durante as etapas de transporte, recepção, armazenamento. No Brasil, a mão de obra recrutada para realização das atividades frequentemente não é qualificada e, em muitos casos, sequer é treinada para assumir as atividades referentes à produção de refeições, observa-se também a falta de informação desses profissionais quanto às normas de segurança dos alimentos na produção de alimentos (ZANDONADI et al, 2007).

O queijo destaca-se como um dos principais produtos derivados do leite. Em parte, a produção dos queijos artesanais e sua manipulação, ocorre de forma inadequada, obtido, algumas vezes, em condições insalubres, resultando em contaminações por patógenos (FAVA et al., 2012).

De acordo com Carmo et al. (2005), os surtos de DTA podem ser investigados por meio da identificação etiológica laboratorial, exames clínicos, bromatológicos ou por critérios epidemiológicos. Por esses métodos é possível obter conclusões sobre os agentes etiológicos, veículo, local de ocorrência e demais características pertinentes. Já segundo Silva et al. (2010), os alimentos podem conter uma extensa variação e quantidade de microorganismos que podem alterar a vida de prateleira ou veicular doenças a quem os consome.

Em estudo realizado por Melo et al. (2013) que, ao avaliarem 108 amostras de queijos artesanais da região serrana de Santa Catarina, constataram que 63 amostras (58,33%) foram positivas para coliformes totais. Trinta e seis (33,33%) das 108 amostras analisadas apresentaram contagens acima do permitido pela legislação sanitária ( $10^3$  UFC/g) para *Staphylococcus* coagulase positiva, e em 3 amostras (2,77%) foi constatada a presença da bactéria *Listeria monocytogenes*.

Em outro estudo, Bergman et. al. (2007) analisaram 62 amostras de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul e 45 amostras (72%) apresentaram contagens médias para coliformes a 45°C acima dos

valores estabelecidos pela legislação ( $5 \times 10^3$  UFC/g), sendo possível indicativo da presença de microrganismos patogênicos como a *Escherichia coli* (APOLINÁRIO et al., 2014). Sousa et al. (2014), ao avaliarem a qualidade microbiológica de queijos de coalho provenientes de seis estados do Nordeste, constataram que, do total de 104 amostras analisadas, verificou-se que 100 (96,15%) estavam fora dos limites aceitos pela ANVISA, para *Staphylococcus coagulase positiva*. Em outro estudo, Evangelista-Barreto et al. (2016), detectaram contagens superiores a  $5 \times 10^2$  UFC g<sup>-1</sup>, valor preconizado pela ANVISA para *Staphylococcus coagulase positiva*, em 86% das amostras de queijo-coalho provenientes da cidade de Cruz das Almas, Bahia.

## **2.3 Microrganismos indicadores de condições higiênicossanitárias e microrganismos patogênicos**

O alimento contaminado pode apresentar características alteradas, mas, nem sempre perceptíveis, e a maioria dos surtos tem sido relacionados à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração sensorial (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2006). Alimentos contendo baixas contagens de microrganismos podem não causar surtos alimentares, porém, se estes alimentos forem conservados em condições que permitam a multiplicação desses microrganismos, as chances para a ocorrência de surtos aumentam significativamente (OLIVEIRA, et al., 2010).

### **2.3.1 Microrganismos indicadores**

Grupos ou espécies de microrganismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Esses microrganismos podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à vida de prateleira ou à segurança, neste último caso, devido à presença de patógenos alimentares. Em geral, microrganismos indicadores são utilizados para avaliar aspectos de qualidade e sanificação durante a produção e

comercialização dos alimentos (WELKER, et al., 2010; FIGUEIREDO, 2001). Entre os microrganismos indicadores têm-se os coliformes termotolerantes, que são definidos como bactérias gram negativas capazes de fermentar lactose com produção de gás, quando incubados à temperatura de 45°C. A contagem de coliformes termotolerantes fornece com maior segurança, informações sobre as condições higienicossanitárias do produto, sendo *Escherichia coli* a principal bactéria representante deste grupo e considerada a indicadora mais específica de contaminação fecal recente (TAKAYAYANAGUI, 2001).

## **2.3.2 Microrganismos Patogêncios**

### **2.3.2.1 *Salmonella* spp**

É uma bactéria entérica responsável por infecções alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos alimentares (MAIJALA, 2005; TESSARI, 2003). Franco e Landgraf (2008) abordam que as salmonelas estão amplamente distribuídas na natureza, sendo o principal reservatório natural o trato intestinal de mamíferos, pássaros e répteis. São bacilos gram negativos não formadores de esporos, catalase positiva e oxidase negativa, anaeróbios facultativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. São mesófilas, com crescimento entre 5°C a 47°C e pH 4,0 - 9,0, com crescimento ótimo a 37°C e pH 7,0 (SILVA JÚNIOR, 2008).

Conforme Martins (2006) e Franco et al. (2008) a contaminação se dá por via fecal-oral, através de alimentos contaminados, durante o processo de preparação e manipulação. As doenças causadas pela bactéria podem ser separadas em três grupos: febre tifoide, febre entérica e salmonelose. Os sintomas podem ser muito graves como febre alta, diarreia e vômitos, podendo levar a septicemia e atingir vários órgãos. Germano (2006) e Trabulsi (2004) ressaltam que a maioria dos sorotipos desse gênero é patogênica ao homem, apresentando diferenças de sintomatologia em decorrência da variação no mecanismo de patogenicidade, além da idade e da resposta imune do hospedeiro.

Em análise de Silva (2002) e Esurech (2006) concluiu-se que o sorotipo predominante de *Salmonella* causador de infecções alimentares mudou nas últimas décadas de *S. agona*, *S. hadar* e *S. typhimurium* para *S. enteritidis*, sendo a *S.*



*enteritidis* a causa predominante de salmoneloses em diversos países. Conforme Huang (1999) e Pelczar (1996) normalmente a dose infectante depende do sorotipo isolado oscilando entre  $10^6$  e  $10^8$  UFC (15 – 20 células): As infecções por *Salmonella* podem decorrer por ingestão de carnes cruas ou mal cozidas, produtos de ovos, leite cru, sendo que a bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a  $70^\circ\text{C}$  (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010).

### **2.3.2.2 *Listeria monocytogenes***

É considerada um dos mais relevantes patógenos veiculados por alimentos, afetando várias espécies de aves e mamíferos, incluindo o homem (MANTILLA, 2007). São bacilos medindo de  $0,4\ \mu\text{m}$  a  $0,5\ \mu\text{m}$  de diâmetro e  $0,5\ \mu\text{m}$  a  $2\ \mu\text{m}$  de comprimento. São gram positivas, psicrotróficas, possui flagelos, aeróbias ou anaeróbias facultativas, não esporuladas e não formadoras de cápsulas (FORSYTHE, 2010; CRUZ et al., 2008). As temperaturas favoráveis ao crescimento se dão entre  $20^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ , mas também multiplica-se em temperaturas de refrigeração ( $2^\circ\text{C}$  a  $4^\circ\text{C}$ ), fato que a torna de importância em alimentos (SÁ; FERREIRA, 2007). Desenvolve-se em pH entre 4.3 – 9.6, além de tolerar concentrações salinas elevadas ( $\geq 10\%$ ) (MANTILLA et al., 2010; SILVA, 2009).

*Listeria monocytogenes* encontra-se largamente dispersa na natureza, tendo sido isolada de uma grande variedade de locais, tais como o solo, forragens, água, lodo, silagem, vegetação deteriorada, esgoto e fezes (SÁ; FERREIRA, 2007). Em indivíduos saudáveis, pode ser encontrada como parte da microbiota gastrointestinal (KRINDGES et al., 2010). É considerado um patógeno oportunista, pois a infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados. Supõe-se que nas próximas décadas ocorra elevação do número de casos, apesar dos esforços das indústrias de alimentos e das autoridades, uma vez que, o número de indivíduos susceptíveis e grupos vulneráveis na população tendem a crescer. Outro fator que pode contribuir para esta elevação é a demanda, por parte dos consumidores, de alimentos processados cada vez mais semelhantes ao produto in natura e com vida de prateleira mais longa (CRUZ et al., 2008).

A listeriose é uma infecção bacteriana severa de grande importância na saúde pública, com alta taxa de mortalidade (20% a 30% em populações de risco) (CRUZ et

al., 2008). No Brasil, ainda é desconhecida por uma parte considerável da população (SILVA, 2009), embora, seja a responsável pela maioria dos casos de morte decorrente de toxinfecções alimentares (RATTI, 2006). Na década de 1980 ocorreram, no mundo, vários surtos de listeriose. Conforme Cruz et al. (2008), no Brasil, os surtos e/ou casos de listeriose são subdiagnosticados e/ou subnotificados. Além da falta de preocupação por parte das autoridades de saúde pública em relação à sua disseminação, não há estatísticas oficiais de casos de listeriose, uma vez que, sua notificação não é obrigatória. É altamente perigosa por se tratar de um microrganismo oportunista acometendo pessoas pertencentes a grupos de risco tais como pacientes imunodeprimidos, idosos, crianças, mulheres grávidas e parturientes (MANTILLA et al., 2010; CRUZ et al., 2008; KRINDGES et al., 2010).

Os sintomas de listeriose geralmente são inespecíficos, como sintomas gripais, incluindo febre persistente ou sintomas gastrointestinais, como náuseas, vômitos e diarreia, mas também pode ocasionar, em gestantes, aborto (principalmente no segundo ou terceiro trimestre) morte fetal, trabalho de parto prematuro e infecção neonatal. Pode causar também septicemia e meningoencefalites com mortalidade elevada (SÁ; FERREIRA, 2007; MANTILLA et al., 2010; SILVA, 2009; KRINDGES et al., 2010).

No momento do parto, o recém-nascido pode ser infectado resultando em meningite (JAY, 2005). Na fase entérica, a sintomatologia é semelhante a da gripe, acompanhada de diarreia e febre moderada. Os surtos e casos de listeriose têm sido associados a diversos alimentos tanto de origem animal como vegetal (SILVA, 2009). Em geral, o consumo de leite cru e seus derivados estão entre os produtos alimentícios mais frequentemente envolvidos na transmissão de *Listeria monocytogenes* (BARANCELLI, 2011). Devido a este fato, ressalta-se a importância em optar por alimentos submetidos à cocção, consumir apenas leite que passou pelo processo de pasteurização, e também optar por queijos, os quais forem elaborados a partir de leite pasteurizado (SILVA, 2009). A dose infectante é desconhecida, mas, acredita-se, variar conforme a cepa/linhagem e a susceptibilidade da vítima podendo variar entre  $10^3$  -  $10^9$  UFC/g ou mL (DALTON et al., 1997).

### 2.3.2.3 *Staphylococcus spp*

O gênero *Staphylococcus spp.* apresenta-se como bactérias gram positivas, cujo diâmetro oscila entre 0.5 e 1.5 micras e se assemelha com cachos de uva (HARRIS et al., 2002). São imóveis, não esporuladas e, geralmente, não capsuladas. As espécies de *Staphylococcus* podem ser catalase positiva, coagulase positiva, oxidase negativa e termonuclease (TNase) positiva. Atualmente, existem 49 espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo *Staphylococcus aureus* a mais importante em alimentos (DSMZ, 2013). Entretanto, existem outras espécies que possuem um potencial interesse em alimentos: *S. hyicus*, *S. chromogens*, *S. intermedius* (FRANCO & LANDGRAF, 2008; HOLT & BERGEY, 1994).

*Staphylococcus aureus* é um importante agente patogênico capaz de causar uma ampla gama de infecções, e ainda é responsável por surtos de intoxicação alimentar (SILVA et al., 2010; FRANCO & LANDGRAF, 2008). A maioria das cepas de *Staphylococcus aureus*, contém em sua parede externa o fator de coagulação, coagulase ligada, que se liga ao fibrinogênio e o converte em fibrina insolúvel, sendo importante fator de virulência. A sua detecção é utilizada para identificação desta espécie (MURRAY, 2009). *Staphylococcus spp.* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, com pH ótimo em torno de 7,0, mas é possível sua multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,0 e 9,3 (SANTANA et al., 2010). A temperatura ótima para multiplicação é de 37°C, podendo produzir enterotoxinas termorresistentes a temperaturas entre 10 e 46°C e suas colônias apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes (SANTOS, 2007). *Staphylococcus* está presente de forma frequente nas vias aéreas superiores do homem, podendo facilmente se disseminar para as mãos dos manipuladores, que por sua vez, contaminam o alimento (FORSYTHE, 2013).

