

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos**  
**Departamento de Tecnologia de Alimentos**

**AVALIAÇÃO DE *Musca domestica* COMO VETOR MECÂNICO DE  
MICROORGANISMOS PATOGÊNICOS EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

**GINA MARIA BUENO QUIRINO CARDOZO**  
Bióloga

**PROF. DR. ARNALDO YOSHITERU KUAYE**  
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em  
Tecnologia de Alimentos

Campinas – SP  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

C179a Cardozo, Gina Maria Bueno Quirino  
Avaliação de *Musca domestica* como vetor mecânico de  
microrganismos patogênicos em queijo Minas Frescal / Gina Maria  
Bueno Quirino Cardozo. -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Arnaldo Yoshiteru Kuaye  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. *Musca domestica*. 2. Vetor mecânico. 3. Microorganismos  
patogênicos. 4. Queijo Minas Frescal. I. Kuaye, Arnaldo Yoshiteru.  
II. Universidade Estadual de Campinas Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Evaluation of *Musca domestica* as mechanical vector of pathogenic  
microorganisms in Minas Frescal cheese

Palavras-chave em inglês (Keywords): *Musca domestica*, Mechanical vector, Pathogenic  
Microorganisms, “Minas frescal”cheese

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Arnaldo Yoshiteru Kuaye

Izildinha Moreno

Walkíria Hanada Viotto

Maria Helena Martini

Data da defesa: 22/02/07

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye**

Orientador

Faculdade de Engenharia de Alimentos

---

**Prof. Dra. Walkíria Hanada Viotto**

(membro)

Faculdade de Engenharia de Alimentos

---

**Dra. Izildinha Moreno**

(membro)

Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL

---

**Dra. Maria Helena Martini**

(membro)

Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz - IAL

Ofereço,

*Ao meu marido, Alcindo José (em memória), pelo amor, incentivo, paciência, compreensão e por participar ativamente deste trabalho, vibrando comigo a cada etapa.*

*Aos meus filhos, Lucas e Letícia, razão de minha vida.*

Dedico,

*Aos meus pais, Gina e Sérgio, pelo amor, por serem o alicerce da minha vida, e por acreditarem em meus objetivos, me incentivando sempre.*

*À toda a minha família, sempre disposta a me amparar, me proporcionando segurança, e apoiando em todos os momentos.*

*“O verdadeiro heroísmo consiste em persistir por mais um momento quando tudo parece perdido”.*

W. E. Grenfel

## **Agradecimentos**

À Deus pela graça da vida e por mais uma vez me acompanhar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Arnaldo Y. Kuaye pela oportunidade, compreensão, dedicação e confiança na realização desta pesquisa.

À Dra. Eliete V. Faria, diretora da Unidade Laboratorial de Referência de Análises Físicas, Sensoriais e Estatística – LAFISE/ITAL pelo apoio e amizade.

À Margarida Kikuta Barbieri, pesquisadora do LAFISE, pela colaboração, orientação, incentivo e amizade.

À diretora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Laticínios - TECNOLAT/ITAL, Dra. Izildinha Moreno, pela amizade e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pesquisadores do ITAL, especialmente Katumi Yotsuyanagi e Dra. Ariene G. F. Van Dender pelo auxílio técnico.

Às pesquisadoras do LAFISE, Aline O. Garcia e Rita de Cássia S. C. Ormenese pelo incentivo, pelas palavras amigas em todos os momentos.

Aos biólogos e amigos do laboratório de microscopia, Dalmo Cesar de Paula e Rosana de Andrade Silva pelo apoio, incentivo e amizade.

Ao estagiário do LAFISE, Gabriel Costa Bueno pela dedicação e colaboração.

À equipe LAFISE como um todo, pelo carinho, amizade e apoio principalmente nos momentos mais difíceis.

Às assistentes de pesquisa e bolsistas do TECNOLAT, especialmente, Fabiana K. H. de Souza, Renata D. Portscher Rizzardo, Juliana Sampaio Alves e Simone Oliveira Rodrigues pela colaboração e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro.

