

**COMPORTAMENTO DO
STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM QUEIJO
MINAS FRESCAL FABRICADO COM LEITE
CRU**

ALESSANDRA LIMA SANTOS

2004

58434

049948

ALESSANDRA LIMA SANTOS

COMPORTAMENTO DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM QUEIJO
MINAS FRESCAL FABRICADO COM LEITE CRU

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência de Alimentos, para a obtenção do título de "Mestre".

Orientadora

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2004

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Santos, Alessandra Lima

Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru / Alessandra Lima Santos. – Lavras : UFLA, 2004.

54p. : il.

Orientadora: Roberta Hilsdorf Piccoli do Valle.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Queijo minas frescal. 3. Leite cru. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-637.35

ALESSANDRA LIMA SANTOS

COMPORTAMENTO DO *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM QUEIJO MINAS FRESCAL
FABRICADO COM LEITE CRU

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciência de Alimentos, para a obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 11 de agosto de 2004.

Prof. Dr Luiz Ronaldo de Abreu

UFLA

Profa. Dra. Fabiana Queiroz Ferrua

UFLA

Profa. Dra. Cristiane Gattini Sbampato

UFLA

Profa. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

A Deus, por tudo que fizestes por mim e por estar sempre ao meu lado.

Ao meu marido, meu grande amor, minha benção, Renato, pelo companheirismo, amizade, incentivo, paciência e muita dedicação.

A minha mãe, Anna Maria, a quem devo tudo na vida, e dedico todo o meu amor.

Aos meus irmãos Anna Claudia e Jorge Henrique por todo apoio dado por todos esses anos,

A minha segunda mãe que tanto adoro, admiro e que mora no meu coração Judith (minha avó).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar em meu caminho.

À UFLA e a seus professores pela oportunidade e aprendizagem.

As duas pessoas especiais, a quem devo muito, minha orientadora Roberta, e co-orientador Luiz Ronaldo pela amizade (principalmente), estímulo, paciência, ensinamentos e sabedoria.

A toda a minha família, a minha querida madrinha, Alice, por todas as suas orações.

A minha sogra, Alda, e aos meus sobrinhos, Rauni, Hugo e Pedro, pelo carinho e confiança.

A professora Fabiana pelo apoio no início da minha jornada.

Aos amigos conquistados nesta jornada: Alexandre, Cristiane, Cleube, Gisele, Jaíne, Nélio, Simone, Vitor, dentre vários outros.

A minha amiga Simone que tanto me ajudou no andamento do experimento.

Ao Paulo e Creusa, que foram como pais para mim, sempre me apoiando, nunca deixando eu desanimar.

À Eliane, por toda ajuda, indispensável na realização do experimento.

Ao "Seu Piano", Sr. Miguel, Aleida e Dona Ivone pela agradável companhia.

A Sandra e Tina, pela ajuda e pelo convívio.

A todos estagiários e bolsistas de iniciação do Laboratório de Microbiologia dos Alimentos, em especial Ariana a quem tanto me ajudou.

À Rafaela, Helena e Luciana por todos esclarecimentos e paciência.

A todos professores do Departamento de Ciência dos Alimentos, UFLA, pelos grandes ensinamentos transmitidos ao longo desta jornada.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro e pelo portal Periódicos Capes.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro.

A todos, meus sinceros agradecimentos. Muito obrigado!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
2.1 Inocuidade alimentar.....	4
2.2 O Queijo minas no Brasil.....	5
2.3 Qualidade do leite.....	6
2.4 Microbiologia do leite cru e derivados lácteos.....	8
2.4.1 Qualidade microbiológica do leite cru.....	8
2.4.2 Qualidade microbiológica de queijos de fabricação artesanal.....	11
2.5 Legislação.....	13
2.6 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Microrganismo e padronização do inóculo.....	19
3.2 Fabricação do queijo minas frescal.....	21
3.3 Análises microbiológicas.....	24
3.3.1 Preparo das amostras.....	24
3.3.2 Quantificação de Coliformes a 35 ^o C e termotolerantes.....	24
3.3.3 Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp e <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva.....	25
3.3.4 Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	26
3.4 Análises físico-químicas.....	27
3.4.1 Leite.....	27

3.4.1.1 Acidez titulável.....	27
3.4.1.2 Gordura.....	27
3.4.1.3 Densidade.....	27
3.4.1.4 Sólidos totais.....	27
3.4.1.5 Pesquisa de enzimas.....	27
3.4.2 Queijo.....	28
3.4.2.1 Umidade.....	28
3.4.2.2 Gordura.....	28
3.4.2.3 Extrato seco total.....	28
3.4.2.4 Gordura no Extrato Seco.....	28
3.4.2.5 Resíduo mineral fixo.....	29
3.4.2.6 pH.....	29
3.4.2.7. Proteínas.....	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	30
4.1 Resultados microbiológicos.....	30
4.2 Resultados físico-químicos.....	42
4.2.1 Leite.....	42
4.2.2 Queijos artesanais.....	43
5 CONCLUSÃO.....	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

RESUMO

SANTOS, Alessandra Lima. Comportamento do *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal fabricado com leite cru. 2004. 54p Dissertação – (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O *Staphylococcus aureus* continua sendo uma das principais causas de intoxicações alimentares no mundo todo, abrangendo diversos tipos de alimentos, dentre eles os produtos lácteos. Com o intuito de avaliar o crescimento de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal fabricado com leite cru, cepas desta bactéria foram inoculados no leite, em diferentes concentrações, sendo utilizado o leite inoculado para a fabricação do queijo. A produção do queijo minas frescal foi realizada no laboratório de laticínio, tomando-se os devidos cuidados higiênicos sanitários. Após a ordenha e resfriamento do leite, ele foi levado da fazenda ao laboratório de laticínios em latões de aço inoxidável de 25 litros. Após sua recepção no laboratório, foi homogeneizado ainda no latão e retirado amostras para análises físico-químicas (densidade, gordura, acidez, sólidos totais e pesquisa de enzimas) e microbiológicas (quantificação de coliformes a 35°C e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva e pesquisa de *Salmonella* sp). O leite cru antes da inoculação apresentou 1×10^{13} UFC/mL de *S. aureus*, estando altamente contaminado. Também foi encontrado um elevado NMP de coliformes a 35°C e 45°C/ mL de leite maior que $2,3 \times 10^{10}$. O leite foi aquecido a 37°C e nele inoculado *S. aureus* ATCC 25923. Em três tanques foram inoculados o microrganismo nas concentrações $1,3 \times 10^5$ UFC/mL, $2,6 \times 10^5$ UFC/mL, $3,9 \times 10^5$ UFC/mL, sendo que, no quarto tanque não houve inoculação. A partir de cada tanque foram obtidos dois queijos, mas apenas um deles foi submetido a salga seca. Após a desenformagem dos queijos eles foram acondicionados em embalagens de PVC esterilizadas com álcool 70% e em U.V. por 30 minutos, estocados a 7°C por sete dias. Durante este período, os queijos com salga (independente da alíquota) apresentaram maior contagem de *S. aureus* quando comparados com os queijos sem salga. Esse fato deve-se a tolerância do *S. aureus* ao sal e à a_w reduzida, pois o microrganismo multiplica-se com facilidade nos meios que contêm de 5-25% de cloreto de sódio, competindo melhor com outros microrganismos. Os resultados do controle microbiológico apresentaram elevada contagem de *S. aureus*, tanto do leite, quanto do soro e da massa do queijo minas frescal sem inoculação, refletindo a baixa qualidade do leite utilizado neste estudo. As contagens de coliformes nos queijos a 30°C e a 45°C foram elevadas, indicando a possibilidade de presença de

Comitê Orientador: *Comitê de Orientação: Profa Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFLA (Orientadora), Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFLA

outros patógenos entéricos e o grande perigo que os queijos fabricados com leite cru podem representar para a população. Com relação as características dos produtos não houve alteração nos padrões físico-químicos.

ABSTRACT

Santos, Alessandra Lima. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in Minas frescal cheese manufactured with raw milk. 2004. 54p (Dissertation-Mastership in Food Engineering) –Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.

Staphylococcus aureus is one of the main cause of food poisoning worldwide, involving several types of food, including dairy products. With the purpose to evaluate the behavior of *Staphylococcus aureus* in Minas cheese, raw milk was inoculated with a specific strain of this bacteria and cheeses were manufactured with this milk. Minas frescal cheeses production was carried out in a dairy plant, where all the hygienical and sanitary conditions were observed. After milking and cooling, milk was taken from the farm to the dairy plant in a 25L stainless steel cans. Subsequently, milk was stirred and samples were taken for physical and chemical (density, fat content, acidity, total solids and enzyme activity) and microbiological analysis (coliform at 35°C and thermotolerant, *Staphylococcus spp* counting, *Staphylococcus* positive coagulase and search for *Salmonella sp*). Raw milk, before inoculated presented 1×10^{13} CUF/mL of *Staphylococcus aureus*, being also highly contaminated. It was also found a high MPN of coliform at 35°C and at 45°C/mL higher than $2,3 \times 10^{10}$. After analysis, milk was divided into four tanks and heated to 37°C, than, each tank was inoculated with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, in the concentrations of: $1,3 \times 10^5$ CUF/mL, $2,6 \times 10^5$ CUF/mL, $3,9 \times 10^5$ CUF/mL, being the fourth tank not inoculated. Two cheeses were obtained in each vat, being one dry salted and the other remained unsalted.. After removing from hoop cheeses were conditioned in sterilized PVC packagings previously sterilized with 70% alcohol and U.V. light for 30 minutes. After packaging cheeses were stored at 7°C for seven days. During this period, salted cheeses (independente of the inoculation number) presented a large number of *Staphylococcus aureus* when compared to non-salted cheeses. This is related to the *Staphylococcus aureus* tolerance to salt and to the reduction of a_w , since the microorganism easily multiplies in medium containing 5 to 25% of sodium chloride, therefore competing efficiently compared to other types of microorganisms. The results of the microbiological analysis presented high rates of *Staphylococcus aureus* in both milk and whey as well as in the final product mass of the treatment without inoculation, reflecting the poor quantity of milk used in this study. The coliform counting of the cheese at 30°C and at 45°C was high, indicating a possible presence of others enteric pathogens, and the high risks that cheese elaborated with raw milk can bring to the consumer. As far as physico-chemical properties are concerned it was not observed any differences among treatment.

Comitê Orientador: *Comitê de Orientação: Profa Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli – UFPA (Orientadora), Prof. Dr. Luiz Ronaldo de Abreu – UFPA

1 INTRODUÇÃO

A fabricação industrial do queijo no Brasil iniciou-se no século XVIII em Minas Gerais, onde predominavam criações de gado de leite. Assim, o queijo minas alimentava os exploradores de ouro nas serras mineiras. Esse queijo apresenta grau de semelhança com o queijo branco fabricado em alguns outros países na América Latina. É um dos produtos lácteos mais difundidos no Brasil, tanto no âmbito de produção industrial quanto artesanal, o que deve-se, principalmente, à simplicidade da tecnologia empregada em sua fabricação e à versatilidade de utilização.

O consumo de leite e derivados lácteos é expressivo no Brasil, sendo o de queijo de 2,3 quilogramas *per capita* ao ano.

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijo no Brasil, com cerca de 215 mil toneladas por ano, correspondendo a 50% da produção nacional (Faria et al., 2002).

Uma das atividades amplamente difundidas no meio rural do país é a indústria caseira de queijos artesanais, inclusive como forma de aumentar a renda familiar. Esse tipo de produto, disponível para venda em diversos estabelecimentos comerciais, pode representar risco à saúde pública se práticas de controle sanitário do rebanho leiteiro e de pasteurização da matéria-prima, dentre outras, não forem seguidas com o seu devido rigor.

De acordo com o Sindicato das Indústrias Laticinistas do Estado de Minas Gerais (SILEMG), existem 1.253 estabelecimentos do gênero em Minas Gerais, gerando cerca de 350 mil empregos diretos e cerca de 2 milhões indiretos, com faturamento anual de 5,5 bilhões de reais e apresentando crescimento de 10% ao ano.