A intoxicação alimentar por estafilococos é uma das DTA mais comuns e resulta da ingestão de enterotoxinas estafilocócicas (EE) pré-formadas em alimentos, caso haja condições favoráveis como temperatura acima de 10°C (HENNEKINNE et al., 2012). O diagnóstico de intoxicação alimentar por estafilococos, de uma forma geral, é confirmado pela identificação de contagens superiores a  $10^5$  UFC g<sup>-1</sup> de *Staphylococcus aureus* remanescentes nos alimentos (SANTANA, 2006). Para a detecção de EE, vários métodos foram desenvolvidos como os biológicos, imunológicos e moleculares. O desenvolvimento das técnicas moleculares permitiu a

utilização de ferramenta para detecção da sequência de nucleotídeos do gene responsável pela produção de enterotoxina pelos estafilococos (SANTANA et al., 2010).

As EE em alimentos são produzidas por várias cepas de *Staphylococcus aureus*. Cinco EE clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) são as causas mais comuns de DTA por *Staphylococcus aureus* (KIM et al., 2011). Estas toxinas são proteínas básicas constituídas por 220-240 aminoácidos e têm pesos moleculares semelhantes de 25-30 kDa. A SEA é mais freqüentemente envolvida na intoxicação alimentar, a SEB é a toxina mais resistente ao calor (estável a 60°C por 16h) e a ação de enzimas proteolíticas gastrointestinais, tais como a quimotripsina e tripsina; a SEC é uma proteína altamente conservada, seus antígenos são divididos em três subtipos: SEC1, SEC2 e SEC3; a SED é o segundo sorotipo mais comum nas intoxicações alimentares; enquanto que a SEE é raramente relatada em alimentos e em animais envolvidos na produção de alimentos, e seu envolvimento em surtos também é pouco frequente (BHUNIA, 2008; ARGUDÍN, MENDOZA & RODICIO, 2010). Além disso, 16 novos tipos de EE ou superantígenos (SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SES, SET, SEU e SEV) também foram descritas e avaliadas (KIM et al., 2011).

*Staphylococcus aureus* pode ser inativado durante o processamento de alimentos, pois é sensível ao calor, no entanto, suas enterotoxinas não são eliminadas (HENNEKINNE et al., 2012). Segundo Wu (2016), a intoxicação resulta em uma resposta inflamatória em todo o trato gastrointestinal, caracterizada por danos no jejuno e íleo. As crianças podem adoecer por ingestão de 100 ng de EE.

A ANVISA preconiza apenas a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva em alimentos, e possivelmente, por isso, são as espécies mais estudadas, entretanto, espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, são frequentemente isolados em alimentos, também com produção de EE e têm sido envolvidas em uma variedade de infecções humanas e animais (BRASIL, 2001; CUNHA et al., 2006; JUNQUEIRA et al., 2009).

### **3 Projeto de Pesquisa**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Nutrição**  
**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



Projeto de Pesquisa

**Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres**

**Josiane Costa Gonçalves**

Pelotas, 2018

**Josiane Costa Gonçalves**

**Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres**

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador – Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kelly Lameiro Rodrigues

Co-orientador – Prof. Dr. Eliézer Ávila Gandra

Pelotas, 2018

Josiane Costa Gonçalves

Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Lameiro Rodrigues (Presidente)

Prof Dr. Eliézer de Ávila Gandra (Suplente)

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helenice Gonzalez de Lima (Membro efetivo)

## Resumo

GONÇALVES, Josiane Costa Gonçalves. **Qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres**. 2019. 33f. Projeto de Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O queijo artesanal possui características peculiares, destacando-se a intensidade e variação de sabor que justificam seu consumo crescente. O desenvolvimento do sabor e aroma no queijo elaborado a partir de leite cru ocorre principalmente pela variada microbiota existente e enzimas naturais do leite. Alguns fatores como clima, altitude e a pastagem contribuem para que o queijo produzido de forma artesanal tenha um sabor típico e único. No entanto, a maioria dos queijos artesanais é fabricada de maneira rudimentar seguindo tecnologias utilizadas pelos seus antepassados, onde, muitas vezes, não se seguem as boas práticas de fabricação, armazenamento e comercialização. Este fato pode propiciar algumas contaminações por microrganismos indesejáveis, que acarretam perdas econômicas aos produtores, além de risco à saúde do consumidor. Essas contaminações, em sua grande maioria, podem ter origem na qualidade do leite destinado à fabricação, assim como dos ingredientes utilizados, técnicas de fabricação e maturação. Para este trabalho, será coletada, no mínimo, uma amostra de queijo de cada banca em todas as feiras que apresentarem venda de queijo na cidade de Pelotas, simulando uma situação real de compra. As amostras de queijo serão analisadas no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Nutrição – Universidade Federal de Pelotas por meio da contagem de Coliformes Termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva, pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*. Além disso, verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E nas cepas de *Staphylococcus* spp isoladas.

**Palavras chave:** microrganismos; leite cru; doenças transmitidas por alimentos; saúde pública.



## 1 Introdução

Por aproximadamente dois séculos, a prática queijeira foi disseminada e transmitida através das gerações, de modo a contribuir para a sobrevivência e permanência associada às raízes. A produção de queijos artesanais está enraizada na história da vida de homens e mulheres que compartilham a mesma identidade cultural (MENEZES, 2011).

A qualidade sensorial apreciada e o valor nutritivo são características dos queijos artesanais, assim como, uma microbiota rica e diversificada, quando comparada ao queijo elaborado com leite pasteurizado. Com a facilidade de combinar seu paladar com diversos outros produtos, os queijos artesanais, vêm compondo a dieta alimentar, devido a sua alta digestibilidade, especialmente em pessoas acometidas por obesidade e distúrbios gastrointestinais (HARTMANN et al., 2010).

O queijo obtido através de leite cru e posteriormente maturado possui características sensoriais desejáveis, que são atribuídas à sua complexidade microbiológica e à sua biodiversidade, que, por sua vez, afetam positivamente sua bioquímica (PERRY, 2004). Como são produtos altamente apreciados e consumidos, há necessidade em garantir a sua segurança microbiológica, assim como seu controle de qualidade, uma vez que o gado brasileiro não está livre de doenças, tuberculose e brucelose, que podem ser transmitidas ao homem por meio do leite e seus derivados (PICOLI et al., 2006).

A legislação brasileira permite o uso de leite não pasteurizado para a produção de queijos definidos como maturados. Neste caso, o prazo de maturação deve ser de 60 dias (BRASIL, 1996), ou inferior, quando estudos técnico-científicos comprovem que a redução no tempo de maturação não compromete a qualidade e inocuidade do produto (BRASIL, 2013), utilizando-se sempre boas práticas de fabricação, leite de alta qualidade e rigorosa higiene no local de produção. O ponto crítico durante a elaboração é a obtenção higiênica do leite, uma vez que o animal, os equipamentos e o ambiente da ordenha podem representar uma fonte importante de contaminação por microrganismos (CAMPGNOLLO et al., 2018).

O queijo artesanal produzido no sul do Rio Grande do Sul, de forma geral, não contempla as exigências sanitárias legais vigentes. Na maioria dos casos, a produção de queijo ocorre nas propriedades rurais, onde o leite não é submetido à

pasteurização e, tampouco posteriormente ao processo de maturação adequado, comprometendo a qualidade e a inocuidade do produto (SCHMITT et al., 2011).

A umidade, o pH próximo à neutralidade, a disponibilidade de nutrientes aliados à excessiva manipulação do queijo de produção artesanal, representam condições propícias para a contaminação, a sobrevivência e a multiplicação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, tornando-o um potencial causador de toxinfecções alimentares (WAGNER; GEHLEN e WIEST, 2004; ZEGARRA et al., 2009).

A quantificação de microrganismos indicadores prediz informações sobre a ocorrência de contaminações de origem fecal no produto, provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de indicarem condições sanitárias inadequadas no processamento, produção ou armazenamento. (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Os microrganismos patogênicos, quando presentes no leite cru podem ser veiculados pelo consumo de queijo, dentre eles, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.* (GERMANO; GERMANO, 2011). *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico que pode produzir enterotoxina estafilocócica pré formada no alimento, caso haja condições para este fato, que são temperatura acima de 10°C e população acima de 10<sup>5</sup> UFC/g (WILIAMS et al, 2000). As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, são termoestáveis, resistentes às enzimas proteolíticas e são produzidas quando há multiplicação das células. A ingestão de uma dose inferior a 1 ug, pode provocar os sintomas de intoxicação incluindo náuseas, vômitos, cólicas, prostração, pressão baixa e queda de temperatura entre duas a seis horas pós ingestão e essa quantidade é atingida quando a população de *Staphylococcus aureus* alcança valores superiores a 10<sup>6</sup> UFC/g de alimento (SILVA et al., 2007.) Outro patógeno de importância para segurança dos alimentos, que também pode estar presente no leite cru é *Listeria monocytogenes*, podendo causar vários sintomas incluindo febre, fadiga, mal-estar, náusea, vômitos, dores, diarreia e até mesmo comprometimento do sistema nervoso central causando meningite, encefalite e abscessos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Vários estudos têm apontado qualidade higiênica insatisfatória e a contaminação de produtos lácteos de massa crua por microrganismos patogênicos, evidenciando risco ao consumidor e um grave problema de saúde pública (ZAFFARI; MELLO e COSTA, 2007; ZEGARRA et al., 2009).

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas-RS e verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas destes queijos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar a umidade das amostras de queijo;
- Avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas-RS por meio da contagem de coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* spp, pesquisa de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*;
- Verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E nas cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas dos queijos artesanais comercializados em feiras livres.

## **3 Hipóteses**

- Há contaminação por coliformes termotolerantes, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* spp. em queijos artesanais comercializados em feiras livres
- *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais apresentam genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

## **5 Material e Métodos**

### **5.1. Amostragem**

Segundo Secretaria de Desenvolvimento Rural do município de Pelotas é estabelecido o funcionamento e regularidade de 37 feiras livres atendendo a demanda da população na cidade, sendo estas distribuídas em vários bairros, em diferentes dias e turnos da semana (SDR, 2018).

Para a avaliação da qualidade microbiológica dos queijos artesanais serão coletadas, no mínimo, uma amostra de queijo de cada banca em todas as feiras que apresentarem venda de queijo, conforme diferentes dias e turnos da semana. As amostras serão adquiridas entre os meses de agosto e setembro de 2018, por meio de simulação de uma situação real de compra, onde o próprio pesquisador fará a compra do produto.

As amostras serão transportadas em recipiente isotérmico, contendo gelo reciclável e serão mantidas refrigeradas até o momento da análise que ocorrerá no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas.

## **5.2 Análise Físico-química**

### **5.2.1 Análise de umidade**

A análise de umidade será realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), de acordo com a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Serão pesados em balança analítica cerca de 10g da amostra, em cápsulas de alumínio previamente secas em estufa e pesadas na mesma balança. As cápsulas contendo as amostras serão colocadas em estufa com ventilação a 105 °C por 12 horas. Após serem retiradas da estufa, as amostras serão colocadas em dessecador com gel de sílica até atingirem temperatura ambiente. Serão então pesadas novamente na mesma balança analítica e o resultado do teor de umidade será obtido por diferença de peso (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

## **5.3 Análises microbiológicas**

As metodologias utilizadas para as análises microbiológicas serão as recomendadas pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2001) e também International Organization for Standardization (ISO, 1996).

Para a quantificação de coliformes termotolerantes serão pesados 25 gramas (g) da amostra e adicionada a 225 mililitros (mL) de água peptonada (0,85%). A partir

desta diluição inicial, outras diluições decimais serão preparadas para a contagem de coliformes pelo método do Número Mais Provável (NMP - 3 tubos). Um mililitro de cada diluição será transferido para tubos contendo 10 mL de caldo Lauril Sulfato de Sódio (LST) com tubos de fermentação, sendo incubados a 35°C por 48 horas. Uma alçada de material de cada tubo positivo (turvação e formação de gás) será transferida para tubos contendo 10 mL de caldo Escherichia coli (EC) e tubos de Durham, sendo incubados a 45°C por 48 horas. Resultados de tubos positivos do caldo EC serão utilizados para estimar as contagens de coliformes termotolerantes com o auxílio da tabela do NMP.