Aos integrantes da Banca Examinadora: Dra. Izildinha Moreno, Dra. Walkíria H. Viotto e Dra. Maria Helena Martini, pelo convite aceito para a participação como avaliadoras deste trabalho, pelo tempo dedicado à avaliação desta pesquisa e por seus valiosos comentários e sugestões.

E a todas as pessoas que contribuíram para a realização desta tese.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ANEXOS</b>	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>SUMMARY</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	3
2.1 MATÉRIAS ESTRANHAS E A LEGISLAÇÃO	3
2.2 PATÓGENOS EM DÍPTEROS	6
2.3 QUEIJO MINAS FRESCAL	10
2.4 PRINCIPAIS CONTAMINANTES EM QUEIJO MINAS FRESCAL	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
3.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS EM “POOL” DE <i>Musca domestica</i> L. CAPTURADAS EM DIFERENTES LOCAIS DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL ARTESANAL	16
3.1.1 Captura e identificação das moscas	16
3.1.2 Ensaio microbiológicos	17
3.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS DE <i>Musca domestica</i> PARA O QUEIJO MINAS FRESCAL ULTRAFILTRADO	17
3.2.1 Captura e identificação das moscas	18
3.2.2 Queijo Minas frescal ultrafiltrado	18
3.2.3 Contato de “pool” de <i>Musca domestica</i> vivas com queijo	18
3.2.4 Adição de caldo de <i>Musca domestica</i> ao queijo	19
3.2.5 Estocagem e análises realizadas	19
3.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICAS DE UM LOCAL DE PRODUÇÃO ARTESANAL DE QUEIJO MINAS FRESCAL	20
3.3.1 Captura e identificação das moscas	20
3.3.2 Coleta de leite e queijo Minas frescal	20

3.3.3 Ensaio microbiológicos	21
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS DE HOMOGENEIZADO DE <i>Musca domestica</i> PARA O QUEIJO MINAS FRESCAL DURANTE A SUA FABRICAÇÃO EM ESCALA PILOTO	21
3.4.1 Preparo do homogeneizado de moscas	21
3.4.2 Processamento do queijo Minas frescal	22
3.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA <i>Musca domestica</i> EM PROMOVER A CONTAMINAÇÃO CRUZADA DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS PROVENIENTES DE HABITAT CONTAMINADO PARA QUEIJO MINAS FRESCAL	25
3.6 TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS EMPREGADAS	28
3.6.1 Contagem total de mesófilos	28
3.6.1.a) Preparação das amostras e diluições seriadas	28
3.6.1.b) Inoculação	28
3.6.1.c) Adição do meio de cultura	28
3.6.1.d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados	29
3.6.2 Detecção de <i>Salmonella</i> spp.	29
3.6.2.1 Pré- Enriquecimento	29
3.6.2.2 Enriquecimento Seletivo	29
3.6.2.3 Plaqueamento Diferencial	29
3.6.2.4 Confirmação Preliminar das Colônias Típicas de <i>Salmonella</i> spp.	30
3.6.2.5 Testes Sorológicos e Bioquímicos para Confirmação Definitiva	30
3.6.2.5.a) Teste sorológico somático polivalente	30
3.6.2.5.b) Teste de urease	31
3.6.2.5.c) Teste de fermentação do dulcitol	31
3.6.2.5.d) Teste do Indol	31
3.6.2.5.e) Teste de Malonato	32
3.6.3. Contagem de <i>Staphylococcus aureus</i>	32
3.6.3.a) Preparação da amostra e diluições seriadas	32
3.6.3.b) Incubação	32