Dentre as variedades de queijos produzidas no Brasil, o tipo minas destaca-se pela sua grande produção e comercialização, e o seu consumo representa 16% em relação às outras variedades de queijo.

Em Minas Gerais, a produção de queijo Minas a partir de leite cru é uma atividade tradicional em vários municípios, sendo a maior produção concentrada nas regiões do Serro, Serra do Salitre e Serra da Canastra, que respondem por 68% de toda a produção mineira (Martins, 2001). Na sua quase totalidade, esses queijos são fabricados a partir de leite cru, o que vem gerando discussão entre os técnicos da área, devido ao fato desse tipo de produção ser potencialmente perigoso ao consumidor e ser proibido pelo MAPA e ANVISA (RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001). Contudo, a Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002 (assinada pelo governador do estado de Minas Gerais), permite a fabricação de queijo artesanal a partir de leite cru, somente nas regiões do Serro, da Serra do Salitre e da Serra da Canastra.

Uma das características que torna o queijo minas frescal artesanal um alimento que pode oferecer riscos à saúde humana é o fato de ele ser produzido com leite que não sofre nenhum tipo de tratamento térmico. Entre esses fatores há também o local de sua fabricação que na grande maioria, apresenta condições higiênicas insatisfatórias. Porém, devido às exigências sobre a qualidade do leite e a sanidade dos rebanhos leiteiros que, estão sendo implantadas no Brasil, atualmente já se pode falar em produtos fabricados com leite cru, principalmente os queijos que passarão por processo de maturação por períodos relativamente longos.

Devido à importância do *Staphylococcus aureus* como bactéria toxigênica e do queijo minas como importante fator sócio-econômico para o estado, estudos devem ser conduzidos para contribuir para a produção tradicional do queijo e ao mesmo tempo torná-lo seguro ao consumidor.

Em face do exposto, esse trabalho tem como objetivo avaliar o comportamento do *Staphylococcus aureus* inoculado em queijo minas artesanal, com e sem salga, fabricado com leite cru.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inocuidade alimentar

Os alimentos podem servir como veículos de agentes patogênicos ao homem ou como substrato para microrganismos que poderão elaborar substâncias nocivas, trazendo prejuízos quando ingeridas pelo homem ou animais (Gonçalves, 1998).

Os alimentos possuem papel fundamental na economia de qualquer país e, além disso, destaca-se o restrito relacionamento entre os alimentos e a saúde. Dessa forma, os padrões sanitários devem ser elaborados para que os alimentos apresentem boa qualidade e segurança física, química ou biológica. Problemas biológicos na segurança dos alimentos ocorrem principalmente, pela sua manipulação inadequada, que é a principal responsável pela maioria dos casos de doenças de origem microbiana transmitidas por eles. Dentre os fatores classificados como manipulação inadequada encontram-se a temperatura incorreta empregada no preparo e conservação dos alimentos, a ocorrência de contaminação cruzada, os problemas na higienização pessoal, dos manipuladores e equipamentos, e a presença, na linha de produção, de portadores de organismos patogênicos, dentre outras (Ungar et al., 1992).

Uma vez portadores de agentes biológicos nocivos, os manipuladores podem levar as mãos à boca, aos olhos, ao nariz ou a roupa, contaminando suas mãos e o alimento (Gonçalves, 1998). Além da contaminação dos alimentos pelas mãos de manipuladores portadores de agentes patogênicos, estes podem alcançar o alimento via respiração, tosse e espirros, dentre outros modos.

No caso particular das toxinfecções alimentares, o enfoque ocorre na contaminação bacteriana, uma vez que essa é a maior causa desse tipo de enfermidade.

Uma seqüência de eventos devem se seguir para doenças de origem alimentar inicialmente o agente etiológico deve estar presente no homem, em alimentos ou no meio ambiente em que esses alimentos estarão presentes. Assim, se não presente inicialmente no alimento, o microrganismo, principalmente bactérias, deve contaminá-lo antes, durante ou após o processamento. Essa contaminação se dá por meio de alimentos crus, pelas mãos dos manipuladores, por superfícies e equipamentos mal higienizados ou por carregamento pelo ar. Uma vez no alimento em número suficiente para sobreviver ao processamento, causa a doença; se em número insuficiente, os microrganismos devem se multiplicar até atingir tal número ou produzir uma toxina em quantidade necessária ocasionando a doença, quando a quantidade de alimentos contaminados for suficientemente ingerida. Para que isso ocorra o alimento deve estar organolepticamente aceitável (Bryan, 1980).

2.2 O queijo Minas no Brasil

O queijo é o produto, fermentado ou não, obtido pela coagulação do creme, leite integral, padronizado ou desnatado, seguido de dessoragem, contendo, no mínimo, 23 gramas de extrato seco/100 gramas do produto. Excluem-se desta definição, os queijos frescais, que podem conter um elevado teor de água (Furtado, 1983), sendo possível elaborar grande número de variedades de queijos a partir da mesma matéria-prima, alterando apenas a técnica de elaboração e de maturação (Stobberup, 1985).

O queijo minas compreende duas variedades, representadas pelo minas “curado” e minas “frescal”, cujo volume da fabricação sofreu grande reversão de tendência a partir da década de 1980. O queijo minas “frescal”, que até então representava menos de 1/3 do total fabricado, superou a produção do queijo minas “curado”, e é atualmente, o tipo mais produzido dentro desta categoria.

O queijo minas frescal é um produto de massa crua, com alto teor de água (60%) e que não sofre maturação. Geralmente é consumido nos primeiros sete dias que se seguem à maturação. A maturação é definida como sendo o período em que os queijos são deixados em “condições especiais” visando dar oportunidade à ocorrência de modificações bioquímicas, físicas e microbiológicas, a fim de transformar a massa insípida e sem forma definida do início, em um produto rico em aroma e sabor e com textura, consistência e coloração próprias (Carvalho & Silva, 1993).

O mais tradicional queijo brasileiro, o minas, começou a ser produzido no período colonial, no estado de Minas Gerais, mais precisamente na região da Serra da Canastra (Silva & Castro, 1995). Nas regiões Sudeste e Sul, ele tem caráter cultural marcante, constituindo-se, inclusive, como produto típico de diversas cidades turísticas (Carvalho & Silva, 1993).

2.3 Qualidade do leite

A qualidade microbiológica do leite tem importância para a indústria, onde sofre diversos processos originando os mais variados produtos lácteos conhecidos e também para o consumidor, já que o leite pode veicular graves patógenos alimentares (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7, entre outros). No entanto, é um alimento extremamente necessário por ser fonte de energia, proteínas, vitaminas e minerais.

A qualidade do leite é importante fator que tem sido incluído no sistema de pagamento em todo o mundo. Desde então, a qualidade do leite cru, que é decisiva na determinação da qualidade dos produtos lácteos, tem se tornado fator importantíssimo para o estabelecimento de bases para o pagamento de leite (Varnam & Sutherland, 1994).

O sistema de pagamento pela qualidade, no Brasil, tem mudado nos últimos anos, com o objetivo de aumentar o volume, a composição e a produção higiênica sanitária do leite. Os parâmetros de avaliação adotados incluem a qualidade do leite (contagem total, contagem de psicrotróficos, contagem de células somáticas e teste de sedimentação, dentre outros), condição e escala de produção (Souza et al., 1997). A fim de estabelecer o sistema de pagamento baseado na qualidade do leite, devem ser tomados em conta os seguintes aspectos: melhorar a qualidade higiênica das fazendas; melhorar a composição do leite em relação ao sistema adotado, considerando os interesses sociais, nacionais e a situação do comércio; estimular a produção do leite baseada na administração prática e racional e estabelecer categoria e sistema uniformes, a fim de regulamentar às condições e finalidades da atividade, encorajando indústrias produtoras ao desenvolvimento planejamento sólido e racional com bases econômicas (Sakai, 1991).

A qualidade higiênica do leite depende de vários aspectos, tais como estado sanitário dos animais, habilidade do ordenhador e higienização de equipamentos e de todas as superfícies que entram em contato com o produto. As condições sob as quais o leite é produzido, estocado na fazenda e transportado para a usina de beneficiamento, afetam diretamente sua qualidade higiênica (Huhn et al., 1980). Apesar da resolução do MAPA estabelecer parâmetros físico-químicos e microbiológicos para leite cru e pasteurizado inúmeras vezes têm sido levadas ao público diversas denúncias sobre a qualidade do leite pasteurizado distribuído e destinado ao consumo.

A boa qualidade do leite destinado ao consumo é fator de extrema importância uma vez que o leite é considerado uma das principais fontes nutrientes para a grande parte da população. Porém, as mesmas excelentes qualidades que o fazem ser consumido, também o fazem um dos alimentos mais susceptíveis a sofrer alterações microbiológicas e físico-químicas.

A qualidade microbiológica do leite tem importância para a indústria, onde sofre diversos processos, originando os mais variados produtos lácteos conhecidos.

A contaminação do leite altera a sua qualidade, podendo agir como um veículo de microrganismos patogênicos, promovendo doenças infecciosas ou intoxicações alimentares, colocando em risco a saúde do consumidor e podendo levar à condenação do leite (Frazier & Wersthoff, 1993; Henriques et al., 1995; Beloti., 1996).

2.4 Microbiologia do leite cru e derivados lácteos

2.4.1 Qualidade microbiológica do leite cru

O leite cru, normalmente, apresenta uma microbiota mista proveniente do úbere, das superfícies exteriores do animal, dos equipamentos e recipientes utilizados na ordenha. De maneira geral, a microbiota do leite depende do número de microrganismos que entram em contato com o leite antes da ordenha ou por meio de contaminações subseqüentes e a multiplicação microbiana depende do tempo e da temperatura de estocagem do leite (Burton, 1986).

Por sua riqueza nutricional, o leite é um alimento facilmente deteriorável; assim, mesmo sendo mantido à temperatura de 7°C a 8°C, alguns grupos microbianos podem proliferar, sendo capazes de dobrar sua população em intervalos de 20 a 30 minutos. Isto aponta para a necessidade do monitoramento da qualidade do leite, em toda a sua cadeia produtiva, visando reduzir os riscos potenciais à saúde do consumidor e, até mesmo, a eficácia da agroindústria (Faria et al., 2002). A qualidade microbiológica inicial do leite cru é variável entre as fazendas leiteiras do mundo inteiro, principalmente se o leite não for resfriado logo após a ordenha. No entanto, independentemente da situação, três pontos principais de contaminação são distinguidos: o interior do úbere, o exterior dos tetos e os equipamentos de ordenha e estocagem

(Heeschen, 1998). O resfriamento do leite nas primeiras duas horas após a ordenha é de fundamental importância para impedir o crescimento bacteriano, pois, neste período, as substâncias inibidoras naturais do leite dificultam o crescimento de contaminantes, advertiram Moraes et al. (1999). Segundo estes autores, dentre os pontos críticos que influem na qualidade bacteriológica do leite cru no Brasil estão a sanitização do vasilhame de transporte, o tempo transcorrido até a entrega, a temperatura do leite e a carga bacteriana inicial.

Por outro lado, Borges & Oliveira (1999) enfatizaram, que num país de clima tropical como o Brasil, se o leite cru não sofrer refrigeração adequada durante todo o tempo até seu consumo, se for transportado em latões sujos e se for misturado com outros de qualidade inferior, o processo de pasteurização não fornecerá um produto final de boa qualidade, mas apenas o beneficiará.

Leite informal é o leite fluido sem tratamento térmico que normalmente é consumido diretamente nas propriedades e ou vendido aos consumidores. Hoje, cerca de 22,4% do total do leite consumido encontram-se na informalidade (TETRA PACK, 2003). Este leite representa risco à saúde dos consumidores, pois não apresenta qualquer controle sanitário, tratamento técnico e nem as mínimas condições de higiene.

O leite recém-ordenhado, em condições de assepsia, contém entre 5×10^3 a 5×10^4 UFC/ mL, constituídos de contaminantes procedentes dos condutos galactóforos, equipamentos de ordenha e manipuladores, de modo que deve ser resfriado tão rapidamente quanto possível para manter sua qualidade bacteriológica (Hayes, 1993).