Para análise de *Salmonella* spp., inicialmente será realizado um pré-enriquecimento de 25g de queijo em 225 mL de Água Peptonada Tamponada incubando-se a 37°C por 24h previamente homogeneizada em sacos estéreis.... Após a incubação, será transferido 1mL para o caldo Tetrionato (TT), adicionado de 0,1mL de verde brilhante e 0,2mL de iodo, e 0,1mL para o caldo Rappaport-Vassiliadis seguido de incubação a 42°C por 24h. A partir desses meios de enriquecimento seletivo, será semeado em ágar Hektoen (HE) e ágar Xilose-lisina-desoxicolato (XLD), seguido de incubação a 37°C por 24h. Colônias consideradas características serão submetidas a testes bioquímicos e sorológicos.

Para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva serão pesados 25g da amostra e adicionada a 225 mL água peptonada (0,1%) em sacos de homogeneização, preparando-se, a partir desta diluição inicial, outras 2 diluições decimais. Serão inoculados 0,1 mL de cada diluição em placas de Ágar Baird Parker (ABP) enriquecido com emulsão gema de ovo e telurito de potássio, pela técnica do espalhamento em superfície. As placas serão incubadas a 37°C por 48 h e, após esse período, as colônias presuntivas típicas e atípicas serão contadas. Serão consideradas colônias típicas aquelas circulares, lisas, convexas, de 2-3 mm de diâmetro, negras com textura úmida, bordas esbranquiçadas e rodeadas por uma zona opaca e frequentemente com um halo transparente. Para as colônias atípicas, serão consideradas, aquelas negras ou acinzentadas com um ou dois halos e também aquelas sem halos. Será inoculada uma alçada de cada colônia selecionada em Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) que serão incubadas a 37°C por 24 h. Posteriormente, serão transferidos 0,2 mL do cultivo em BHI para um tubo contendo Coagulase Plasma EDTA 0,5 mL (teste coagulase), e este será incubado a 37°C por 6

h. Aqueles que não formarem nenhum coágulo serão considerados negativos, os demais positivos. Todos os isolados serão armazenados congelados em caldo BHI e glicerol para realização da verificação da presença de gene codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* será realizada conforme a metodologia preconizada pelo *International Organization for Standardization*, ISO 11.290-1 – *Detection method* (ISO, 1996), com modificações. A etapa de pré-enriquecimento será realizada em Caldo Enriquecimento Listeria (LEB), com incubação a 30°C por 24 horas, seguida da incubação de uma alíquota em caldo Fraser (adicionado de suplemento SR 0156E Oxoid®) a 35°C por 48 horas. Após, será realizada semeadura nos ágar Oxford (adicionado de suplemento SR 0140E Oxoid®) e Palcam (adicionado de suplemento SR 0150E Oxoid®) a 35°C por 48 horas. Os isolados purificados serão submetidos a testes fenotípicos de motilidade, fermentação de carboidratos (dextrose, xilose, ramnose e manitol), presença de catalase e de  $\beta$ -hemolisina.

#### **5.4 Verificação da presença de gene codificadores de enterotoxinas estafilocócicas**

O DNA cromossomal será extraído de isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e coagulase negativa utilizando um kit comercial (PureLink Genomic DNA – K1820-01, Invitrogen®). Para verificar a concentração e presença do DNA bacteriano extraído, serão realizadas leituras de todas as amostras por meio de espectrofotômetro e posteriormente a amplificação do gene rRNA 16S utilizando primers universais 27F (5'-AGATTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991). Serão preparadas reações contendo 17  $\mu$ L de mistura especial para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), 1  $\mu$ L de cada primer, 1  $\mu$ L da amostra de DNA e 1  $\mu$ L de água ultrapura (Milli-Q), totalizando 20  $\mu$ L de volume final. A PCR será realizada em termociclador utilizando o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial de 95°C durante 5 minutos, 35 ciclos (95°C – 0,5'; 50°C – 1' e 72°C – 1') e extensão final a 72°C por 7min. Os produtos amplificados pela PCR serão visualizados após eletroforese em gel de agarose 1% corado com Syber Safe (Invitrogen®).

O DNA extraído será submetido à técnica de reação em cadeia da polimerase

(PCR) a fim de verificar a presença dos genes codificadores de EEs A, B, C, D e E. Os primers para identificação dos genes das EEs serão os definidos por Mehrotra, Wang, & Johnson (2000). Serão preparadas reações contendo 50 µl de PCR SuperMix (Invitrogen®), 3 µl da combinação de primers de acordo com Mehrotra, Wang, & Johnson (2000) e 2µl da amostra de DNA, totalizando 55 µl de volume final. A PCR será realizada em termociclador utilizando o seguinte protocolo térmico: desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos, 35 ciclos (94°C – 2'; 54°C – 2' e 72°C – 1') e extensão final a 72°C por 7min.

Os produtos da PCR serão visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen) corado com Syber Safe (Invitrogen), em tampão TBE 0,5X, sob luz ultravioleta e fotografados (Kodak Digital Science™ DC120). O controle negativo das reações consistirá da mesma composição da reação de PCR, porém com água Milli-Q estéril no lugar do DNA. Serão utilizados DNAs de *Staphylococcus aureus* ATCCs 13565 (SEA), 14458 (SEB), 19095 (SEC), 23235 (SED) e 21664 (SEE) como controles positivos.

## **6 Análise estatística**

O software SPSS (SPSS Inc, Chicago, versão 17.0, 2008) será usado para construir um banco de dados para descrição dos dados e análise de variância.

## 7 Cronograma

Atividades	2017					2018					2019															
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J		
Revisão Bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Elaboração do projeto	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x															
Qualificação											x															
Coleta e análises microbiológicas das amostras													x	x	x	X										
Análise molecular																		x	x							
Digitação dos dados e análise dos resultados																				x	x					
Elaboração da dissertação e artigos																								x	x	x
Defesa da dissertação																									x	



## 8 Orçamento

Materiais	Valor total (R\$)
Meios de cultura para isolamento das bactérias	2.000,00
Plásticos (ependorfs, ponteiras, placas de Petri)	540,00
Material para PCR e Eletroforese	2.500,00
Queijos	500,00
<b>Total</b>	<b>5.540,00</b>

\*Os recursos financeiros serão obtidos por meio do PROAP-PPGNA e de outros projetos com recursos financeiros dos orientadores.

#### **4 Relatório de campo**

Do total de 37 feiras livres que ocorrem no município de Pelotas, oito não comercializavam queijo, o que resultou em um número inferior de amostras (n=29). As análises microbiológicas foram realizadas conforme previsto no projeto.

Os isolados de *Staphylococcus* spp., foram testados quanto à presença dos genes produtores das EE clássicas (A, B, C, D e E). Porém houve uma mudança na metodologia prevista no projeto, não utilizando-se o kit comercial e sim reagentes disponíveis no laboratório de biologia molecular, o que reduziu o valor despendido nestas análises.

Os resultados obtidos serão enviados à Vigilância Sanitária Municipal, de forma a contribuir com informações sobre as condições higienicossanitárias de queijos artesanais comercializados em feiras livres no município de Pelotas.

## 5 Artigo

**Título:** Avaliação microbiológica e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em isolados de queijos artesanais comercializados em feiras livres em Pelotas - RS

**Revista:** International Journal of Food & Technology

**Qualis em Nutrição:** B1

**Avaliação microbiológica e detecção de enterotoxinas estafilocócicas em isolados de queijos artesanais comercializados em feiras livres em Pelotas -**

**Microbiological evaluation and detection of staphylococcal enterotoxins in artisanal cheese isolates marketed in free markets in Pelotas - RS**

Josiane da Silva Costa, Carlos Castilho de Barros, Eliézer de Ávila Gandra, Kelly Lameiro Rodrigues

Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição,  
Universidade Federal de Pelotas, Campus Anglo, Pelotas, RS, Brasil

Contato: 53 32843031, email: [josi0508@hotmail.com](mailto:josi0508@hotmail.com)

Endereço: Rua Gomes Carneiro nº 1/Campus Anglo /Porto /Pelotas/RS CEP:  
96075630

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas-RS e verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E em isolados de *Staphylococcus* spp. Foram realizadas análise de teor de umidade, presença de *Salmonella* spp e de *Listeria monocytogenes*, e contagem de coliformes termotolerantes e de *Staphylococcus* spp. em vinte e nove amostras de queijo comercializadas em feiras livres. Foi detectada ausência de *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes* em todas as amostras. Os resultados apresentaram-se acima do permitido pela legislação vigente para contagem de coliformes termotolerantes em 13,8% (n=4), e para *Staphylococcus* coagulase positiva em 76% (n=22) das amostras. Os isolados de *Staphylococcus* spp. (n=29), sendo 23 (79%) coagulase positiva e 6 (20%), coagulase negativa foram submetidos ao teste PCR para verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D e E. Foram identificados os genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas B em 6,89% (n=2) e C em 13,79% (n=4) dos isolados, sendo estes, cinco coagulase positiva e um isolado coagulase negativa. Os queijos comercializados em feiras livres apresentaram contagens acima do limite estabelecido pela legislação, assim como foi constatada a presença dos genes codificadores para entrotoxinas clássicas B e C em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa.

**Palavras-chave:** alimento, consumidor, derivados, legislação, leite, segurança dos alimentos.

## Introdução

Os queijos elaborados de forma artesanal participam da identidade sociocultural de algumas regiões com produção transmitida através das gerações, utilizando o leite cru como matéria prima que deverá ser de qualidade, a fim de minimizar riscos aos consumidores (Medeiros et al., 2017). É um produto bastante apreciado e consumido devido seu sabor característico quando comparado aos queijos produzidos a partir de leite pasteurizado (Yoon et al., 2016). Fabricados de forma tradicional, ganham a preferência dos consumidores, comercializados a preços acessíveis, baseando-se no mercado informal, onde frequentemente não se aplicam taxas, impostos, exigências de fabricação e normas de padronização das características técnicas de identidade e qualidade deste produto (Silva et al., 2017).

Em sua grande maioria, os queijos artesanais são produzidos a partir de leite sem tratamento térmico prévio, processados por pessoas não capacitadas, sem aplicação de boas práticas e pouco submetidos a controles de qualidade, sendo estes queijos sujeitos a diversos tipos de contaminações (Garcia et al., 2016). Habitualmente são comercializados em feiras livres, sem controle de qualidade, com temperaturas inadequadas de armazenamento, mau acondicionamento, e não são devidamente inspecionados pelos órgãos competentes (Amorim et al., 2015).

O queijo tipo artesanal fresco, por apresentar alto teor de umidade, é um produto perecível e bastante manipulado, apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação microbológica. Alguns autores relatam a inadequada qualidade microbológica de queijos frescos produzidos em pequenas agroindústrias não inspecionadas (Amorim et al., 2015; Valiatti et al., 2015; Dias et al., 2016). Gould et al. (2014) citam que, surtos relacionados a doenças transmitidas por alimentos (DTA) decorrente do consumo de queijos, especialmente fabricados a partir

de leite cru, resultaram em grande número de hospitalizações e foram atribuídos ao consumo de queijos fabricados ou comercializados de forma ilegal nos Estados Unidos. No Brasil, o leite e seus derivados representam 7,8% dos alimentos envolvidos em surtos de DTA's na última década. Os agentes etiológicos mais identificados em surtos de DTA foram *Escherichia coli* (23,4%), *Salmonella* spp (11,3%), *Staphylococcus aureus* (9,4%) e Coliformes (6,5%) (Brasil, 2019).

Se a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) presente no alimento, estiver acima de  $10^5$  UFC/g, poderá ocorrer produção de toxinas, que podem resultar em surtos de intoxicação alimentar, caso haja condições favoráveis de temperatura para produção da toxina, entre 10 e 46°C (Bennett, Walsh e Gould, 2013).