Do ponto de vista de Vargas et al. (1999), o leite deve apresentar contagem microbiana total entre 884 a 1.527 UFC/ mL e, no máximo, 5% desta microbiota devem ser representados por bactérias termodúricas, psicrófilas e psicrotróficas totais. Porém, em contagens de microrganismos de $<10^6$ UFC/ mL não se detectam alterações significativas no leite. No entanto, o crescimento

Apesar do processo de cura e maturação reduzir o número de microrganismos, a eliminação efetiva desses não ocorre, ressaltando-se que o produto pode ser contaminado por microrganismos ambientais durante sua fabricação (Flowers et al., 1992).

As alterações microbiológicas evidenciadas nos queijos, geralmente, são oriundas das condições de processamento, considerando-se a qualidade do leite, da água, cultura láctea, adição de enzima, temperatura de incubação e maturação, umidade, adição de sal e manipulação, como os principais parâmetros determinantes na multiplicação de microrganismos deteriorantes e patogênicos no produto (Richter et al., 1992). Estes autores consideram, ainda, a baixa atividade de água e pH como fatores limitantes para o desenvolvimento de agentes patogênicos em queijos.

A contaminação microbiana de queijos assume destacada relevância em saúde pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*, são comumente encontradas em derivados lácteos. Ainda, o número de coliformes termotolerantes fecais acima do limite permitido pela legislação tem sido relatado em vários estudos, cuja presença constitui uma indicação de contaminação fecal (Peresi et al., 2003).

A maioria dos queijos frescos tipo minas frescal consumidos pela população brasileira, é proveniente de fazendas onde o acesso ao leite recém-ordenhado é fácil e onde podem também ser fabricado. Esse leite, geralmente, não recebe qualquer tratamento para reduzir sua carga bacteriana. Esta condição se agrava se não houver higiene durante a elaboração do queijo e se este for transportado ou armazenado sem refrigeração. A comercialização do queijo minas frescal fabricado artesanalmente tem sido indiscriminada, sendo a qualidade microbiológica, em todo o país, alvo de constante monitoramento por parte dos órgãos de inspeção. As maiorias dos resultados obtidos demonstra a

contaminação de grande parte das amostras analisadas, confirmando o risco que o consumo destes queijos representa à saúde da população.

O número de notificações de toxinfecções de origem alimentar vem aumentando em todo mundo. Este fato é decorrente de fatores tais como distribuição globalizada, aumento da escala de produção, aumento do número de pessoas susceptíveis, tais como idosos (aumento da idade da população mundial) e imuno-deprimidos, melhoria nos métodos diagnósticos e de investigação, etc. Este quadro internacional confere à segurança sanitária de um produto alimentício um “status” cada vez maior, principalmente à medida que o mercado consumidor se conscientiza dos riscos que os mesmos podem trazer à saúde.

O queijo é um alimento perecível, por isso deve ser produzido com matéria-prima de boa qualidade, devendo ser submetido a um eficiente controle de qualidade no laticínio, ser transportado, armazenado e comercializado adequadamente para evitar que seja veículo de doença para a população (Gurgel et al., 2000).

2.5 Legislação

A comercialização de queijos produzidos de leite cru é permitida e regularizada pelo Serviço de Inspeção Federal desde 1952, por meio do Regulamento da Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Este regulamento autoriza o comércio de queijo fabricado com leite cru, desde que submetido a um tempo mínimo de sessenta dias de maturação em entrepostos, baseando-se na hipótese de que, após este período, a microbiota patogênica seria totalmente eliminada.

Este período de maturação de 60 dias é considerado longo pelos produtores e comerciantes de queijo que alegam alto custo de armazenamento e perda das características sensoriais tradicionais do produto. Logo, o queijo minas artesanal, usualmente, é vendido com poucos dias de fabricação, praticamente

fresco, sendo possível, inclusive, visualizar grande quantidade de soro nas embalagens.

Recentemente, foi promulgada, pelo governo estadual de Minas Gerais, a Lei 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que autoriza a produção de queijos minas com leite cru. Essa lei discrimina com detalhes as condições que a produção deve satisfazer para que o produto seja considerado seguro para a saúde do consumidor. Além disso, o queijo minas foi, recentemente, tombado pelo Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico (IEPHA-MG), sendo considerado desde o seu processo de fabricação até o produto final.

Segundo a Lei 14.185, o queijo minas artesanal produzido em área demarcada deve conter, gravado no produto ou na embalagem, a indicação de sua região de origem. Este deve ser armazenado em condições que garantam a proteção contra contaminação e reduzam ao mínimo os danos e deteriorizações (artigo 11 parágrafo 3º). Deverá ser produzido a partir de leite cru, apresentando resultados compatíveis com os exigidos pelo Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002.

2.6 *Staphylococcus aureus*

O primeiro registro dos estafilococos foi feito em 1880, na Escócia, por Alexander Ogston, quando demonstrou que os cocos apresentavam arranjos de cachos após coloração e causavam inúmeras doenças patogênicas ao homem. Tal microrganismo foi denominado de "*Staphylococcus*", derivado do grego, em que "*staphyle*" significa cacho de uvas e "*coccus*" grão de semente (Baird-Parker, 1990).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e apresentam-se como cocos gram-positivos, com diâmetro entre 0,5 a 1,5 µm, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. São aeróbios ou aeróbios facultativos, produtores de catalase e,

normalmente, beta-hemolíticos. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose como em anaerobiose, diferenciando-se, assim, dos microrganismos de gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (Kloss & Schleifer, 1986).

Atualmente, cerca de 33 espécies de *Staphylococcus* são reconhecidas, podendo ser divididas em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos. Essa divisão é baseada na capacidade de coagulação do plasma, que é uma propriedade considerada como importante marcador de patogenicidade dos estafilococos (Trabulsi et al., 1999).

Diversas dessas espécies estão implicadas como agentes causadores de enfermidades no homem e animais. Destes, o *Staphylococcus aureus* é o maior causador de toxiose alimentar em humanos; ele produz compostos extracelulares, como as enterotoxinas estafilocócicas, coagulases, nucleases e lipases. As enterotoxinas são responsáveis pelas toxioses e podem ter uma função na patogenicidade de algumas outras enfermidades estafilocócicas (náuseas, dores abdominais, diarreia e vômito) (Dinges et al., 2000).

Em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos, o *S. aureus* é considerado um dos mais freqüentes causadores de surtos de toxinfecção, devido ao importante papel desempenhado pelos manipuladores, durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos, somando-se aos riscos de contaminação das matérias-primas desde a sua origem e às temperaturas inadequadas de conservação pós-cocção.

O *S. aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não formadoras de esporos. É um organismo coagulase positivo, catalase-positivo, oxidase-negativo e aeróbio facultativo. A temperatura de multiplicação está entre 7°C e 48°C, sendo 37°C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. Suas enterotoxinas são produzidas quando cultivadas às temperaturas entre 10°C

e 48°C, contudo, a faixa de 40°C a 45°C é considerada a ótima para a sua produção.

As faixas de pH e atividade de água (A_w) suportada pela bactéria são muito amplas, ocorrendo o mesmo com a produção de toxinas, embora os limites destas sejam ligeiramente inferiores. O pH situa-se entre 4 e 10, enquanto a A_w entre 0,83 e 0,99 ou superior. Deve-se destacar que estes valores variam de acordo com os substratos e a quantidade de oxigênio do meio. São também tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos.

O valor de $D_{60}^{\circ C}$ para *S. aureus* é de 12 minutos em leite integral e cerca de 21 minutos no soro (Shebuski et al., 2000). O crescimento e a produção de enterotoxinas de *S. aureus* são afetados por alguns fatores no alimento, como qualidade nutricional, pH do substrato, temperatura, atmosfera, atividade de água, concentração de cloreto de sódio, outros agentes químicos e competição com outros microrganismos. Contudo, sendo estes fatores os ótimos para o crescimento dos microrganismos, não necessariamente serão os níveis ótimos para a produção da enterotoxina (Halpin-Dohnalek & Marth, 1989).

O *S. aureus* apresenta distribuição mundial. Estima-se que de 20% até 60% da população humana possam ser portadores da bactéria, sem apresentar qualquer tipo de doença. Nestas circunstâncias, os portadores humanos, mesmo em condições normais de saúde, sempre representam risco quando manipulam alimentos, podendo contaminá-los durante as diferentes fases de preparação, pelas mãos e secreções oro-nasais. Já os portadores de infecções purulentas, notadamente nas mãos, devem se abster de lidar com quaisquer tipos de alimentos.

A presença *S. aureus* em alimentos *in natura*, produtos alimentícios processados ou que serão processados, representa risco potencial para a saúde, uma vez que algumas cepas são produtoras de enterotoxinas termoestáveis,

assim mesmo que o microrganismo seja eliminado, a toxina produzida continua no alimento.

Dentre os principais substratos alimentícios, incriminados epidemiologicamente como capazes de tolerar o desenvolvimento natural do *S. aureus*, podem ser citados os produtos lácteos, como os queijos, leite cru, pasteurizado ou em pó, manteiga e sorvetes, produtos de confeitaria, como bolos recheados, tortas e doces cremosos, carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (Pereira, 1996).

As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo de proteínas de cadeia simples de baixo peso molecular (26.900 a 29.600 Da), produzidas por algumas espécies de estafilococos, principalmente *S. aureus* que, quando ingeridas, podem causar gastroenterite (Pereira, 1996).

A produção de enterotoxinas é compatível com o número de células, sendo uma população mínima de 10^5 UFC/g de alimento citada como necessária para produzir quantidade suficiente de enterotoxina para causar toxiose (Valle et al., 1990). Este número, porém, tem variado conforme o autor, encontrando-se níveis menores. Não existe concordância entre os vários autores sobre a quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar sintomatologia em seres humanos. De maneira geral, estima-se entre 0,015 e 0,375 μg de enterotoxina por quilo de massa corpórea (Franco & Franco, 1996).

Em sua forma biologicamente ativa, as enterotoxinas são resistentes ao calor (termoestáveis), o que constitui um ponto crucial no controle de qualidade de alimentos, já que elas podem persistir no produto final, após o processamento térmico (Bergdoll, 1989). As enterotoxinas estafilocócicas atuam como super antígenos e ativam sistemas de defesa humana quando causam toxiose ou outras doenças (Dinges et al., 2000).

Para evitar o consumo de produtos contaminados, é de grande importância que o leite e seus derivados sejam submetidos a um eficiente controle de qualidade (Brabes, 1999; Leite, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Laticínios e de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Ciências de Alimentos, no campus da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Microrganismo e padronização do inóculo

A cepa de utilizada como inóculo foi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

O inóculo foi padronizado, medido por densidade ótica a 620 nm, utilizando-se o triptic soy broth (TSB) inoculado com a cepa de *S.aureus* e incubada a 37°C. A absorbância foi medida periodicamente, seguida da inoculação da alíquota da cultura em ágar baird parker para a determinação do número de células viáveis por mL. Para tanto, utilizou-se a técnica de plaqueamento em microgota (Figura 1).