*Staphylococcus* spp pode ser inativado durante processamento de alimentos, pois é sensível ao calor, no entanto, suas enterotoxinas são altamente resistentes ao calor e à maioria das enzimas proteolíticas, que permitem a preservação de sua atividade no trato gastrointestinal (Hennekinne et al., 2012; Podkowik et al., 2013; Ho, Boost e O'donoghue, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) preconiza somente a análise de SCP em alimentos, sendo estas as espécies mais estudadas. Entretanto, estudos brasileiros já demonstraram a presença de gene de Enterotoxinas estafilocócicas (EEs) em espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) oriundos de diferentes tipos de alimentos apresentando também a capacidade de produzir EEs (Brasil, 2001; Oliveira et al., 2010; Lyra et al., 2013; Rall et al., 2014).

As EEs são divididas em diferentes tipos sorológicos, sendo as EEs clássicas (A, B, C, D e E) as mais estudadas, e as técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR) e multiplex PCR (mPCR), têm sido uma importante

ferramenta na detecção destes diferentes genes de EEs (Stamford et al., 2006; Germini et al., 2009; Pereira et al., 2009; Rodriguez et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em feiras livres do município de Pelotas-RS e verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas A, B, C, D e E em isolados de *Staphylococcus* spp.

## **Material e métodos**

### **Delineamento experimental e amostragem**

Os dados das feiras livres foram obtidos por meio da Secretaria de Desenvolvimento Rural do município de Pelotas-RS, Brasil, que indicou um total de 37 feiras que ocorrem em dias, turnos e diferentes locais distribuídos pelo município. Foi coletada uma amostra de queijo artesanal por feira, entre os meses de novembro e dezembro de 2018, totalizando 29 amostras, uma vez que oito feiras livres não comercializavam o produto. As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico, contendo gelo reciclável e analisadas imediatamente após a coleta no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

### **Análise Físico-química**

#### **Umidade**

Para verificar o teor de umidade das amostras de queijo, utilizou-se a metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), sendo realizada no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. De acordo com o teor de umidade, os queijos foram classificando como: baixa umidade

(até 35%), média umidade (entre 36,0 e 45,9%), alta umidade (entre 46,0 e 54,9%) e muita alta umidade (superior a 55%) (Brasil, 1996).

### **Análises microbiológicas**

As metodologias utilizadas para as análises microbiológicas foram as recomendadas pelo *Bacteriological Analytical Manual* (FDA, 2001) e International Organization for Standardization (ISO, 1996). A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada conforme a metodologia da *International Organization for Standardization*, ISO 11.290-1 – *Detection method* (ISO, 1996), com modificações.

### **Verificação da presença de genes codificadores de EE's A, B, C, D e E.**

Todos os isolados de SCP (n=23) e SCN (n=6) foram submetidos à análise molecular para verificação da presença de genes das EE's. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrifisiogenômica da UFPEL conforme Shaddock et al. (2015) com adaptações. Os primers para identificação dos genes das EEs foram os definidos por Mehrotra, Wang, & Johnson (2000) (tabela 1).

Tabela 1. Primers utilizados para identificação de gene de enterotoxinas de *Staphylococcus spp.*

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídica (5' 3')	Localização do gene	Produto de amplificação (pb)
EEA	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	349–368	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	431–450	
EEB	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAACTGAGC	666–685	164
	GSEBR-2	CCAATAGTGACGAGTTAGG	810–829	
EEC	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATG	432–455	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	863–882	
EED	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAG	492–514	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTT	750–769	
EEE	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCATCC	237–250	209
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGTCAATC	425–445	

pb: pares de base (Mehrotra, Wang, & Johnson, 2000).



Foram utilizados DNAs de *Staphylococcus aureus* ATCCs 13565 (SEA), 14458 (SEB), 19095 (SEC), 23235 (SED) e 21664 (SEE) como controles positivos.

### **Resultados e discussão**

Para análise dos dados, os queijos foram classificados quanto ao teor de umidade, sendo um (3,45%) classificado como queijo de baixa umidade, 10 (34,48%) como queijos de média umidade, 15 (51,72%) como queijos de alta umidade e três (10,34%) como queijos de muita alta umidade (BRASIL,1996).

Do total de 29 amostras analisadas, 22 (76%) apresentaram contagens acima do limite permitido pela legislação sanitária para SCP para queijos de média, alta e muita alta umidade (Tabela 2). De acordo com a ANVISA os limites microbiológicos estabelecidos para queijos são:  $< 10^3$  UFC/g (baixa, média e alta umidade) e  $5 \times 10^2$  UFC/g (muito alta umidade) (BRASIL, 2001).

Tabela 2. Resultados das análises microbiológicas que apresentaram contagens acima do recomendado pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes.

Amostras (umidade/número da amostra)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) <sup>1</sup>	Coliformes termotolerantes (NMP/g) <sup>2</sup>
Baixa umidade		
08	-	2,10 x 10 <sup>3</sup>
Média umidade		
13	6,40 x 10 <sup>4</sup>	-
16	4,45 x 10 <sup>3</sup>	4,60 x 10 <sup>4</sup>
20	8,45 x 10 <sup>5</sup>	-
21	6,70 x 10 <sup>4</sup>	-
24	9,30 x 10 <sup>5</sup>	-
25	1,60 x 10 <sup>4</sup>	-
26	5,40 x 10 <sup>5</sup>	-
27	1,43 x 10 <sup>6</sup>	-
Alta umidade		
02	6,90 x 10 <sup>3</sup>	-
03	-	2,40 x 10 <sup>4</sup>
04	3,35 x 10 <sup>5</sup>	-
05	1,50 x 10 <sup>5</sup>	-
06	3,05 x 10 <sup>3</sup>	-
07	9,05 x 10 <sup>3</sup>	-
09	1,50 x 10 <sup>5</sup>	-
11	7,55 x 10 <sup>4</sup>	-
12	3,0 x 10 <sup>4</sup>	-
15	-	2,40 x 10 <sup>4</sup>
17	5,60 x 10 <sup>6</sup>	-
18	5,85 x 10 <sup>4</sup>	-
28	3,55 x 10 <sup>5</sup>	-
Muita alta umidade		
01	3,10 x 10 <sup>5</sup>	-
14	8,65 x 10 <sup>5</sup>	-
23	4,05 x 10 <sup>6</sup>	-

<sup>1</sup> Unidade formadora de colônia por grama <sup>2</sup> Numero mais provavel por grama.

Os resultados encontrados mostram a inadequada qualidade higienicossanitária das amostras de queijos artesanais comercializados em feiras livres, o que pode estar relacionado à manipulação inadequada dos alimentos, podendo haver contaminação por *Staphylococcus* spp. (SILVA et al., 2017). A contaminação muitas vezes, ocorre através do manipulador que pode contribuir com alguns fatores, como o uso de adornos contaminados e a ausência de máscaras e luvas durante a manipulação dos alimentos (FORSYTHE, 2013).

Souza et al. (2017), referem que o hábito de higiene pessoal do manipulador é

fator primordial para evitar contaminações por *Staphylococcus aureus*. Da mesma forma, Nogueira et al. (2013), citam que a origem da contaminação por *Staphylococcus* spp. geralmente está relacionada à baixa qualidade da matéria-prima, falta de saneamento adequado de equipamentos e utensílios e inadequada higiene pessoal dos manipuladores de alimentos.

Em trabalho realizado por Sousa et al. (2014), ao avaliarem a qualidade microbiológica de queijos de coalho provenientes de seis estados do Nordeste, verificaram-se que 96,15% das amostras analisadas, estavam em desacordo com os parâmetros legislativos para SCP. Os autores destacam a importância do armazenamento em temperaturas inadequadas do queijo de coalho, podendo vir a favorecer o crescimento de microorganismos e, conseqüentemente, diminuindo a qualidade do produto final.

Em trabalho realizado por Evangelista-Barreto et al. (2016) foram detectadas contagens acima do permitido pela legislação, para SCP em 86% dos queijos de coalho analisados em seu trabalho com amostras provenientes da cidade de Cruz das Almas, Bahia. Pereira et al. (2017), ao analisarem sete queijos de coalho produzidos em sete queijarias a partir de leite, não pasteurizado em São Rafael, Rio Grande do Norte, constataram que todas as amostras analisadas estavam em desacordo com a legislação vigente para SCP.

Quatro (13,80%) amostras apresentaram contagens acima do permitido para coliformes termotolerantes (tabela 2), sendo os limites microbiológicos estabelecidos de  $5 \times 10^2$  NMP/g (queijos de baixa umidade),  $10^3$  NMP/g (média umidade),  $5 \times 10^3$  NMP/g (alta umidade) e  $5 \times 10^2$  NMP/g (muita alta umidade) (Brasil, 2001).

Estes resultados podem estar associados à ausência de tratamento térmico, baixa qualidade da água utilizada e manuseio inadequado do leite utilizado na

produção desses queijos (Dores et al. 2013). Níveis elevados de coliformes termotolerantes, relatados em amostras de queijo, podem estar relacionados à condições sanitárias deficientes de fazendas leiteiras, ou a problemas higienicossanitários no processo de ordenha e produção do queijo (Moraes et al., 2009; Sobrinho et al., 2012; Galinari et al., 2014 Pieri et al., 2014). Este grupo de bactérias coloniza o intestino de mamíferos e sua detecção pode indicar a presença de outros microrganismos patogênicos de origem entérica. Portanto, são frequentemente utilizados como indicadores de contaminação fecal (direta ou indireta) e de risco potencial de patógenos em alimentos (Franco & Landgraf, 2008).

Todas as amostras de queijo analisadas apresentaram ausência de *Salmonella* spp. estando em conformidade com a legislação vigente. Pereira et al. (2017), também constataram a ausência de *Salmonella* spp. ao analisarem sete amostras de queijo de coalho, produzidos a partir de leite cru no estado do Rio Grande do Norte. Em outro estudo, Evangelista-Barreto et al. (2016), também constataram ausência de *Salmonella* spp. em 28 amostras de queijos de coalho comercializados em Cruz das Almas, Bahia.

A ausência de *Salmonella* spp. pode estar relacionada com a presença de bactérias ácido lácticas no queijo, que tem capacidade de interferir na multiplicação de bactérias deteriorantes e patogênicas. Bactérias ácido lácticas podem contribuir para a conservação dos alimentos por longos períodos, pois fermentam os açúcares e reduzem o pH, inibindo o crescimento de microrganismos patogênicos (Saafeld et al., 2013; Azevedo et al., 2014). Este grupo de bactérias produz vários metabólitos secundários que exibem atividade antimicrobiana, como ácidos orgânicos, álcool etílico, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e surfactantes (Chen et al., 2014. Bouchard et al., 2015) inibindo assim, o crescimento de patógenos e restringindo a multiplicação da microbiota contaminante (Beltrão, 2017).

Diferentemente deste trabalho, Garcia et al. (2016) e Souza (2017), constataram a presença de *Salmonella* spp. em 63% e 40% das amostras de queijo fresco artesanal comercializados na região Norte e Sudeste de Minas Gerais, respectivamente. A presença deste patógeno foi relacionada às condições higiênicosanitárias inadequadas durante o processo de produção dos queijos, indicando expressiva necessidade de aperfeiçoamentos no processamento, armazenamento e/ou distribuição, de modo a garantir a qualidade microbiológica dos queijos.

Todas as amostras apresentaram ausência de *Listeria monocytogenes*, estando em conformidade com a legislação. Resultado semelhante encontraram Souza et al. (2017), ao avaliarem a qualidade microbiológica de sete amostras de queijo minas frescal artesanal, comercializado na zona da mata mineira, não identificando a presença de *Listeria monocytogenes* em seu estudo. A ausência foi justificada devido à elevada contagem de outros microrganismos no produto, tendo em vista a sua baixa capacidade de competição. Kobayashi et al. (2017) ao avaliarem a detecção de *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytógenes* em 38 amostras de queijo de produção informal na região metropolitana de São Paulo, também obtiveram resultados negativos para este mesmo patógeno. Uma possível explicação para a ausência de *Listeria monocytógenes* no estudo seria a ação antagônica de espécies bacterianas ao ácido láctico inibindo assim, microrganismos patogênicos indesejáveis como a *Listeria* (Marques et al., 2017).

Os isolados de *Staphylococcus* spp. (n=29), sendo 23 (76%) SCP e 6 (20%), SCN foram submetidos ao teste PCR para verificar a presença dos genes produtores de enterotoxinas estafilocócicas. Para interpretação dos resultados da análise molecular, foram consideradas as bandas com intensidade semelhantes ao controle e com maior intensidade que o branco. Os genes codificadores para EEA, EED e EEE, não foram

detectados nos 29 isolados SCP e SCN. O gene codificador para EEB, foi identificado em 6,89% (n=2), provenientes de SCP. Já o gene codificador para EEC foi identificado em 13,76% (n=4) isolados, sendo 1 proveniente de SCN e 3 provenientes de SCP.

Analisando-se os resultados obtidos no presente trabalho e de outros estudos apresentados na literatura, percebe-se que a detecção de genes toxigênicos em cepas de *Staphylococcus spp.* é variável. O envolvimento da EEE em surtos alimentares é pouco frequente, enquanto que a EEA é considerada a mais comum nos casos de intoxicação alimentar estafilocócica, seguida pela EED. (Oliveira, 2011; Argudín, Mendoza & Rodicio, 2010; Alibayov, Zdenkova, Sykorova & Demnerova 2014).

Em trabalho realizado por Rosa et al. (2015), genes codificadores de enteroxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE) não foram encontrados em *Staphylococcus spp.* isolados de queijos artesanais. Borelli et al. (2006) constataram ausência desses genes toxigênicos em 95 cepas de *Staphylococcus spp.* isoladas de queijos. Estes resultados indicam a possível presença no queijo de algum mecanismo inibidor da expressão de genes relacionados à produção de toxinas. (Martins et al., 2015).

Quando se trata de enterotoxinas clássicas, existe diferença entre países e inclusive entre regiões de um mesmo país (Liu et al., 2014), onde a ocorrência de fatores de virulência pode variar entre as estirpes de *Staphylococcus aureus*. Embora não identificada no presente trabalho, a enterotoxina A é considerada como a principal causa de intoxicações estafilocócicas alimentares, provavelmente devido à sua alta resistência a enzimas proteolíticas (Argudin, Mendoza e Rodicio, 2010; Guimarães et al., 2013; Nagaraj et al., 2014). No noroeste da China, em estudos de epidemiologia molecular de *S. aureus* isolados de surto de intoxicação alimentar, a

frequência do gene SEA foi de 57,1% (Li et al., 2015) e no Irã, a frequência deste gene foi de 30,7% (Nazari et al., 2014). Estudos realizados no sudeste do Brasil relatam que as maiores frequências observadas foram do gene SEA, (Rall et al. 2014, Veras et al., 2008; Dias et al. 2011; Guimarães et al., 2013; Rall et al., 2014, Acosta et al., 2017), com altas frequências tanto em cepas coagulase positivas e também em cepas coagulase negativas. Já em estudos realizados na região nordeste, o gene que codifica para esta enterotoxina não foi encontrado nos isolados de *S. aureus* estudados (Almeida et al., 2013, Ferreira et al. 2014, Silveira-Filho et al. 2014).

O gene codificador para SEC, que foi identificado em dois isolados neste estudo, foi o mais encontrado em estudos realizados na região nordeste do Brasil (Almeida et al., 2013; Rahini et al., 2013; Ferreira et al., 2014). O gene codificador para SED não foi identificado neste estudo, assim como em isolados de *Staphylococcus aureus* nos estudos realizados no nordeste brasileiro (Almeida et al. 2013, Ferreira et al. 2014, Silveira-Filho et al. 2014).

Apesar de neste estudo, o gene codificador para SEE ter sido identificado em apenas um isolado proveniente de SCN e da própria legislação exigir apenas a análise de coagulase positiva, estudos brasileiros já demonstraram a presença de gene de EEs em espécies de SCN, oriundos de diferentes tipos de alimentos (César, 2017; Oliveira, Miya, Sant'Ana, & Pereira 2010; Lyra et al., 2013; Rall et al., 2014).

## **Conclusão**

Os resultados demonstraram que, 76% e 13% das amostras apresentaram contagens acima do permitido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes, respectivamente. Não foi identificado *Salmonella ssp* e *Listeria monocytógenes*. Dois isolados (6,89%) de *Staphylococcus*, expressaram o gene codificador para enterotoxina estafilocócica B e quatro isolados (13,76%),

expressaram o gene codificador para enterotoxina clássica C. Neste trabalho foi possível evidenciar que a qualidade microbiológica dos queijos artesanais comercializados em feiras livres, mostrou-se insatisfatória.



## Referências

ACOSTA, A. C. Frequency of toxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* isolated from community milk tanks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n. 7, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2017000700691](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017000700691)>. Acesso em: 5 jul. 2019.

ALIBAYOV, B. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 197-204, 2014.

ALMEIDA L. M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, 2013. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013000200026> Disponível: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822013000200026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200026)>. Acesso em: 6 jul. 2019.

AMORIM. A. L. B. C. et al., Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2015.

ARGUDIN, M. A. et al. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins** (Basel), v. 2, n. 7, p. 1751–1773, 2010.

AZEVEDO R. A. et al. Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, p. 271-276, 2014.

BELTRÃO, Fabiana Augusta Santiago. **Desenvolvimento e Caracterização de Queijos Tipo “Chevrotin” Simbiótico**. 2017. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Teresina, 2017.

BENNETT, S. D., WALSH, K. A., & GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 425-433, 2013.

BORELLI, B.M. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.

BOUCHARD, D. S. et al. Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2015.

BRASIL. Dados epidemiológicos – DTA período de 2010 a 2014. Disponível em: <[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejane](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejane)>

AlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\_2014\_PDF.pdf 2015>. Acesso em: 15 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário oficial da União**. Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks** - United States, 1998-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) November, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss5510.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

CHEN, Y. et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 510. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 3, p. 193-199, 2014.

CÉSAR, J. G. et al. Antimicrobial Resistance and Presence of Enterotoxins in *Staphylococcus* spp. Isolated from Cooked Meat and Desserts. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 10, p. 750-753. 2017. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jfnr/5/10/5>> Acesso em: 22 jul. 2019.

DIAS, B. F. et al. 2016. Qualidade Microbiológica e Físicoquímica de Queijo Minas Frescal Artesanal e Industrial. **Revista de Agricultura Neotropical**, v.3, n.3, p.57- 64, 2016.

DIAS N. et al. Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352011000600036&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600036&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 05 ju. 2019.

DORES, M. T. das et al. 2013. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science Technol**, Campinas, v.33, n.1. 2013.

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

FERREIRA, H. D. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2014000700004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000700004)>. Acesso em: 6 de jul. 2019.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual (2001)**. Disponível em: <<http://911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>>. Acesso em: 15 de abr. 2019.

FORSYTHE, S. T. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 465p.

FRANCO, Bernadete Gombossy; LANDGRAF, Mariza. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GALINARI, E. et al. Aspectos microbiológicos do biofilme em utensílios de madeira usados para fazer um queijo artesanal brasileiro. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v.45, p.713-720, 2014.

GARCIA, J.K.S. et al. 2016. Qualidade Microbiológica de Queijos Frescos Artesanais Comercializados na Região do Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v.8, n.2, p.58-65, 2016.

GERMINI, A. et al. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733–738, 2009.

GOULD, L. H.; MUNGAI, E.; BEHRAVESH, C. B. Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998– 2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.7, 2014.

GUIMARÃES, F.F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.96, n. 5, p.2866–2872, 2013.

HARTMANN, W.; ANDRADE, U. V. C. de; LEPKA, L. Segurança alimentar de queijos comercializados em Curitiba. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.34, n.6, p.1-2, 2006.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HO, J., BOOST, M., & O'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 8, p. 1751-1760, 2014.

HOLT, John; BERGEY, David Hendricks. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland, 1996.

KOBAYASHI, P. de F. et al. Detecção de *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite cru e queijo de produção informal na Região Metropolitana de São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

KONEMAN E.W. et al.=. The Gram-positive cocci: Staphylococci and related organisms. **Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology**, p.539-576, 1997.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MN (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley: Chichester; 1991.

LI G. et al. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006-2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathog Dis*, v. 12, ed. 3, p. 203-206. 2015. Disponível em: <[www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&pid=S0100-736X201700070069100022&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0100-736X201700070069100022&lng=en)>. Acesso em: 5 jul. 2019.

LIU Y. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells in vitro. **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 3552-3567, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280547/>>. Acesso em: 27 jul. 2019.

LYRA, D. G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus* spp. from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 126-130, 2013.

MARQUES, J. L. et al. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, p. 159-163, maio, 2017.

MARTINS, J. M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p. 219-230. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822015000100219&script=sci\\_arttext&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1517-83822015000100219&script=sci_arttext&lng=pt)>. Acesso em: 01 jul. 2019.

MEDEIROS, N. C. de et al. Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1955-1962. 2017.

MEHROTRA, M., Wang, G., & Johnson, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000.

MORAES, P.M. et al. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 06, n. 02, p. 245-249, 2009.

NOGUEIRA, A.M.S. et al. Análise da qualidade microbiológica de queijo ralado comercializado em São José do Rio Preto - SP. **Revista Científica Unilago**, v.1 p.129-136, 2013.

NAGARAJ, S. et al. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 435-446, 2014.

NAZARI, R. et al. Enterotoxin gene profiles among *Staphylococcus aureus* isolated from raw milk, **Iran J Vet Res**. v. 14, n. 4, p. 409-412, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789223/>>. Acesso em: 06 de jul. 2019.

OLIVEIRA, A. B. A., et al. Doenças Transmitidas por Alimentos, Principais Agentes Etiológicos e Aspectos Gerais: Uma Revisão. **Revista HCPA**, v. 30, n.3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, A. M. et al. High incidence of enterotoxin D producing *Staphylococcus* spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 159-163, 2011.

OLIVEIRA, A. M. et al. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative *Staphylococcus* in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 475-481, 2010.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.278-282, 2009.

PEREIRA, T. M. F. *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* sp. em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.12, nº 2, p. 358-361, 2017.

PIERI, F. A. et al. **Hábitos de consumo arriscado e segurança do leite fluido disponível nos pontos de venda no varejo em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Patógenos e Doenças Transmitidas por Alimentos**, v.11, p.490-496, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789223/>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

PODKOWIK, M. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013.

RAHIMI, Ebrahim. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 393-399, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822013000200008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 02 jul. 2019.

RALL, V. L. et al. Diversity of *Staphylococcus* species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 829-837, 2014.

RODRIGUEZ, M. et al. Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in Southern Spanish hospitals. **Food Control**, v.22, n.6, p.874-882, 2011.

ROSA, D. L. S. O. et al. Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v.3, n. 1, p. 37-42, 2015.

SAALFELD M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013.

SHADOCK, I. et al. Simple method to genotype the ACTN3 r577x polymorphism. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 19, n. 5, p. 253-257, 2015.

SILVA, R.N.A. et al. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores em restaurantes comerciais e institucionais da cidade de Salvador, BA. **Higiene Alimentar**, v.31, p. 270-271, 2017.

SILVA, Fernando Merlin da. **Listeria monocytogenes: Um perigo invisível nos alimentos** 2009. 45 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária), Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009.

SILVEIRA, V. F. et al. Antibiotic Resistance and Molecular Analysis of *Staphylococcus aureus* Isolated from Cow's Milk and Dairy Products in Northeast Brazil. **Journal of food protection**, V. 77, n. 4, p. 583-591, 2014. Disponível em: <[www.researchgate.net/publication/261218978\\_Antibiotic\\_Resistance\\_and\\_Molecular\\_Analysis\\_of\\_Staphylococcus\\_aureus\\_Isolated\\_from\\_Cow's\\_Milk\\_and\\_Dairy\\_Products\\_in\\_Northeast\\_Brazil](http://www.researchgate.net/publication/261218978_Antibiotic_Resistance_and_Molecular_Analysis_of_Staphylococcus_aureus_Isolated_from_Cow's_Milk_and_Dairy_Products_in_Northeast_Brazil)>. Acesso em: 06 de jul. 2019.