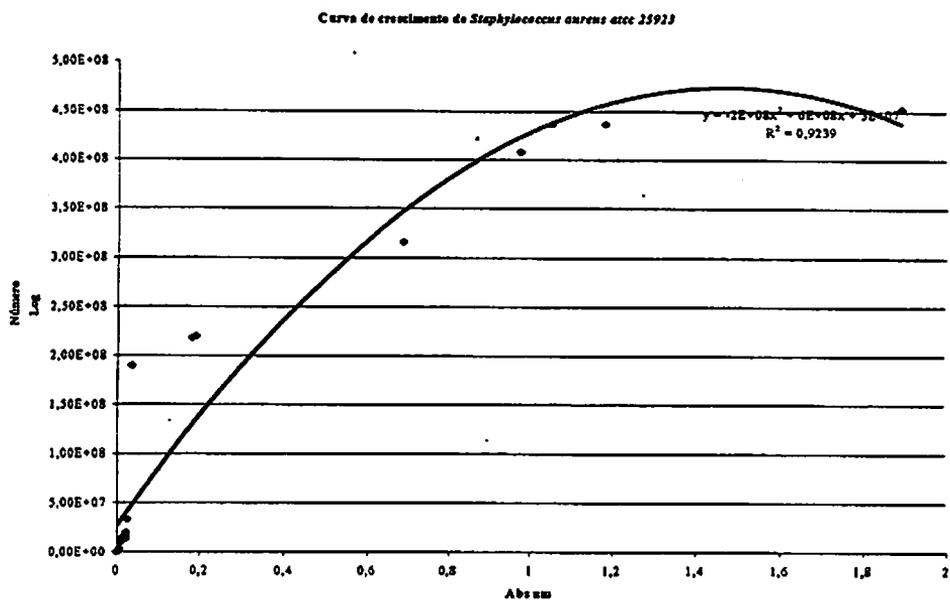


FIGURA 1 Curva de crescimento do *Staphylococcus aureus*, utilizando-se a técnica de plaqueamento em microgota

3.2 Fabricação do queijo minas frescal

A produção do queijo minas frescal foi realizada em laboratório de laticínio, tomando-se os devidos cuidados higiênicos sanitários.

Os queijos foram fabricados com leite cru. Após a ordenha e resfriamento do leite, este foi levado da fazenda ao laboratório em latões de aço inoxidável de 25 litros. Após sua recepção no laboratório, o leite foi “homogeneizado” ainda no latão e retiradas amostras para análises físico-químicas e microbiológicas (Figura 2).

A fabricação dos queijos “frescal” (Figura 3) foi realizada após a divisão do leite em quatro porções iguais de cinco litros, em tanques de fabricação. O leite foi aquecido a 37°C e nele inoculado *S. aureus* ATCC 25923 em diferentes concentrações.

Em três tanques (Figura 3), foi inoculado o microrganismo nas concentrações de $6,5 \times 10^8$ UFC/ mL, $1,3 \times 10^9$ UFC/ mL e $2,0 \times 10^9$ UFC/ mL, não tendo havido inoculação no quarto tanque. Para cinco litros de leite, essas concentrações equivale na $1,3 \times 10^5$ UFC, $2,6 \times 10^5$ UFC e $3,6 \times 10^5$ UFC, respectivamente. De cada tanque foram obtidos dois queijos, e apenas um deles foi submetido à salga. Foram realizadas três repetições.

O processo de salga ocorreu pela salga seca do queijo por oito horas. Após a desenformagem, os queijos foram acondicionados em embalagem de PVC esterilizadas com álcool 70% e em U.V. por 30 minutos e estocados a 7°C por sete dias.

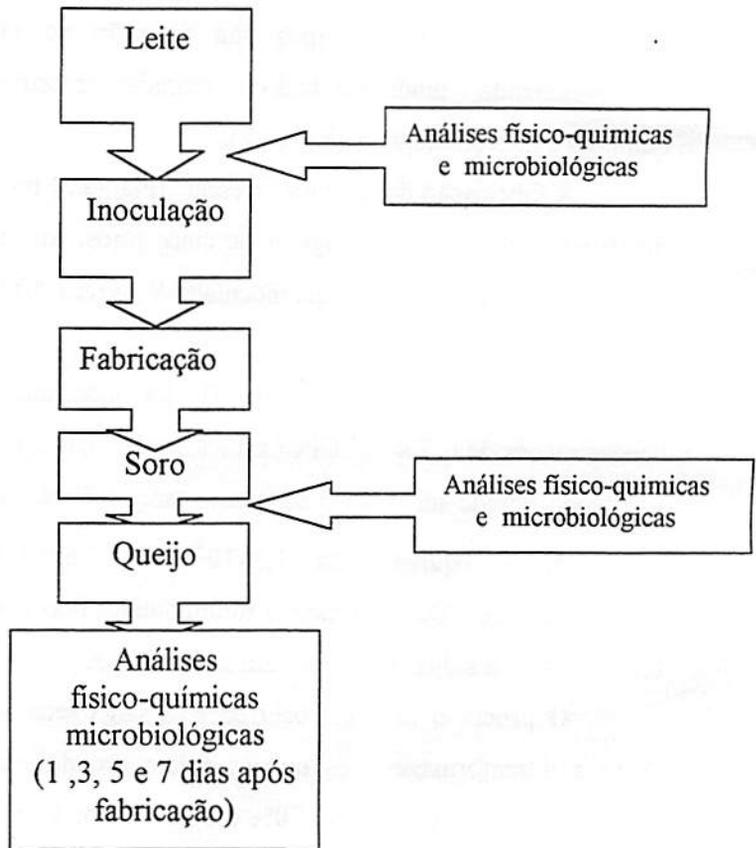


FIGURA 2 Esquema das análises realizadas durante a fabricação do queijo minas frescal.

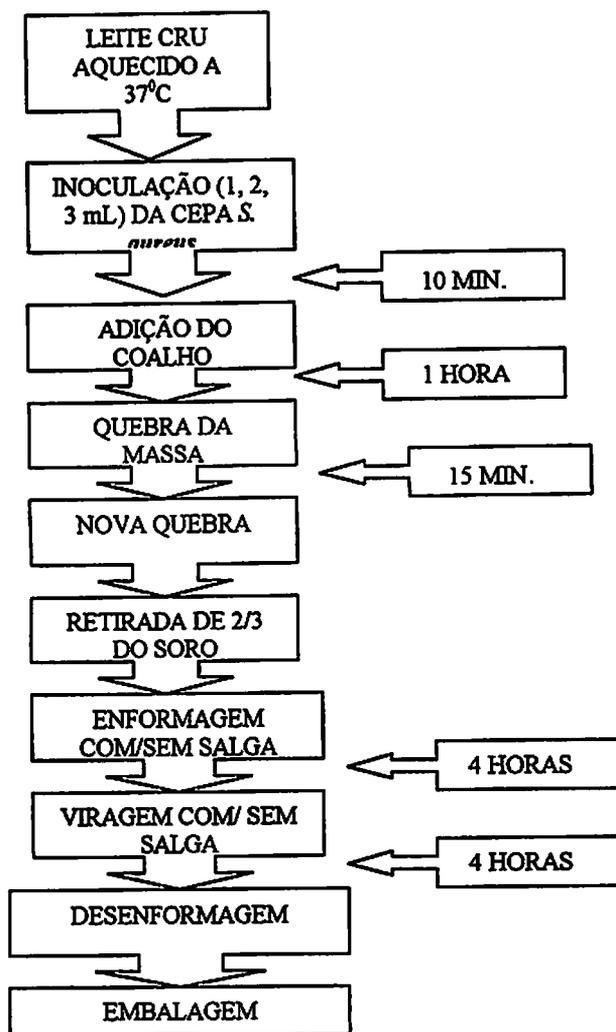


FIGURA 3 Fluxograma de fabricação artesanal do queijo minas frescal

3.3 Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas no leite, no soro e no queijo, com e sem salga. As avaliações microbiológicas nos queijos foram feitas após sua fabricação e com intervalo de dois dias até completar 7 dias de armazenamento.

As análises foram realizadas seguindo-se as normas do ICMSF (2000).

3.3.1 Preparo das amostras

Para todas as análises, os procedimentos de “homogeneização” e diluição das amostras foram realizados de acordo com o descrito, exceto quando mencionado.

Foram preparadas diluições seriadas em água peptonada a 0,1% (P/V) previamente esterelizada. As diluições do leite e soro foram preparadas pipetando-se assepticamente 1 mL da amostra e transferindo-se para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1% (P/V). A partir destas, diluições seriadas foram realizadas.

De cada peça de queijo foram retirados 25 g de forma representativa que foram homogeneizados em 225 mL de solução de citrato de sódio a 2% (P/V), em liquidificador.

3.3.2 Quantificação de coliformes a 35°C e termotolerantes

Coliformes a 35°C e termotolerantes foram determinados empregando-se a técnica do número mais provável (NMP).

O teste presuntivo foi realizado, utilizando-se caldo lauril sulfato triptose (LST) em tubos de ensaio contendo tubos de Durham, utilizando-se três séries de três tubos.

Após semeadura das diluições adequadas, os tubos foram incubados a 35°C, por 24 a 48 horas. Aliquotas das culturas dos tubos positivos foram

transferidas para os tubos contendo caldo lactosado bile verde brilhante a 2% (BGBL) e incubadas a 37°C, por 48 horas, fazendo-se o teste confirmativo. Posteriormente foi efetuada a leitura dos tubos para a determinação do NMP de coliformes a 35°C, com o auxílio da tabela de Hoskins (APHA, 1998).

A determinação do NMP de coliformes termotolerantes foi feita a partir da transferência de alíquotas das culturas dos tubos positivos do caldo BGBL para os tubos contendo caldo EC. Esses foram incubados a 44,5°C por 24-48 horas. Nos tubos positivos foi determinado o NMP de coliformes a 45°C, com o auxílio da tabela de Hoskins (APHA, 1998).

3.3.3 Contagem de *Staphylococcus sp* e *Staphylococcus coagulase positiva*

Das diluições seriadas das amostras de leite cru, soro e queijo com e sem salga foram semeadas alíquotas de 0,1mL em placa de Petri contendo o meio de cultura ágar baird parker (BP), enriquecido com gema de ovo e adicionado de telurito de potássio utilizando-se a técnica de plaqueamento em superfície. A seguir, incubaram-se as placas a 37°C, por 24 a 48 horas.

Após a contagem de colônias típicas e atípicas, cinco colônias de cada placa eram retiradas ao acaso e transferidas para ágar simples fosfatado e estocados à temperatura ambiente. Os microrganismos estocados foram reativados em caldo BHI, incubando-os a 37°C por 24 horas. Após esse período as alíquotas das culturas foram estriadas em ágar nutriente. As colônias isoladas foram submetidas ao método de coloração de gram e ao teste da catalase. Os isolados catalase positivos e que apresentavam características morfológicas do gênero *Staphylococcus*, foram novamente transferidos para caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após este período as culturas já puras foram submetidas ao teste de coagulase e termonuclease.

3.3.4 Pesquisa de *Salmonella* sp

Para a verificação da presença ou ausência de *Salmonella* sp no queijo, foram homogeneizados 25 g de cada peça de queijo em 225 mL de água peptonada 0,1%. Após a incubação por 24 horas a 42°C, 1 mL dessa suspensão foi transferido para 10 mL de caldo selenito cistina e 10 mL de caldo rappaport, vassiliadis, sendo posteriormente incubados a 42°C. Depois de 24, 48 horas foram realizadas sementeiras por esgotamento em placas de petri contendo ágar salmonella-shigella (SS) e ágar verde brilhante (Brasil, 1981). Em seguida, realizou-se a confirmação com testes preliminares por meio de provas bioquímicas, as quais consistiram de sementeira dessas colônias nos tubos de ágar de tríplice açúcar ferro (TSI) e tubos de ágar lisina ferro (LIA). Os tubos de TSI com reações características de *Salmonella* mostraram rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S. Reação atípica em TSI, que não seria descartada se as demais reações em LIA se apresentassem típica com rampa e fundos ácidos (amarelos), com ou sem produção de H₂S. As reações típicas em LIA seriam rampa e fundo alcalino (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S. Reação atípica em LIA, que não seria desprezada se as demais reações de TSI se apresentassem típicas com fundo amarelo com rampa alcalina, com ou sem produção de H₂S. Posteriormente os resultados positivos foram confirmados pelos testes bioquímicos, e sorológicos realizados a partir dos tubos de TSI. Deve-se considerar como *Salmonella* todas as colônias que apresentam as seguintes características: reações típicas em TSI e LIA, teste sorológico somático polivalente (+), teste de uréase (-), teste de indol (-), teste de fermentação da lactose (-), teste de vermelho de metila (+) e Voges Proskauer (-), teste de citrato (+) (APHA, 1998).

3.4 Análises físico-químicas

3.4.1 Leite

3.4.1.1 Acidez titulável

A acidez titulável ($^{\circ}$ D) foi determinada utilizando-se acidímetro Dornic, com solução de NaOH N/9 (solução dornic) e solução alcoólica de fenolftaleína devidamente calibrada como indicador, como descrito por Brasil (2003).

3.4.1.2 Gordura

Os teores de gordura foram determinados pelo método do butirômetro de Gerber, descrito por Brasil (2003). Para esta análise foi utilizada uma centrífuga do tipo Gerber, da marca Fanem.

3.4.1.3 Densidade

Foi utilizada a leitura direta em termolectodensímetro, previamente calibrado, corrigindo-se o efeito da temperatura segundo Brasil (2003).

3.4.1.4 Sólidos totais

A determinação dos sólidos totais foi feita por método indireto, que consiste na utilização do disco calculador de Ackermam, permitindo determinar o teor de sólidos totais por meio da densidade e do teor de gordura de uma amostra.

3.4.1.5 Pesquisa de enzimas

A verificação da atividade enzimática, útil na avaliação do tratamento térmico sofrido pelo leite, é feita mediante a adição a amostra do substrato específico da enzima que se quer testar, em condições ideais para sua atuação. A formação de produto colorido ou a presença de indicador que apresenta reação

colorimétrica com os produtos de degradação permitem identificar a atividade enzimática.

3.4.2 Queijo

3.4.2.1 Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico por meio de estufa de secagem, segundo técnica descrita por Brasil (2003).

3.4.2.2 Gordura

As determinações de gordura foram realizadas pelo método butirométrico de Gerber (Brasil, 2003). A centrífuga e os butirômetros utilizados da marca original Gerber.

3.4.2.3 Extrato Seco Total

Utilizou-se a metodologia descrita por Brasil (2003) para a determinação do extrato seco total. Nessas análises foram utilizadas estufas de secagem (modelo 315-SE FANEM) a 105°C.

3.4.2.4 Gordura no extrato seco (GES)

O teor de gordura no extrato seco foi determinado indiretamente por meio da fórmula abaixo:

$$\%GES = (\%Gd / \%ES) \times 100$$

Sendo:

% GES: teor de gordura no extrato seco, em % (m/ m);

% Gd: teor de gordura da amostra em % (m/ m); e

%ES: teor de extrato seco total da amostra em % (m/ m).

3.4.2.5 Resíduo mineral fixo (Cinzas)

Após a dessecação, a amostra foi submetida à incineração. Dessa forma, a fração orgânica da amostra volatilizou-se sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas ou resíduo mineral fixo no recipiente.

Cálculo do resíduo mineral:

$$\% \text{RMF} = (P_f - T) / (P_i - T) \cdot 100$$

Sendo:

% RMF: resíduo mineral fixo (cinzas), em % (m/ m);

P_f: resultado da última pesagem;

P_i: resultado da pesagem inicial, após adição da amostra;

T: tara do cadinho de porcelana.

3.4.2.6 pH

As medidas de pH foram obtidas utilizando-se pHmetro portátil Tecnal TC - 2P, previamente calibrado, com a inserção do eletrodo diretamente na solução feita do queijo a ser analisado.

3.4.2.7 Proteínas

A porcentagem de proteínas foi determinada pelo método de Kjeldahl, segundo Pereira et al. (2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados microbiológicos

Os valores obtidos com as contagens de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no leite e no soro (Figura 4) variaram de $1,0 \times 10^{13}$ a $2,9 \times 10^{17}$ UFC/mL, (4,46 ciclos \log_{10}) e de $6,3 \times 10^{12}$ a $1,1 \times 10^{15}$ UFC/mL (2,22 ciclos \log_{10}), respectivamente.

Os resultados microbiológico da amostra sem inoculação, indicaram elevada contagem de *S.aureus*, tanto do leite quanto do soro (Figura 4) e da massa do queijo minas frescal (Figura 5) antes da inoculação, o que reflete a baixa qualidade do leite em estudo. As contagens de coliformes a 35°C e a 45°C foram elevadas, maiores que $2,3 \times 10^{10}$ NMP/mL, indicando a possibilidade de presença de outros patógenos entéricos. Esse fato deve-se ao fato do produto ser *in natura*. A não pasteurização do leite representa risco para o consumidor, considerando que esse processo assegura a inativação de patógenos que possam estar presentes na matéria-prima e que são ser importantes fontes de contaminação.

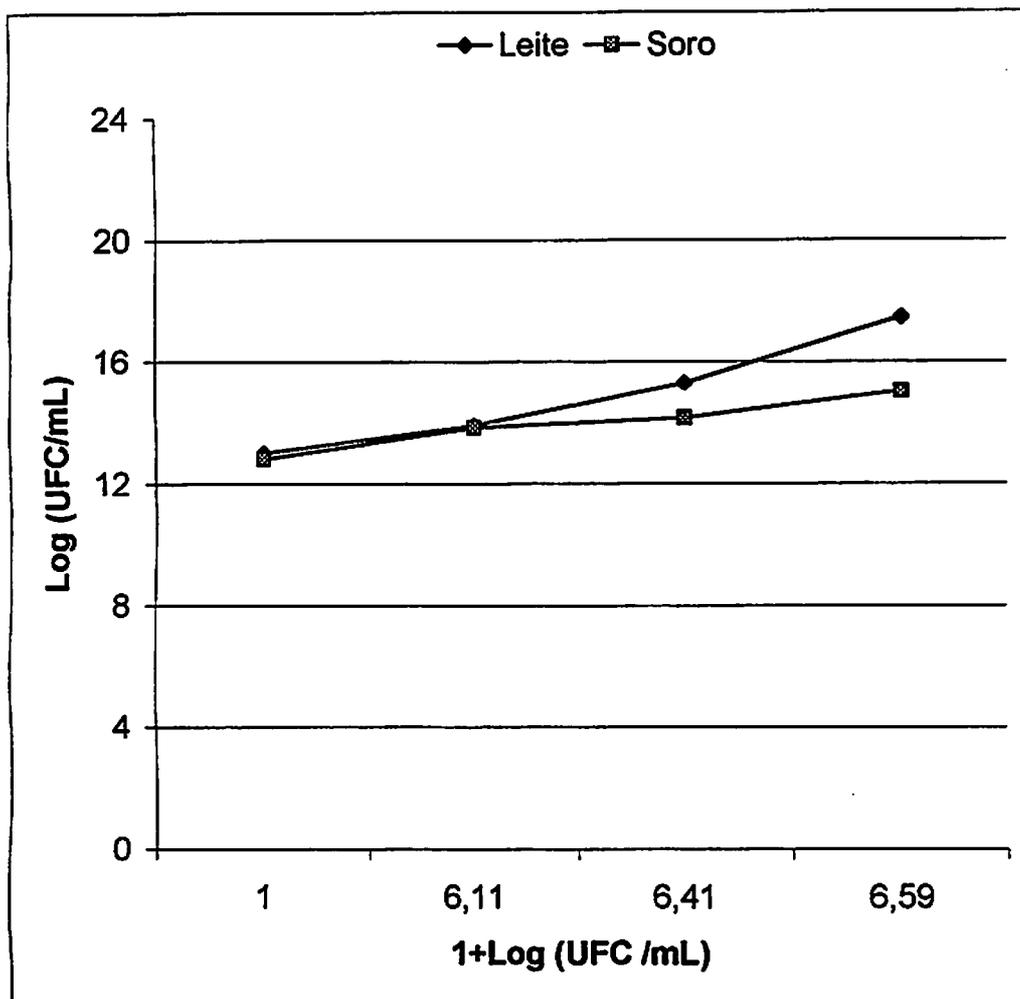


FIGURA 4 Evolução do *Staphylococcus aureus* no leite e no soro, nas diferentes alíquotas inoculadas

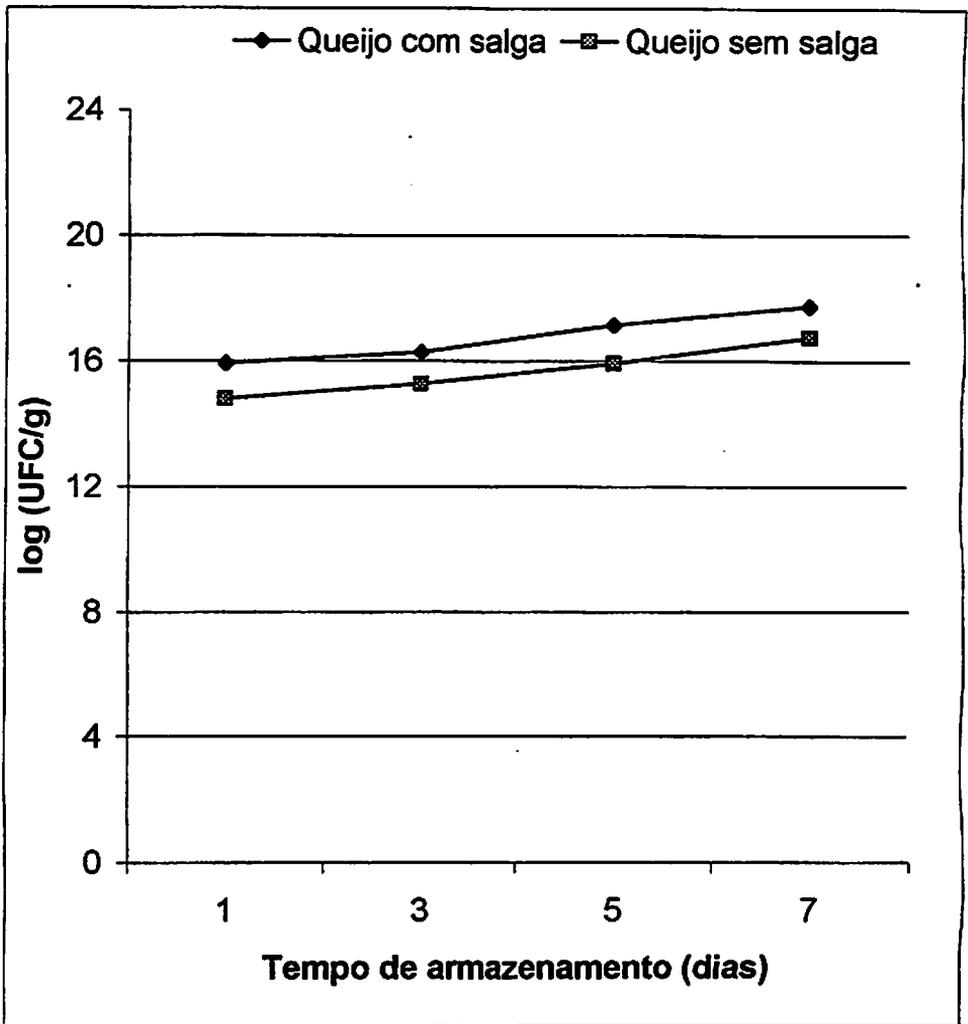


FIGURA 5 Evolução do *Staphylococcus aureus* nos queijos sem inoculação, durante os 7 dias de armazenamento, com e sem salga, produzidos artesanalmente.



Deve-se ressaltar que os valores obtidos (Figura. 5) são os que realmente expressam a carga microbiana do leite, decorrente provavelmente da multiplicação desses contaminantes. Por esse motivo, todos os queijos obtidos do tratamento já apresentavam elevada contagem de *S. aureus*, o que pode ser observado no gráfico da Figura 5.

Já os queijos, tanto com salga quanto sem, que foram inoculados com diferentes alíquotas ($1,3 \times 10^5$ UFC/mL, $2,6 \times 10^5$ UFC/mL, $3,6 \times 10^5$ UFC/mL) (Figuras 5, 6 e 7) com a cepa de *S. aureus* ATCC 25923, apresentaram elevadas contagens, variando de 10^{17} UFC/g a 10^{21} UFC/g.

Os queijos com salga, independente da alíquota inoculada, apresentaram maior contagem quando comparados com os queijos sem salga. Esse fato deve-se à tolerância do *S. aureus* ao sal e à atividade de água (a_w) reduzida, multiplicando-se com facilidade nos meios que contêm 5% a 20% de cloreto de sódio. O NaCl, quando utilizado no processo de fabricação de queijos, exerce efeito negativo sobre a microbiota láctica e, conseqüentemente, um favorecimento da microbiota patogênica. Dessa forma, há diminuição da competição microbiana e o *S. aureus* se multiplica em níveis perigosos durante o período de dessoragem, que ocorre à temperatura ambiente. Pelo fato da salga haver sido realizada a seco, ocorreu um gradiente de concentração no queijo, favorecendo, em certas concentrações, a multiplicação do *S. aureus*.