SOBRINHO, P. S. C. et al. **Qualidade bacteriológica do leite cru utilizado na produção de queijo de leite cru de fazenda brasileira**. Patógenos e Doenças Transmitidas por Alimentos, v.9, p.138-144, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez66.periodicos.capes.gov.br/pubmed/22217108>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

- SOUZA, A. B. et al. Parâmetros de textura em queijos processados: influência da utilização de concentrados proteicos de leite e de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 18-192, 2014.
- SOUSA, A. Z. B. et al. 2014. Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, n.1, p.30-35, 2014.
- SOUZA, P. S. et al. Aplicação de boas práticas por manipuladores de alimentos em pontos de venda de gelados comestíveis. **Higiene Alimentar**, n. 31, p. 268-269, 2017.
- SOUZA, I. A. et al. Qualidade Microbiológica de Queijos Minas Frescal Comercializados na Zona da Mata Mineira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Minas Gerais, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017.
- STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de Staphylococcus spp. isolados de leite in natura. **Ciências e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v.26, n.1, p.41-45, 2006.
- VALIATTI, T. B. et al. Avaliação das Condições Higiênico-sanitárias de Queijos Tipo Minas Frescal Comercializados em Feiras no Município Ji-Paraná-RO. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.6, n.1, p. 59-68, 2015.
- Veras J.F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, ed. 4, p. 410-414, 2008. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971207002305>>. Acesso em: 05 jul. 2019.
- YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control, Reading**, v. 63, n. 1, p. 201-215, 2016.

## 6 Considerações Finais

Neste trabalho foi possível evidenciar que a qualidade microbiológica dos queijos artesanais comercializados em feiras livres, mostrou-se insatisfatória. Possivelmente, devido a manipulação inadequada durante o processo de fabricação, bem como durante a comercialização, onde a disposição do produto ocorre, muitas vezes, de maneira inadequada, não havendo fiscalização eficiente.

Os resultados apresentados neste trabalho, 76% e 13% das amostras acima do permitido pela legislação para *Staphylococcus* coagulase positiva e coliformes termotolerantes respectivamente, refletem o risco do consumo deste produto. Quatro isolados de *Staphylococcus* spp expressaram o gene codificador para enterotoxina clássica C.

Os resultados encontrados neste trabalho apontam para a necessidade de pesquisas sobre a produção de toxinas por *Staphylococcus* coagulase negativa, mesmo que não haja requisitos legais para isso, pois a detecção de cepas enterotoxigênicas de *Staphylococcus* coagulase negativa tem sido encontrada em envolvidas em estudos com alimentos.

Constatou-se a necessidade de medidas sanitárias eficazes, envolvendo padrões de higiene, bem como aspectos técnicos e práticos da ordenha, como durante todo o processo de fabricação de queijos artesanais, a fim de garantir a qualidade deste produto, altamente popular no Brasil. O uso de leite pasteurizado, associado às boas práticas de manipulação e fiscalização pelos órgãos competentes, pode ser uma alternativa para melhorar a qualidade microbiológica do queijo artesanal.



## Referências gerais

ACOSTA, A. C. Frequency of toxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* isolated from community milk tanks. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n. 7, 2017. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2017000700691](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2017000700691)>. Acesso em: 5 jul. 2019.

ALBENZIO, M. et al. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal Dairy of Science**, v. 96, n. 5, p. 2781-2791, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213002208>>. Acesso em: 7 jul. 2019.

ALIBAYOV, B. et al. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 197-204, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701214003042>>. Acesso em: 7 jul. 2019.

ALMEIDA L. M. Comparative analysis of agr groups and virulence genes among subclinical and clinical mastitis *Staphylococcus aureus* isolates from sheep flocks of the Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, 2013. Disponível: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822013000200026](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200026)>. Acesso em: 6 jul. 2019.

AMORIM. A. L. B. C. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n. 4, p. 364-367, 2015. Disponível em: <[https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-do-instituto-adolfo-lutz/73-\(2014\)-4/avaliacao-da-qualidade-microbiologica-de-queijos-do-tipo-minas-padrao/](https://www.bvs-vet.org.br/vetindex/periodicos/revista-do-instituto-adolfo-lutz/73-(2014)-4/avaliacao-da-qualidade-microbiologica-de-queijos-do-tipo-minas-padrao/)>. Acesso em: 6 jul. 2019.

APOLINÁRIO, T. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal produzido por laticínios do estado de Minas Gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433-442, 2014. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/272400415\\_AVALIACAO\\_DA\\_QUALIDADE\\_MICROBIOLOGICA\\_DO\\_QUEIJO\\_MINAS\\_FRESCAL\\_PRODUZIDO\\_POR\\_LATICINIOS\\_DO\\_ESTADO\\_DE\\_MINAS\\_GERAIS](https://www.researchgate.net/publication/272400415_AVALIACAO_DA_QUALIDADE_MICROBIOLOGICA_DO_QUEIJO_MINAS_FRESCAL_PRODUZIDO_POR_LATICINIOS_DO_ESTADO_DE_MINAS_GERAIS)>. Acesso em: 8 jul. 2019.

ARGUDIN, M. A. et al. Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. **Toxins** (Basel), v. 2, n. 7, p. 1751–1773, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22069659>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

ARIMI S.M. et al. Risk of infection with *Brucella abortus* and *Escherichia coli* O157:H7 associated with marketing of unpasteurized milk in Kenya. **Acta Tropica**, v. 96, n. 01, p.1-8, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X05001646>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

ASPERGER, H. *Staphylococcus aureus*. Group of Experts A10/11. The significance of pathogenic microorganisms in raw milk. **International dairy federation**. v. 9405, p.

24-42, 1994. Disponível em:  
<<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19950400178>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

AZEVEDO R. A. et al. Silagem de colostro: riscos microbiológicos e caracterização do pH em função do dia de coleta. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, p. 271-276, 2014. Disponível em:  
<<https://doaj.org/article/c79b817cce974328ac0ffb6970cd2c8c>>. Acesso em: 9 jul. 2019.

BARANCELLI, G. V., et al. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.78, n.1, p.155-168, 2011. Disponível em: <<https://bdpi.usp.br/item/002185748>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

BELTRÃO, F. A. S. et. al. Evaluation of the fatty acid profile of symbiotic chevrotin cheese. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 11-18, 2017. Disponível em: <<https://doaj.org/article/ebc618bff9fc476a9fc30a104c16291a>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

BENNETT, S. D., WALSH, K. A., & GOULD, L. H. Foodborne disease outbreaks caused by *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, and *Staphylococcus aureus* - United States, 1998-2008. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 3, p. 425-433, 2013. Disponível em: <<https://academic-oup-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/cid/article/57/3/425/460877>>. Acesso em: 6 jul. 2019.

BERGMAN Z. C. et al. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, 2007. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=3&script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000300040&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=3&script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000300040&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 4 jul. 2019.

BERTRAND, X. et al. First report of a catalase-negative methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 3, p. 245-246, 2002. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073288930200398X>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

BONTINIS, T. G., et al. Study of proteolysis, lipolysis and volatile profile of a traditional Greek goat cheese (Xinotyri) during ripening. **Small Ruminant Research**, v. 105, n. 1, p. 193-201, 2012. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez66.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0921448812000041>>. Acesso em: 5 jun. 2019.

BORELLI, B.M. et al. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006. Disponível em:  
<[http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=6&script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822006000400026&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=6&script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000400026&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 5 abr. 2019.

BOUCHARD, D. S. et al. Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Mammary Microbiota: Potential Allies against Bovine Mastitis. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. 1-18, 2015. Disponível em: <[http://search-ebscohost-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=26713450&lang=pt-br&site=ehost-live](http://search.ebscohost.com.ez66.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=26713450&lang=pt-br&site=ehost-live)>. Acesso em: 9 nov. 2019.

BRASIL. Dados epidemiológicos – DTA período de 200 a 2019. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados\\_epidemiologicos.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/dados_epidemiologicos.pdf)>. Acesso em: 15 fev. 2019.

BRASIL. Dados epidemiológicos – DTA período de 2010 a 2014. Disponível em: <[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)> 2015>. Acesso em: 15 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 7 de agosto de 2013. **Diário Oficial da União**. 2013. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/instrucao-normativa-n-30-de-07-08-2013,1044.html>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos. **Diário Oficial da União**. Brasília. 1996. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da saúde. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. **Diário Oficial da União**. 2010. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf)>. Acesso em: 5 jun. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário oficial da União**. Brasília, 2001. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 5 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2019.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. 2016. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/02/Miolo-manual-Leptospirose-17-9-2014.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

BHUNIA, A. **Foodborne microbial pathogens** – mechanisms and pathogenesis. 2 ed. New York: Springer, 2008. 276p. Disponível em: <<https://www.springer.com/gp/book/9780387745367>>. Acesso em: 2 jul. 2019.

CALLAWAY, T.R.; HARVEY, R.B.; NISBET, D.J. The hygiene hypothesis and foodborne illness: too much of a good thing, or is our food supply too clean? **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 03, n. 03, p. 217-219, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16972768>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

CAMPAGNOLLO, F. B. et al. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288-297, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002017310717>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

CARMO, G. M. I., et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim eletrônico epidemiológico**, Brasília, ano 5, n.6, 2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/busca/buscar.cfm>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

Centers for Disease Control and Prevention – CDC. **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks** - United States, 1998-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) November, 2006. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/ss/ss5510.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

CÉSAR, J. G. et al. Antimicrobial Resistance and Presence of Enterotoxins in Staphylococcus spp. Isolated from Cooked Meat and Desserts. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 10, p. 750-753. 2017. Disponível em: <<http://pubs.sciepub.com/jfnr/5/10/5>>. Acesso em: 22 jul. 2019.

CHEN, Y. et al. Purification and characterization of plantaricin Y, a novel bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum 510. **Archives of microbiology**, v. 196, n. 3, p. 193-199, 2014. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s00203-014-0958-2>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

CREMONESI, P. et al. Detection of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolates in raw milk cheese. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 586-591, 2007. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

CRUZ, C.D. et al. Listeria monocytogenes: Um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Revista Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.2, p. 195-206, abr. 2008. Disponível em: <<https://doaj.org/article/03d8623b4d0b432798c9696cb7ccc4b3>>. Acesso em: 20 jun. 2019.

CUNHA, Maria de Lourdes Ribeiro de Souza da et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 70-74, Mar. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822006000100013&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822006000100013&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 5 mar. 2019.

DAHL, Stefan; TAVARIA, Freni K.; MALCATA, F. Xavier. Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal*, v. 10, n. 4, 2000. p. 255-262. Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez66.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016%2FS0958-6946%2800%2900042-X>>. Acesso em: 6 dez. 2019.

DALTON, Craig B. et al. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *New England Journal of Medicine*, Boston, 09 jan. 1997, p 100-106. Disponível em: <<https://www-nejm-org.ez66.periodicos.capes.gov.br/medical-index>>. Acesso em: 13 nov. 2019.

DIAS, B. F. et al. 2016. Qualidade Microbiológica e Físicoquímica de Queijo Minas Frescal Artesanal e Industrial. *Revista de Agricultura Neotropical*, v.3, n.3, p.57- 64, 2016. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/327788355\\_QUALIDADE\\_MICROBIOLOGICA\\_E\\_FISICO-QUIMICA\\_DE\\_QUEIJO\\_MINAS\\_FRESCAL\\_ARTESANAL\\_E\\_INDUSTRIAL](https://www.researchgate.net/publication/327788355_QUALIDADE_MICROBIOLOGICA_E_FISICO-QUIMICA_DE_QUEIJO_MINAS_FRESCAL_ARTESANAL_E_INDUSTRIAL)>. Acesso em: 5 nov. 2018.

DIAS N. et al. Detection of genes of *Staphylococcus aureus*, enterotoxins and methicillin resistance in milk. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 63, n. 6. 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352011000600036&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000600036&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 05 jul. 2019.

DORES, M. T. das et al. 2013. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. *Food Science Technol*, Campinas, v.33, n.1. 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=6&script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612013000100026&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=6&script=sci_arttext&pid=S0101-20612013000100026&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 5 jan. 2019.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. et al. 2016. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.10, n. 1, p. 55-67, 2016. Disponível em: <<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

FAVA, L.W. et al. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 40, n. 4, p.1-6, 2012. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/40-4/040-4.htm>>. Acesso em: 6 nov. 2018.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no Estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 23, p.162-165, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612003000400030&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612003000400030&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 7 dez. 2019.

FIGUEIREDO, Roberto. Martins. SSOP: **Programa de Redução de Patógenos - Padrões e Procedimentos Operacionais de Sanitização**. São Paulo: ed. Manole, v. 1, 2001, p. 164.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual (2001)**. Disponível em: <<http://911emg.com/Ref%20Library%20ERG/FDA%20Bacteriological%20Analysis.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2019.

FORSYTHE, S. T. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 465p.

FOX, Patrick F., et al. Raw milk cheeses. In: FOX, Patrick F., et al. **Cheese: Chemistry, physics and microbiology**. 3.ed. London, p. 46-319, 2004. Disponível em: <[https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4899-7681-9\\_12](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4899-7681-9_12)>. Acesso em: 6 set. 2018.

FRANCO, B. G.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GARCIA, E. F. et al. Development and quality of a Brazilian semi-hard goat cheese (coalho) with added probiotic lactic acid bacteria. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 63, n. 8, p. 947-56, 2012. Disponível em: <[http://search-ebscohost-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=s3h&AN=83183527&lang=pt-br&site=ehost-live](http://search.ebscohost.com.ez66.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=s3h&AN=83183527&lang=pt-br&site=ehost-live)>. Acesso em: 10 set. 2018.

GATTI, Mônica et al. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. **Journal of Dairy Science**, vol. 97, feb. 2014. p. 573-591. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008126>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2011, 1088 p.

GERMINI, A. et al. Simultaneous detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella spp., and Listeria monocytogenes by multiplex PCR. **Food Control**, v.20, p.733–738, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713508002569>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

GOULD, L. H.; MUNGAI, E.; BEHAVESH, C. B. Outbreaks Attributed to Cheese: Differences Between Outbreaks Caused by Unpasteurized and Pasteurized Dairy Products, United States, 1998– 2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.11, n.7, p. 545-551, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4593610/?tool=pmcentrez>>. Acesso em: 10 nov. 2018.

GUIMARÃES, F.F. et al. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v.96, n p.2866–2872, 2013. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213001690>>. Acesso em: 9 fev. 2019.

FREITAS, M. P. Avaliação Microbiológica de Queijos Artesanais Produzidos na Cidade de Taió. **Saúde & Meio Ambiente**, Santa Catarina - BR, v. 4, n. 2, p. 103-114, 2015. Disponível em: <<http://www.periodicos.unc.br/index.php/sma/article/view/869>>. Acesso em: 7 out. 2018.

FERREIRA, H. D. Occurrence of enterotoxin-encoding genes in *Staphylococcus aureus* causing mastitis in lactating goats. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-736X2014000700004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2014000700004)>. Acesso em: 6 jul. 2019.

HARRIS, L. G. et al. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. **European Cells and Materials**, Sheffield, v. 4, n. 3, p. 39-60, 2002.

Disponível em: <<https://doaj.org/article/9afa17852090431799d55ce887863058>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

HENNEKINNE, J. A.; DE BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091892>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

HO, J., BOOST, M., & O'DONOGHUE, M. Sustainable reduction of nasal colonization and hand contamination with *Staphylococcus aureus* in food handlers, 2002-2011.

**Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 8, p. 1751-1760, 2014. Disponível em: <<https://www-cambridge.ez66.periodicos.capes.gov.br/core/journals/epidemiology-and-infection/article/sustainable-reduction-of-nasal-colonization-and-hand-contamination-with-staphylococcus-aureus-in-food-handlers-20022011/0DD7515D42E9FEC6808093A5E053469E>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

HOLT, John; BERGEY, David Hendricks. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1778052/>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

HUANG H. et al. Evaluation of culture enrichment for use with *Salmonella* detection in Immunoassay. **International Journal of Food Microbiology**, v. 51, p. 85-94, 1999.

Disponível em: <<https://www-sciencedirect.ez66.periodicos.capes.gov.br/search/advanced?docId=10.1016%2FS0168-1605%2899%2900102-6>>. Acesso em: 9 jul. 2019.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Org.: Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **Microbiology of food and animal feeding stuffs** – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method, International Standard ISO 11290-1, Geneva, Switzerland, 1996. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/19268.html>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

JAY, James. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

JUNQUEIRA, A. R. et al. Estafilococos coagulase positiva em saladas de restaurantes self-service da cidade do Rio de Janeiro. **Revista Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v.1, n.1, p.1-10, 2009. Disponível em: <<https://revistascientificas.ifrj.edu.br/revista/index.php/revistapct/article/view/13>>. Acesso em: 9 mar. 2019.

KAPER, J. B. **Enterohemorrhagic Escherichia coli. Host-microbe interactions: bacteria** Current Opinion in Microbiology, Oxford, v.1, p.103- 108, 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527498801495>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

KIM, N. H. et al. Prevalence and classification of toxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from refrigerated ready-to-eat foods (sushi, kimbab and California rolls) in Korea. **Journal of Applied Microbiology**. v.111, n.6, p.1456-1464, 2011. Disponível em: <<https://sfamjournals.onlinelibrarywiley-com.ez66.periodicos.capes.gov.br>>. Acesso em: 30 mar. 2019.

KOBAYASHI, P. de F. et al. Detecção de *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes* em leite cru e queijo de produção informal na Região Metropolitana de São Paulo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017. Disponível em: <<https://doaj.org/article/f3b73c385b14440c8fd85ff8b17aac36?frbrVersion=2>>. Acesso em: 5 set. 2018.

KONEMAN E. W. **Diagnostico microbiológico**, 6ª edição, 2006.

LE QUERE, J. L. et al. Identification and sensory evaluation of the character-impact compounds of goat cheese flavour. In: **Flavour Science**. 1997. p. 325-330. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855737792500624>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

LI G. et al. *Staphylococcus aureus* ST6-t701 isolates from food-poisoning outbreaks (2006-2013) in Xi'an, China. *Foodborne Pathoge Dis*, v. 12, ed. 3, p. 203-206. 2015.



Disponível em: <[www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&pid=S0100-736X201700070069100022&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S0100-736X201700070069100022&lng=en)>. Acesso em: 5 jul. 2019.

LIU Y. Staphylococcal enterotoxin H induced apoptosis of bovine mammary epithelial cells in vitro. **Toxins**, v. 6, n. 6, p. 3552-3567, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4280547/>>. Acesso em: 27 jul. 2019.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MN (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley: Chichester; 1991. Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(lz5mqp453edsnp55rrgjct55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferencelD=1870033](https://www.scirp.org/(S(lz5mqp453edsnp55rrgjct55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferencelD=1870033)>. Acesso em: 6 dez. 2018.

LYRA, D. G. et al. Enterotoxin-Encoding Genes in *Staphylococcus spp.* from Bulk Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 2, p. 126-130, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441914>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

LOWY, F.D. Staphylococcus aureus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9709046>>. Acesso em: 6 jan. 2019.

MAIJALA, R. et al. The efficiency of the Finnish Salmonella control programme. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 669-675, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713504001227>>. Acesso em: 6 mar. 2019.

MANTILLA, S.P.S., et al. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, v.14, n.1, p. 180-192, 2007. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/105019870/Artigo-Listeria>>. Acesso em: 3 fev. 2019.

MARIACA, R. G.; IMHOF, M. I.; BOSSET, J. O. Occurrence of volatile chiral compounds in dairy products, especially cheese: a review. **European food research & technology**, v. 212, n. 3, p. 253-261, 2001. Disponível em: <<https://link-springer-com.ez66.periodicos.capes.gov.br/article/10.1007/s002170000250>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

MARQUES, J. L. et al. Bacteriocin-like substances of *Lactobacillus curvatus* P99: characterization and application in biodegradable films for control of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Food Microbiology**, v. 63, p. 159-163, maio, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002016305330>>. Acesso em: 5 jan. 2019.

MARRONE, R. et al. Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of “Pecorino Carmasciano” cheese, a traditional Italian dairy product. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 36, n. 1-2, p. 85-89, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157514001379>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

MARTINS, J. M. et al. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p. 219-230. 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v46n1/1517-8382-bjm-46-01-0219.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2019.

MARTINS, Fernanda Oliveira de. **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo**. 2006. 126p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública (FSP), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/362234457/Dissertacao-MartinsFO>> Acesso em: 22 abr. 2018.

MEDEIROS, N. C. de et al. Quality of milk used in informal artisanal production of coalho and butter cheeses. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1955-1962. 2017. Disponível em: <<https://doaj.org/article/949ab017287c4a7eb7accb1c6b5fa817>>. Acesso em: 5 jul. 2018.

MEHROTRA, M., Wang, G., & Johnson, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 3, p. 1032-1035, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86330/>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening a review. **Lait**, v. 80, n. 3, p. 293-324, 2000. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20000404754>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 41, n. 1, 2013. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/295583413\\_Evaluation\\_of\\_the\\_Safety\\_and\\_Quality\\_of\\_Microbiological\\_Handmade\\_Cheese\\_Serrano\\_and\\_its\\_Relation\\_to\\_Physical\\_and\\_Chemical\\_Variables\\_the\\_Period\\_of\\_Maturity](https://www.researchgate.net/publication/295583413_Evaluation_of_the_Safety_and_Quality_of_Microbiological_Handmade_Cheese_Serrano_and_its_Relation_to_Physical_and_Chemical_Variables_the_Period_of_Maturity)>. Acesso em: 5 nov. 2018.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro Agropecuário. Portaria nº 1305, de abril de 2013 Estabelece diretrizes para a produção do queijo Minas artesanal. **Diário Oficial do Estado**. 2013. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=253925>>. Acesso em: 2 jan. 2019.

MINAS GERAIS. Instituto Mineiro Agropecuário. Dispõe sobre o período de maturação do Queijo Minas Artesanal. Portaria nº 1736, de 27 de julho de 2017. **Diário Oficial do Estado**. 2017. Disponível em: <[https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-1736-2017-mg\\_346814.html](https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-1736-2017-mg_346814.html)>. Acesso em: 5 jan. 2019.

MORAES, P.M. et al. Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and**

**Disease**, v. 06, n. 02, p. 245-249, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19099356>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

MURRAY, P. R. et al. Predicting clearance of colonization with vancomycin-resistant Enterococci and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by use of weekly surveillance cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 24, p. 1229-1230, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668339/>>. Acesso em: 5 jun. 2019.

NAGARAJ, S. et al. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in food samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 435-446, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24119042>>. Acesso em: 5 jun. 2018.

NARIMATSU, A. Avaliação da proteólise e do derretimento do queijo prato obtido por ultrafiltração. **Ciência Tecnologia Alimentar**, Campinas, p.177-182, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0101-20612003000400033&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0101-20612003000400033&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 5 ago. 2019.

NAZARI, R. et al. Enterotoxin gene profiles among Staphylococcus aureus isolated from raw milk, **Iran J Vet Res**. v. 14, n. 4, p. 409-412, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4789223/>>. Acesso em: 6 de jul. 2019.

NERO, L.A. et al. Listeria monocytogenes and Salmonella sp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, p. 299-305, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18489543>>. Acesso em: 6 set. 2018.

OLIVEIRA, A. M. et al. High incidence of enterotoxin D producing Staphylococcus spp. in Brazilian cow's raw milk and its relation with coagulase and thermonuclease enzymes. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 159-163, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20807112>>. Acesso em: 3 set. 2018.

OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C., TONIAL, I. B. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.64, n.2, p. 521-523, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v64n2/a40v64n2.pdf>>. Acesso em: 4 jun. 2019.

OLIVEIRA, A. M. et al. Behavior and enterotoxin production by coagulase negative Staphylococcus in cooked ham, reconstituted skimmed milk, and confectionery cream. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. 475-481, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535559>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

ORDÓÑEZ, J. **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

- O'SHEA, E. F., et al. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511003229>>. Acesso em: 2 jan. 2019.
- PELCZAR, Michael, et al. **Microbiologia, conceitos e aplicações: doenças transmitidas por água e alimentos**. São Paulo: Makron Books, 1996. 517 p.
- PEREIRA, V. et. al. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, p.278-282, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002008002311>>. Acesso em: 5 fev. 2018.
- PEREIRA, T. M. F. *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* em queijos de coalho artesanais produzidos em São Rafael, Rio Grande do Norte. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.12, nº 2, p. 358-361, 2017. Disponível em: <<https://doaj.org/article/17484ecd7df3495d8559204a4760754d>>. Acesso em: 6 dez. 2018.
- PERRY, K. S. P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19276.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2018.
- PICOLI, S. U. et al. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 64-69, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000100011&script=sci\\_abstract&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0101-20612006000100011&script=sci_abstract&lng=pt)>. Acesso em: 5 fev. 2018.
- PIERI, F. A. et al. Hábitos de consumo arriscado e segurança do leite fluido disponível nos pontos de venda no varejo em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Patógenos e Doenças Transmitidas por Alimentos**, v.11, p.490-496, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov.ez66.periodicos.capes.gov.br/pubmed/24697652>>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- PODKOWIK, M. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative staphylococci. **International Journal of Food Microbiology**, v. 163, n. 1, p. 34-40, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160513000913>>. Acesso em: 17 abr. 2019.
- PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 55-61, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157510001961>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

RADDI, M.S.G. et al. Staphylococcus aureus: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 22, n. 1, p. 36-40, 1988. Disponível em: <<https://www.scielo.org/article/rsp/1988.v22n1/36-40/pt/>>. Acesso em: 6 abr. 2019.