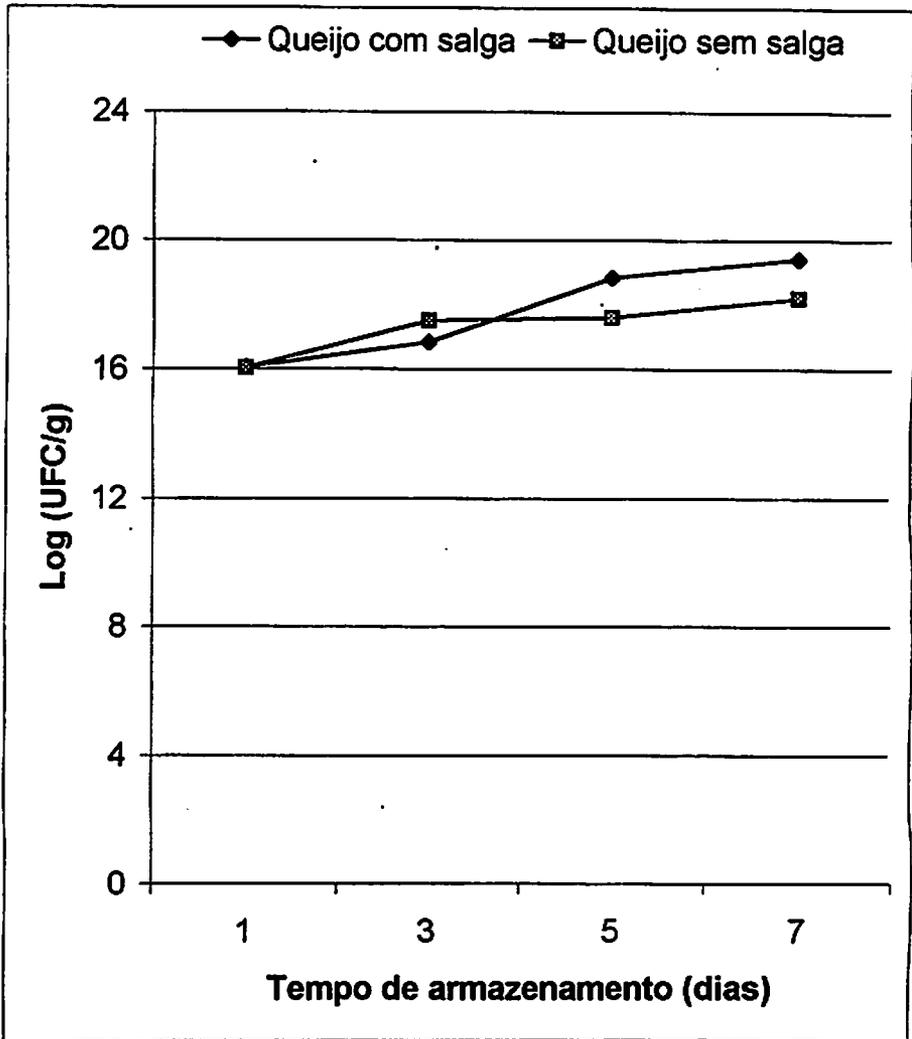


FIGURA 6 Evolução do *Staphylococcus aureus* durante os 7 dias de armazenamento, nos queijos com e sem salga, produzidos artesanalmente, inoculados com $2,6 \times 10^5$ UFC/mL

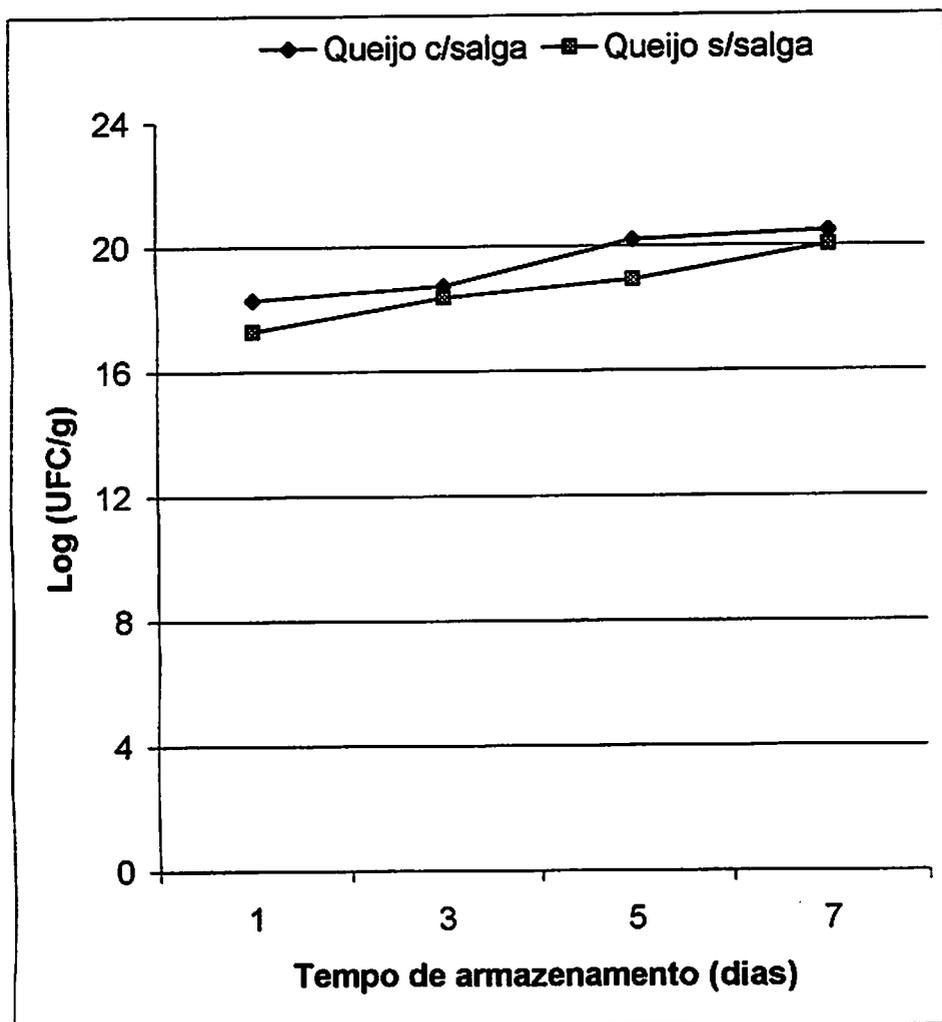


FIGURA 7 Evolução do *Staphylococcus aureus* durante os 7 dias de armazenamento nos queijos com e sem salga produzidos artesanalmente, inoculados com $2,6 \times 10^5$ UFC/mL.

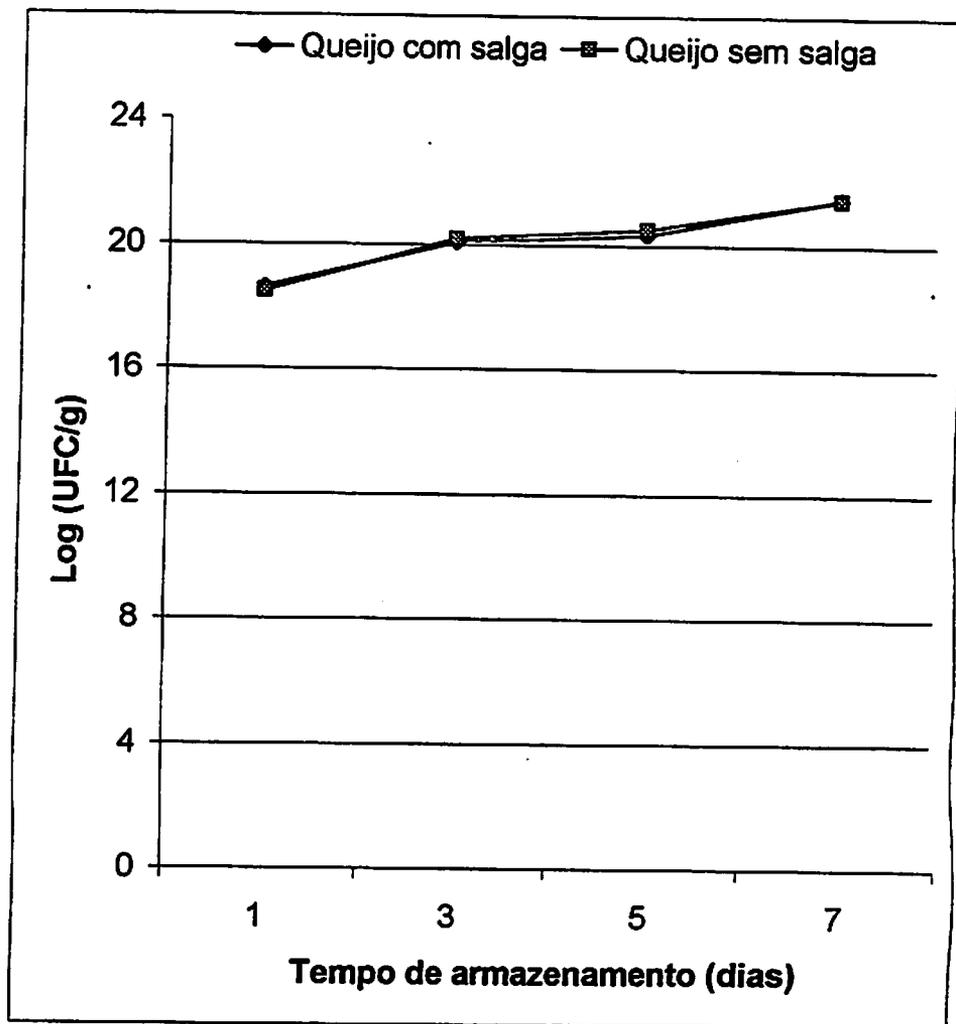


FIGURA 8 Evolução do *Staphylococcus aureus*, durante os 7 dias de armazenamento, nos queijos com e sem salga, produzidos artesanalmente, inoculados com $3,9 \times 10^5$ UFC/mL

Os valores obtidos com as contagens de *Staphylococcus aureus* no queijo com salga e no sem salga sem inoculação (Figura 5) variaram de $8,32 \times 10^{15}$ a $5,75 \times 10^{17}$ UFC/mL, (1,84 ciclos \log_{10}) e de $6,46 \times 10^{14}$ a $5,62 \times 10^{16}$ UFC/mL (1,96 ciclos \log_{10}), respectivamente. No queijo com salga e no sem salga, inoculados com $1,3 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 6), variaram de $1,10 \times 10^{16}$ a $2,63 \times 10^{19}$ UFC/mL, (3,88 ciclos \log_{10}), e de $1,07 \times 10^{16}$ a $1,58 \times 10^{18}$ UFC/mL (2,17 ciclos \log_{10}) respectivamente. No queijo com salga e no sem salga, inoculados com $2,6 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 7), variaram de $1,91 \times 10^{18}$ a $2,81 \times 10^{20}$ UFC/mL, (2,17 ciclos \log_{10}) e de $1,91 \times 10^{17}$ a $1,05 \times 10^{20}$ UFC/mL (2,74 ciclos \log_{10}) respectivamente; já no queijo com salga e no sem salga, inoculados com $3,9 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 8), variaram de $3,80 \times 10^{18}$ a $3,16 \times 10^{21}$ UFC/mL, (2,92 ciclos \log_{10}) e de $2,88 \times 10^{18}$ a $3,02 \times 10^{21}$ UFC/mL (3,02 ciclos \log_{10}), respectivamente. Durante os sete dias de armazenamento houve decaimento do queijo.

Germano & Germano (2002) citam que os *S. aureus*, de modo geral, triplicam-se nas primeiras 24 horas após a fabricação dos queijos, contudo, não se multiplicam durante a fase de maturação; por outro lado, à medida que se eleva a concentração de sal, ou se reduz a atividade de água, preserva-se a capacidade de multiplicação da bactéria, mas inibe-se a produção de enterotoxina.

Os resultados obtidos mostram um quadro semelhante ao relatado pela literatura, ou seja, nos dois tipos de queijo (com salga e sem salga) ocorreu aumento no número de estafilococos após o preparo, mais especificamente após o segundo dia de fabricação, no queijo minas frescal. Posteriormente, em decorrência do aumento da acidez, ou de outro fator associado, provocado pela microbiota láctica ou escassez de nutrientes, o número de *S. aureus* começou a ficar constante para ocorrer, após 5 dias.

A presença desse microrganismo nas amostras de leite estudadas pode ter sido originada de mastite no rebanho, situação citada como possível por Faria et al. (2002). Outros fatores que podem ter contribuído para essa contaminação estão na deficiente higienização dos utensílios utilizados na ordenha, uso de água contaminada, ordenhadores infectados e ou condições inadequadas de refrigeração do produto (Carmo et al., 2003).

Leite et al. (2002) verificaram que das vinte propriedades pesquisadas por eles, em 13 (65%) detectou-se a presença de *S.aureus* em leite cru. Das 60 amostras analisadas por eles, em 21 (36%) encontrou-se a bactéria em contagens superiores a 10^2 UFC/mL.

Das vinte amostras de queijo tipo minas frescal comercializadas em um mercado municipal no Mato Grosso do Sul, 70% das amostras (14) apresentaram valores superiores de *S. aureus* a 10^3 UFC/g, caracterizando um produto em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias. Esses microrganismos são cocos gram-positivos que podem ser encontrados no homem (cabelo, nariz, boca, mãos e pele) e nos animais. Eles produzem uma enterotoxina termoestável no alimento e podem multiplicar-se em atividade de água baixa (0,83). Além disso apresentam características de halofilia e osmofilia, multiplicam-se entre 7 e 48°C e causam um quadro típico de intoxicação alimentar, com período de incubação que pode variar de 30 minutos a 6 horas, provocando náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal.

Filho & Filho (2000) observaram que os maiores pontos de vendas do queijo informal são os mercados municipais e as feiras livres de todas as cidades. Esta forma de comercialização por ambulantes ou mesmo direto na fazenda podem representar riscos adicionais à saúde dos consumidores, tendo em vista a falta de condições de transporte e armazenamento do produto.

Apesar de alguns autores (Brasil, 2003) considerarem o *S. aureus*, coagulase positiva, como a única cepa produtora de enterotoxinas, a literatura

tem demonstrado que algumas cepas de *Staphylococcus* coagulase negativa, como *S. epidermitis*, *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. cohnii*, *S. sciuri* e *S. lentus* podem ser potenciais produtoras de enterotoxinas desencadeando surtos de intoxicação alimentar na população.

Em Goiás, Nicolau et al. (2001) pesquisaram 29 amostras de queijos minas produzidos em laticínios do estado, encontrando 58,6% destas impróprias para o consumo. Faria et al. (2002) analisaram 31 amostras e 94% dos queijos frescos apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 10^3 UFC/g, tendo 14 delas (42,4%) apresentado contagens acima de 5×10^5 UFC/g. Nestes níveis de contaminação já existe a possibilidade de produção de enterotoxinas.

Pesquisando a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, Vilela et al. (2001) encontraram 15,7% de amostras impróprias para o consumo, entre 70 amostras de queijo minas frescal, obtidas de pequenos laticínios de Juiz de Fora, MG e região. As contagens de *Staphylococcus* sp. situaram-se acima de 10^3 UFC/g de queijo. Os mesmos autores citaram vários trabalhos, como o de Silva & Castro (1995), que descreveram um surto envolvendo 15 pessoas, por consumo de queijo minas, no qual foram encontrados *Staphylococcus* sp. e outros microrganismos patogênicos. Filho & Filho (2000) analisaram oitenta queijos, dos quais quarenta apresentaram-se impróprios para o consumo.

Em trabalho realizado no município de Cuiabá, MT, Filho & Filho, (2000) constataram que 10% das amostras analisadas de queijo minas frescal se encontravam na condição de “produto impróprio para o consumo, e potencialmente capaz de causar toxinfecção alimentar”.

Pesquisas microbiológicas realizadas com queijo tipo minas frescal têm permitido o isolamento de inúmeros patógenos, de importância em saúde pública, a partir desse produto. Dentre eles, destacam-se o *S. aureus*, o de maior

ocorrência e, em segundo lugar, pelos coliformes fecais, diversos sorogrupos além de *E. coli* e *L. monocytogenes*.

Amostras de queijo minas Frescal, procedentes de Ouro Preto, MG, revelaram 41,1% de contaminação por *S. aureus* com 10^6 UFC/g (Germano & Germano, 2002). Esses mesmos autores encontraram, em Belo Horizonte, 21,5% das amostras analisadas contaminadas por esse patógeno, com contagens acima de 10^5 UFC/g, enquanto 87,1% encontravam-se com coliformes fecais. Ainda em Minas Gerais, 43,3% das amostras do produto não inspecionado, colhidas no comércio varejista de Belo Horizonte, revelaram-se fora do padrão para *S. aureus*. Trabalho semelhante, realizado na cidade do Rio de Janeiro, identificou que 38,4% das amostras examinadas apresentavam *S. aureus* e 98,1% continham coliformes fecais. Em queijo não pasteurizado, vendido no comércio ambulante da cidade de Belo Horizonte, 60% das amostras examinadas apresentavam *S.aureus* e em 80% das mesmas amostras isolaram-se coliformes fecais, demonstrando o elevado nível de contaminação do produto. Germano & Germano (2002) citam, ainda, que em Ribeirão Preto, SP, 92,3% das amostras apreendidas pelo Serviço de Vigilância Sanitária local, entre 1989 e 1990, estavam em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos. Em amostras colhidas em bares, supermercados, padarias e feiras livres da cidade de Viçosa, MG, foi constatada uma contaminação extremamente elevada do queijo: 89,2% das amostras estavam em desacordo com o padrão para coliformes fecais, enquanto que 100% continham níveis elevados de *Staphylococcus* spp. Deve-se considerar que são necessárias $10^7 - 10^8$ UFC/g do agente para que haja produção de enterotoxina estafilocócica em queijos.

Os *S. aureus*, de modo geral, triplicam-se nas primeiras 24 horas após fabricação dos queijos, contudo, não se multiplicam durante a fase de maturação. Por outro lado, à medida que se eleva a concentração de sal, ou se reduz a

atividade de água, preserva-se a capacidade de multiplicação da bactéria, mas, inibe-se a produção de enterotoxina (Germano & Germano, 2002). Estes mesmos autores verificaram a ocorrência de um surto de intoxicação alimentar por *S. aureus* relacionado ao consumo de queijo minas não pasteurizado, fabricado na fazenda e comercializado pelo próprio fabricante, sem qualquer refrigeração. O surto atingiu 11 pessoas, das quais três foram hospitalizadas. A análise do queijo revelou níveis da ordem de 10^8 UFC/g, indicando o *S. aureus* como agente causador (10^6 UFC/g indicam alto risco de intoxicação).

Em Sobral, CE, analisadas amostras de leite informal verificando-se a sua qualidade sanitária. Neste caso, foram detectados coliformes a 45°C e a 35°C em 100% das amostras, indicando falta de higiene na manipulação e transporte do leite, podendo ser, portanto, fonte de doenças transmitidas por alimentos (Ferreira et al., 2003).

Romano (2002) em pesquisa realizada na região de Jaboticabal, SP, com queijo minas Frescal artesanal, obteve contagens de *Staphylococcus* spp. que variaram de $2,7 \times 10^3$ a $8,5 \times 10^4$ UFC/g, tendo como média $3,2 \times 10^3$ UFC/g.

A presença do microrganismo deve estar associada à contaminação da matéria-prima antes do processamento ou à contaminação do produto durante a sua fabricação por utensílios, manipuladores ou equipamentos.

As diferenças observadas entre uma pesquisa e outra em diferentes regiões e com o mesmo tipo de queijo, talvez possam ser atribuídas às condições higiênicas de obtenção da matéria-prima e do processamento do produto, assim como situações geográficas e culturais de cada região. O leite usado na fabricação dos queijos, proveniente de vacas com mastite clínica ou subclínica, também pode ser responsável pelos altos valores de contagem de estafilococos encontrados na presente pesquisa.

4.2 Resultados físico-químicos

4.2.1 Leite

Os valores médios das análises físico-químicas realizadas nas amostras do leite cru destinado à fabricação do queijo minas frescal produzido artesanalmente (Tabelas 1 e 2), encontram-se dentro dos padrões impostos pela Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de queijo minas artesanal.

TABELA 1 Resultados médios de análises físico-químicas do leite cru destinado à fabricação do queijo minas frescal produzido artesanalmente

Fabricações	Acidez (°D)	Densidade	Gordura (%)
1ª	15	1,033	4,00
2ª	15	1,031	3,80
3ª	15	1,032	3,70

TABELA 2 Resultados médios de análises físico-químicas do leite cru destinado à fabricação do queijo minas frescal produzido artesanalmente

Fabricações	ST (%)	SD (%)	Fosfatase	Peroxidase
1ª	13,21	9,31	positiva	positiva
2ª	12,46	8,66	positiva	positiva
3ª	12,70	9,00	positiva	positiva

ST- Sólidos Totais, SD – Sólidos Desgordurados

4.2.2 Queijos artesanais

Os valores médios das análises físico-químicas dos queijos artesanais apresentaram-se dentro dos padrões impostos pela Lei.

Os resultados de umidade, das cinzas, da acidez, da gordura, de proteínas e do pH dos queijos minas frescal com salga e sem salga produzidos artesanalmente estão apresentados nas Tabelas 3, 4, 5, 6, 7 e 8 respectivamente.

TABELA 3 Resultados médios de umidade (%) e o desvio padrão do queijo minas frescal com salga e sem salga, produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Tratamento	Média(%)	Desvio padrão
Sem inoculação com salga	45,03	3,31
Sem inoculação sem salga	43,17	3,58
1 mL com salga	45,70	1,59
1 mL sem salga	42,50	1,65
2 mL com salga	46,43	2,66
2 mL sem salga	42,16	4,46
3 mL com salga	47,03	1,75
3 mL sem salga	42,23	2,64

TABELA 4 Resultados médios das cinzas (%) e desvio padrão do queijo minas frescal, com e sem salga, produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Tratamento	Média (%)	Desvio padrão
Sem inoculação com salga	2,10	0,70
Sem inoculação sem salga	2,57	0,68
1 mL com salga	2,27	1,17
1 mL sem salga	2,33	0,64
2 mL com salga	2,13	1,27
2 mL sem salga	2,66	0,83
3 mL com salga	2,17	1,27
3 mL sem salga	2,00	0,62

TABELA 5 Resultados médios de acidez ($^{\circ}$ D) e desvio padrão do queijo minas frescal, com salga e sem salga, produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10$ UFC/mL.