RALL, V. L. et al. Diversity of Staphylococcus species and prevalence of enterotoxin genes isolated from milk of healthy cows and cows with subclinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 2, p. 829-837, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030213008576>>. Acesso em: 5 fev. 2019.

RAHIMI, Ebrahim. Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus isolated from traditional and commercial dairy products marketed in Iran. **Brazil Journal Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 393-399, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822013000200008&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822013000200008&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 17 jul. 2019.

RANDAZZO, C. L. et al. Pecorino Crotonese cheese: study of bacterial population and flavour compounds. **Food Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 363-374, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002009002688>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

REINHEIMER, J. **Avances em microbiología, bioquímica y tecnología de quesos**. 1ª ed. Buenos Aires: Centro de publicaciones universidad nacional del litoras, 2007. 332 p.

REZENDE, P. H. L. et al., Aspectos sanitários do queijo minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 65, n. 377, p. 36-42, 2010. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/148>>. Acesso em: 2 mar. 2019.

RODRIGUEZ, M. et al. Hygienic conditions and microbiological status of chilled ready-to-eat products served in Southern Spanish hospitals. **Food Control**, v.22, n.6, p.874-882, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095671351000383X>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

ROSA, D. L. S. O. et al. Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de Staphylococcus spp. isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária em Debate**: Sociedade, Ciência & Tecnologia, v.3, n. 1, p. 37-42, 2015. Disponível em: <<https://doaj.org/article/666b0ea9030a402f8b0fbfda97aca6f2>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

SAALFELD M. H. et al. Anaerobically fermented colostrum: an alternative for feeding calves. **Ciência Rural**, v. 43, n. 9, p. 1636-1641, 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0103-84782013000900016&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-84782013000900016&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 5 fev. 2019.

SANTANA, Elsa Helena Walter. **Determinação do perigo de consumo do leite cru relacionado a intoxicação estafilocócica**. 2006. 94 f. Tese (Doutorado em Ciência

Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006. Disponível em: <<https://slidex.tips/download/elsa-helena-walter-de-santana-determinacao-do-perigo-de-consumo-de-leite-cru-relacionado-a-intoxicacao-estafilococica>> Acesso em: 26 abr. 2018.

SANTANA et al., 2010. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n.3, p. 545–554, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=3&script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000300023&lng=en&tling=en](http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=3&script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000300023&lng=en&tling=en)>. Acesso em: 13 mar. 2019.

SANTOS, A.L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. vol. 43, n. 6, p. 413-423, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v43n6/v43n6a05.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2018.

SANTOS, K. M. O, et al. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612000039>>. Acesso em: 6 set. 2018.

SHADOCK, I. et al. Simple method to genotype the ACTN3 r577x polymorphism. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 19, n. 5, p. 253-257, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25831089>>. Acesso em: 5 set. 2019.

SCHMITT, C. I. et al. Contaminação do queijo colonial de produção artesanal comercializado em mercados varejistas do Rio Grande do Sul. **Veterinária Notícias**, v. 17, n. 2, p. 111-116, 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/279984175\\_Contaminacao\\_do\\_queijo\\_colonial\\_de\\_producao\\_artesanal\\_comercializado\\_em\\_mercados\\_varejistas\\_do\\_Rio\\_Grande\\_do\\_Sul](https://www.researchgate.net/publication/279984175_Contaminacao_do_queijo_colonial_de_producao_artesanal_comercializado_em_mercados_varejistas_do_Rio_Grande_do_Sul)>. Acesso em: 5 mar. 2019.

Secretaria de Desenvolvimento Rural - SDR. **Centro e Bairros de Pelotas contam com 37 Feiras Livres**. Prefeitura Municipal de Pelotas. 2018. Disponível em: <<http://www.pelotas.com.br/noticia/centro-e-bairros-de-pelotas-contam-com-37-feiras-livres>>. Acesso em: 31 mai. 2018.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análises Microbiológicas de Alimentos**. 3 ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, E. A. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Alimentos**. 5 ed. São Paulo: Varela, 1995.

SILVA, E.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira Ciência Avícola**, vol.4, n. 2, p.85-100, 2002. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-635X2002000200001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-635X2002000200001)>. Acesso em: 6 abr. 2018.

SILVA, E. P.; BERGAMINI, A. M. M.; OLIVEIRA, M. A. Alimentos e agentes etiológicos envolvidos em toxinfecções na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil – 2005 a 2008 – **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 7, n. 77, p. 4-10, 2010. Disponível em: <[http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1806-42722010000500001&lng=pt](http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-42722010000500001&lng=pt)>. Acesso em: 5 abr. 2018.

SILVA, R.N.A. et al. Avaliação microbiológica das mãos de manipuladores em restaurantes comerciais e institucionais da cidade de Salvador, BA. **Higiene Alimentar**, v.31, p. 270-271, 2017. Disponível em: <<http://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/08/848950/270-271-jul-ago-2017-103-108.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

SILVA, Fernando Merlin da. **Listeria monocytogenes: Um perigo invisível nos alimentos** 2009. 45 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Medicina Veterinária), Faculdades Metropolitanas Unidas, São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://arquivo.fmu.br/prodisc/medvet/fms.pdf>>. Acesso em: 13 set. 2018.

SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6.ed. São Paulo, 2008.

SILVEIRA, V. F. et al. Antibiotic Resistance and Molecular Analysis of Staphylococcus aur(e)us Isolated from Cow's Milk and Dairy Products in Northeast Brazil. **Journal of food protection**, V. 77, n. 4, p. 583-591, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24680069>>. Acesso em: 6 de jul. 2019.

SILVEIRA JR. J. F. et al. Caracterização físico-química de queijos coloniais produzidos em diferentes épocas do ano. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, n. 386, v. 67, p. 67-80, 2012. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/ilct/article/view/239>>. Acesso em: 12 jun. 2018.

SOBRINHO, P. S. C. et al. **Qualidade bacteriológica do leite cru utilizado na produção de queijo de leite cru de fazenda brasileira**. Patógenos e Doenças Transmitidas por Alimentos, v.9, p.138-144, 2012. Disponível em: <<https://www-ncbi-nlm-nih-gov.ez66.periodicos.capes.gov.br/pubmed/22217108>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

SOTO et al. Metodologia de avaliação das condições sanitárias de vendedores ambulantes de alimentos no Município de Ibiuna- SP. **Revista Brasileira Epidemiologia**, São Paulo, v. 11, p. 297-303, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbepid/v11n2/11.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

SOUZA, A. B. et al. Parâmetros de textura em queijos processados: influência da utilização de concentrados proteicos de leite e de soro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 18-192, 2014. Disponível em: <<https://doaj.org/article/589acc569b3b4871a9914f1bc7892925>>. Acesso em: 5 abr. 2019.

SOUSA, A. Z. B. et al. 2014. 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. Disponível em:

<[http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=2&script=sci\\_arttext&pid=S1808-16572014000100030&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?frbrVersion=2&script=sci_arttext&pid=S1808-16572014000100030&lng=en&tlng=en)>. Acesso em: 20 mar. 2019.

SOUZA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista de Atenção Primária a Saúde**, v.9, n.1, p. 83-88, 2006.

SOUZA, P. S. et al. Aplicação de boas práticas por manipuladores de alimentos em pontos de venda de gelados comestíveis. **Higiene Alimentar**, n. 31, p. 268-269, 2017. Disponível em: <<http://docs.bvsalud.org/biblioref/2017/07/837466/268-269-site-56-61.pdf>>. Acesso em: 5 dez. 2018.

SOUZA, I. A. et al. Qualidade Microbiológica de Queijos Minas Frescal Comercializados na Zona da Mata Mineira. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 3, p. 152-162, 2017. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/598>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciências e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v.26, n.1, p.41-45, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28846.pdf>>. Acesso em: 5 nov. 2018.

SURESH T., HATHA A. A. M., SCREENIVASA D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella enteritidis* and other salmonellas in the eggs and eggstoring trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002005000535>>. Acesso em: 6 dez. 2018.

TESSARI, E. N. C. et al. Prevalência de *Salmonella enteritidis* em carcaças de frango industrialmente processadas. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 107, p. 52-55, 2003. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000061&pid=S0103-8478200500060004000019&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000061&pid=S0103-8478200500060004000019&lng=en)>. Acesso em: 12 set. 2018.

TESSER, I. C et al. Fabricação artesanal e avaliação química e microbiológica do Queijo Colonial produzido em municípios do oeste do território da Cantuquiriguaçu. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 71, n. 4, p. 206-218, 2016. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/viewFile/506/417>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 718 p.

WAGNER, S. A.; GEHLEN, I.; WIEST, J. M. Padrão tecnológico em unidades de produção familiar de leite no Rio Grande do Sul relacionando com diferentes tipologias. **Ciência Rural**, v.34, n.5, p.1579-1584, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n5/a39v34n5.pdf>>. Acesso em: 2 abr. 2019.



WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvido sem surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. de Biociências**, v. 8, p. 44-48, 2010. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1322>>. Acesso em: 5 out. 2018.

WILIAMS, R. J. W. et al **Identification of a Novel Gene Cluster Encoding Staphylococcal Exotoxin-Like Proteins**: Characterization of the Prototypic Gene and its Protein Product. *Infection and Imunity*, v. 68, n. 8, p. 4407-4415, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98335/>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

WOLF, I. V. et al. Study of the chemical composition, proteolysis, lipolysis and volatile compounds profile of commercial Reggianito Argentino cheese: Characterization of Reggianito Argentino cheese. **Food Research International**, v. 43, n. 4, p. 1204-1211, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910000785?via%3Dihub>>. Acesso em: 5 set. 2018.

WU, S. et al. A Review of the Methods for Detection of Staphylococcus aureus Enterotoxins. **Toxins**, v. 8, n. 7, p. 176, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27348003>>. Acesso em: 5 set. 2018.

VALIATTI, T. B. et al. Avaliação das Condições Higiênico-sanitárias de Queijos Tipo Minas Frescal Comercializados em Feiras no Município Ji-Paraná. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v.6, n.1, p. 59-68, 2015. Disponível em: <<http://www.faema.edu.br/revistas/index.php/Revista-FAEMA/article/view/282>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

VANDERZANT, C. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **Indicator Microorganisms and Pathogens**, ed. 3, p. 1219, American Public Health Association. 1992. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books/about/Compendium\\_of\\_Methods\\_for\\_the\\_Microbiology.html?id=C3Z1QgAACAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.br/books/about/Compendium_of_Methods_for_the_Microbiology.html?id=C3Z1QgAACAAJ&redir_esc=y)>. Acesso em: 5 dez. 2018.

VANEGAS, M.C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. **Food Control**, v. 20, p. 430-432, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713508001795>>. Acesso em: 5 mar. 2019.

Veras J.F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 12, ed. 4, p. 410-414, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971207002305>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

VOIGT, D. D. et al. Effect of high-pressure treatment on microbiology, proteolysis, lipolysis and levels of flavour compounds in mature blue-veined cheese. **Innovative**

**Food Science & Emerging Technologies**, v.11, n.1, p.68-77, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856409001246>>. Acesso em: 20 set. 2018.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. H. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. *Food Control, Reading*, v. 63, n. 1, p. 201-215, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713515302863>>. Acesso em: 10 ago. 2018.

ZANDONADI, R.P. et al. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de autosserviço. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 1, p. 19-26, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732007000100002&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732007000100002&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 5 ago. 2019.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência rural**, Santa Maria, Vol. 37, n. 3, p. 862-867, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782007000300040](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782007000300040)>. Acesso em: 5 jul. 2018.

ZEGARRA, J. J. Q. et al. Pesquisa de microorganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p. 312-321, 2009. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/vet/article/view/425>>. Acesso em: 5 mar. 2019.