Tratamento	Média ($^{\circ}$ D)	Desvio padrão
Sem inoculação com salga	1,40	0,15
Sem inoculação sem salga	1,31	0,23
1 mL com salga	1,29	0,09
1 mL sem salga	1,28	0,08
2 mL com salga	1,27	0,10
2 mL sem salga	1,39	0,05
3 mL com salga	1,34	0,14
3 mL sem salga	1,43	0,30

TABELA 6 Resultados médios de gordura (%) e desvio padrão do queijo minas fresco, com salga e sem salga, produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10^8$ UFC/mL

Tratamento	Média (%)	Desvio padrão
Sem inoculação com salga	21,33	1,28
Sem inoculação sem salga	20,33	0,29
1 mL com salga	20,50	0,00
1 mL sem salga	20,83	0,76
2 mL com salga	21,59	1,18
2 mL sem salga	21,42	0,52
3 mL com salga	20,42	0,38
3 mL sem salga	20,75	0,90

TABELA 7 Resultados médios de proteínas (%) do queijo minas fresco, com salga e sem salga produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Tratamento	Média (%)	Desvio padrão
Sem inoculação com salga	19,66	4,27
Sem inoculação sem salga	21,06	2,10
1 mL com salga	20,05	4,26
1 mL sem salga	21,54	4,38
2 mL com salga	21,07	3,82
2 mL sem salga	18,58	2,78
3 mL com salga	20,17	2,70
3 mL sem salga	21,96	5,28

TABELA 8 Resultados médios de pH e desvio padrão do queijo minas frescal, com salga e sem salga, produzido artesanalmente, inoculado com *S. aureus*. Cada mL corresponde a $6,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Tratamento	Média	Desvio padrão
Controle com salga	5,36	0,96
Controle sem salga	5,38	0,94
1 mL com salga	5,65	0,60
1 mL sem salga	5,40	1,13
2 mL com salga	5,60	0,70
2 mL sem salga	5,66	0,53
3 mL com salga	5,51	0,88
3 mL sem salga	5,49	0,93

Não houve influência significativa do *Staphylococcus aureus* nas análises físico-químicas dos queijos minas frescal, com salga e sem salga, produzidos artesanalmente. Contudo, houve um teor maior de umidade dos queijos com salga, devido à maior retenção de água no queijo.

5 CONCLUSÕES

A salga não inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus*, independente da aliquota inoculada. Os queijos com salga apresentaram maior contagem quando comparados com os queijos sem salga, fabricados com leite cru.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O controle microbiológico do leite cru antes da inoculação apresentou uma elevada contaminação, demonstrando condições higiênico-sanitárias insatisfatórias durante a ordenha ou transporte do leite.
- Os queijos com salga, sem salga e o soro apresentaram níveis de coliformes superiores a $2,3 \times 10^{10}$ NMP, confirmando condições insatisfatórias da matéria-prima.
- Nos queijos com salga e sem salga não foi detectada a presença de *Salmonella* sp.
- Não houve diferença significativa no crescimento do *Staphylococcus aureus* entre as alíquotas inoculadas em diferentes concentrações, durante 7 dias de armazenamento.
- A salga não inibiu o crescimento do microrganismo, favorecendo o crescimento do *Staphylococcus aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, L. A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; PENHA, L. H. de C. Características microbiológicas da água utilizada no processo de obtenção do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Brasília*, v. 15, n. 2/3, p. 85-88, 1995.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA. **Standard method for the examination of water and wastewater**. 20. ed. New York: American Public Health Association, 1998.

BAIRD-PARKER, A. C. The Staphylococci: na introduction. *Journal of Applied Bacteriology*, New York, v. 69, p. 15-85, 1990. Supplement.

BELOTI, V. Aspectos microbiológicos do leite pasteurizado tipo C consumido na cidade de Londrina (PR). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia – GO. *Anais... Goiânia*, 1996.

BERGDOLL, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: DOYLE, M. P. (Ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: INC, 1989. p. 463-523.

BORGES, S. F.; OLIVEIRA, J. S. O nosso leite de cada dia. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*, v. 13, n. 155, p. 3-5, 1999.

BRABES, K. C. S. **Detecção de *Staphylococcus aureus* e suas toxinas em leite proveniente de bovinos leiteiros com mastite**. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Instrução Normativa DAS n. 22, 14 de abril de 2003.

BRITO, J. R. F. Sensibilidade e especificidade do “Califórnia Mastitis Test” como recurso diagnóstico das mastites subclínica em relação à contagem de células somáticas. *Pesquisa Veterinária Brasileira, Brasília*, v. 17, n. 2, p. 49-53, abr./jun. 1997.

BRYAN, F. L. **Foodborne diseases and their control**. August, 1980. 86 p.

BURTON, H. Microbiological aspects. *Bulletin International of Dairy Feed*, n. 200, p. 9-14, 1986.

CARMO, L. S.; VIEIRA, A. C.; REIS, J. D. A. P.; NASCIMENTO, R. S.; PEREIRA, M. L.; E. J.; BERGDÖLL, M. S. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 122-125, abr./jun. 2003).

CARVALHO, F. A.; SILVA, P. H. F. Alternativas para aceleração da maturação de queijo. *Leite & Derivados*, São Paulo, v. 11, p. 36-38, 1993.

CERQUEIRA, M. M. O. P. et al. Frequência de *Listeria sp* e de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 8., 1997, Juiz de Fora. *Anais... Juiz de Fora*, 1997. p. 95-97.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

ELEY, A. R. *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Zaragoza: Acribia, 1992. p. 41-48.

FARIA, L. M.; FONSECA, L. M.; CABRAL, M. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; MACHADO, E. C. Avaliação microbiológica de queijo Minas artesanal fresco e maturado produzido na região do Serro-MG. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 19., 2002, Juiz de Fora. *Anais... Juiz de Fora: Exemplo*, 2002. p. 66-70.

FDA/CFSAN- Food and Drug Administration/ Center for Food Safety and Applied Nutrition. *Bacteriological Analytical Manual Online*. 8. ed. Revisada, 2001. s. p.

FERREIRA, C. L. L. F.; MOURA, K. R. P.; LAURENCE, B. et al. Avaliação das condições sanitárias e físico-químicas do leite informal consumido em Sobral, Ceará. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n. 108, maio 2003.

FILHO, E. S. A.; FILHO, A. N. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "frescal". *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 34, n. 6, 2000.

FLOWERS, R. S.; ANDREWS, W.; DONNELLY, C. W.; KOENIG, E. Pathogens in milk products. In: MARSHALL, R. T. **Standard methods for the examination of dairy products**. 16. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 103-25.

FRANCO, B. D. G. M.; FRANCO, M. L. **Microbiologia de los alimentos**. Porto: Artmed, 1996. 424 p.

FRAZIER, W. C.; WERSTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos: contaminación. Conservación y alteración de la leche y productos lácteos**. 4. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1993. 681 p.

FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 35, p. 33-36, 1983.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Aspectos da qualidade do leite de relevância em saúde pública. *Revista Higiene Alimentar, São Paulo*, v. 16, n. 102/103, nov./dez. 2002.

GONÇALVES, P. M. R. Toxifencções alimentares: uma revisão. *Revista Higiene Alimentar, São Paulo*, v. 12, n. 53, p. 38-44, jan./fev. 1998.

GURGEL, M. S. de C. C. do A.; SPOTO, M. H. F.; DOMARCO, R. E.; GUTIERREZ, E. M. R. Aceitação pelo consumidor do queijo Minas frescal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 2000, Fortaleza – CE. *Anais...* Fortaleza, 2000. p. 3. 29.

HAYES, P. R. Productos lacteos. In: _____. **Microbiologia e higiene de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1993. p. 97-102.

HALPIN-DOHNALEK, M. I.; MARTH, E. H. *Staphylococcus aureus* : Production of extracelular compounds and behavior in foods - a review. *Journal of Foods Protection, Des Moines*, v. 52, n. 4, p. 267-282, Apr. 1989.

HEESCHEN, W. H. Bacteriological quality of raw milk: legal requirements and systems-situation in the EU and IDF member countriens. In: SYMPOSIUM ON BACTERIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK, 1996, Wolfpassing. *Proceedings...* International Dairy Federation, 1998. p. 1-27

HENRIQUES, M. R.; PINTO, C. L. O.; VANETTI, M. C. D. Avaliação da qualidade microbiológica do leite pasteurizado comercializado no município de Viçosa (MG). In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 13., 1995, Juiz de Fora-MG. Anais... Juiz de Fora, 1995.

HUHN, S.; HAJDENWURCEL, J. R.; MORAES, J. M. de; VARGAS, O. L. Qualidade microbiológica do leite cru obtido por meio de ordenha manual e mecânica e ao chegar à plataforma. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 209, n. 35, p. 3-8, maio/jun. 1980.

INTERNATIONAL COMMISSION OF MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS - ICMSF. Microrganismos de los alimentos. Ed. Zaragoza: Acribia-Espanha, 2000. 431 p.

LEITE Jr.; A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. de; Sá, S. N. de; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na Região de São José do Rio Preto, SP. Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, n. 96, p. 69-76, maio 2002.

MARTINS, E. Patrimônio de Minas. Revista Economia do Jornal Estado de Minas, n. 44, p. 14-17, dez. 2001.

MINAS GERAIS. Lei número 14. 185 de 31 de janeiro de 2002. Dispõe sobre o processo de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências. Diário do Executivo e do Legislativo e Publicações de terceiros, n. 21 01 de fevereiro de 2002.

MORAES, J. M.; STEHLING, R. N.; MAGALHÃES, F. A. R. Avaliação da qualidade bacteriológica do leite cru transportado em diferentes tipos de vasilhames. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 13, n. 155, p. 6-10, 1999.

NASCIMENTO, F. R. R. et al. Ações da vigilância sanitária perante as condições higiênicas sanitárias do queijo Coalho comercializado no município de Fortaleza. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 56, n 321, p. 257-261, 2001.

NICOLAU, E. S. et al. Qualidade microbiológica dos queijos Minas frescal, prato e mussarela comercializados em Goiás. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora, v. 56, n 321, p. 200-205, 2001.

PEREIRA, M. L. Estafilococos coagulase negativos pauciprodutores de enterotoxinas estafilocócicas e relato de um surto por espécie coagulase positiva. 1996. p. 143. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Campinas, Campinas, SP.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA JUNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 243 p.

PERESI, J. T. M. et al. Avaliação bacteriológica de Queijo Tipo Minas Frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 17, n.111, p. 79-85, ago. 2003.

PRATA, L. F. Fundamento de ciência do leite. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1998. 119 p (Mimiogr.).

REINBOLD, G. W. Indicator organisms in dairy products. *Food Technology*, Chicago, v. 37, n. 6, p. 111-113, 1983.

RICHTER, R. L.; LEDFORD, R. A.; MURPHY, S. C. Milk and milk products. In VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSEN, D. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 3. ed. Washington: American Public Health Association, 1992. p. 837-56.

SAKAI, I. Quality and hygiene systems on the farm in Japan. *Bulletin of the International Dairy Federation*, v. 22, 1991.

SHEBUSKI, J. B.; VILHELMSSON, O.; MILLER, K. J. Effects of growth at low water activity on the thermal tolerance of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 63, n. 9, p. 1277-1281, Sept. 2000.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. N. P.; CARMO, L. S.; SILVA, M. C. C.; DIAS, R. S. Caracterização da microbiota patogênica de queijos tipo "coalho" comercializados em Recife-PE. In: CONGRESSO NACIONAL DE HIGIENISTAS DE ALIMENTOS, 4., 1998, Olinda. *Anais...* Olinda, 1998. p. 39-40.

SOUZA, M. R.; SIQUEIRA, I. M. C.; LEITE, M. O.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; RODRIGUES, R. Avaliação do leite cru submetido ao sistema de pagamento por qualidade, em laticínios de Minas Gerais, Brasil. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 11, n. 51, p. 24-26, set./out. 1997.

STOBBERUP, J. **Elaboracion de quesos: módulo III-B.** Santiago: FAO, 1985.

TETRA PACK. **O consumo do leite informal no Brasil.** Disponível em: <<http://www.casadoleite.com.Br/canais/tenice>>. Acesso em: 15 jun. 2003.

TIMMS, L. L.; SCHULTZ, L. H. Dynamics and significance of coagulase negative *staphylococcal* intramammary infections. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 12, p. 2648-2657, Dec. 1987.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia.** 3. ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

UNGAR, M. L.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Riscos e consequências da manipulação de alimentos para a Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 6, n. 21, p. 14-16, mar. 1992.

VARGAS, O. L.; PORTO, M. A. C.; BRITO, A. L. Características de origens para queijos naturais de Minas Gerais: Municípios do Serro e de São Roque de Minas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 53, n. 301, p. 19-49, 1998.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and products.** London: Chapman & Hall, 1994. 451 p.

VILELA, M. A. P. et al. Incidência de estafilococos produtores de coagulase em queijo Minas frescal comercializado na cidade de Juiz de Fora e região. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 56, n. 321, p. 140-143, 2001.