3.6.3.c) Contagem das colônias presuntivas	33
3.6.3.d) Confirmação das colônias típicas	33
3.6.4) Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3.6.4.a) Enriquecimento seletivo	33
3.6.4.b) Plaqueamento seletivo diferencial	33
3.6.4.c) Confirmação de colônias típicas	34
3.6.5) Determinação do número mais provável de coliformes fecais, totais e <i>E. coli</i> por grama	34
<b>3.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</b>	<b>35</b>
3.7.1 Extrato seco total (EST)	35
3.7.2 Cloreto de sódio	35
3.7.3 Gordura	36
3.7.4 Atividade de água (Aw)	36
3.7.5 pH	36
3.7.6 Cinzas	36
3.7.7 Acidez	36
3.7.8 Densidade	36
3.7.9 Lactose	36
3.7.10 Nitrogênio não protéico (NNP)	37
3.7.11 Nitrogênio total (Nt)	37
3.7.12 Proteína total (de leite e de queijo)	37
3.7.13 Nitrogênio solúvel nos queijos em pH 4,6 (NS)	37
3.7.14 Índice de extensão de proteólise (IEP)	37
3.7.15 Índice de profundidade de proteólise (IPP)	37
<b>3.8 ANÁLISES MICROSCÓPICAS</b>	<b>38</b>
3.8.1 Sujidades em leite	38
3.8.2 Sujidades em queijo	38
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
4.1 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE MICRORGANISMOS PATOGENICOS EM “POOL” DE <i>Musca domestica</i> L. CAPTURADAS EM DIFERENTES LOCAIS DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL ARTESANAL	39

4.2 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE <i>Musca domestica</i> PARA O QUEIJO MINAS FRESCAL ULTRAFILTRADO (UF)	41
4.3 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICAS DE UM LOCAL DE PRODUÇÃO ARTESANAL DE QUEIJO MINAS FRESCAL	47
4.3.1 Presença de microrganismos patogênicos em <i>Musca domestica</i> , leite cru e queijo Minas frescal de produção artesanal	47
4.3.2 Características físico-químicas	48
4.3.3 Análises microscópicas	53
4.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRANSMISSÃO DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS DE HOMOGENEIZADO DE <i>Musca domestica</i> PARA O QUEIJO MINAS FRESCAL DURANTE A SUA FABRICAÇÃO EM ESCALA PILOTO	57
4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA <i>Musca domestica</i> EM PROMOVER A CONTAMINAÇÃO CRUZADA DE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS PROVENIENTES DE HABITAT CONTAMINADO PARA QUEIJO MINAS FRESCAL	65
<b>5. CONCLUSÕES</b>	67
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	68
<b>ANEXO 1.</b> Características físico-químicas para o queijo Minas frescal ultrafiltrado “Controle” durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey	80
<b>ANEXO 2.</b> Características físico-químicas de leite cru do local de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, das diferentes épocas	81
<b>ANEXO 3.</b> Características físico-químicas para as amostras de queijo Minas frescal do local de fabricação artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey	82
<b>ANEXO 4.</b> Características físico-químicas para as amostras de leite utilizado para a fabricação de queijos Minas frescal em Escala Piloto, das diferentes épocas	83
<b>ANEXO 5.</b> Características físico-químicas para as amostras de queijo Minas frescal “controle”, fabricadas em Escala Piloto, durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey	84

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	Contato do “pool” de moscas com o queijo Minas frescal ultrafiltrado	19
<b>FIGURA 2.</b>	Fluxograma de fabricação de queijo Minas frescal em escala piloto por técnica de acidificação direta	24
<b>FIGURA 3.</b>	Etapas da fabricação do queijo Minas frescal	25
<b>FIGURA 4.</b>	Sistema fechado desenvolvido para verificar a proliferação de patógenos em queijo Minas frescal, pelo contato com <i>Musca domestica</i> , provenientes de habitat artificialmente contaminado	27
<b>FIGURA 5.</b>	Valores de pH para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	44
<b>FIGURA 6.</b>	Valores de acidez para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	44
<b>FIGURA 7.</b>	Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	45
<b>FIGURA 8.</b>	Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	45
<b>FIGURA 9.</b>	Valores de pH para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	50
<b>FIGURA 10.</b>	Valores de acidez para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	50
<b>FIGURA 11.</b>	Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	51
<b>FIGURA 12.</b>	Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	51
<b>FIGURA 13.</b>	Matérias estranhas detectadas em amostra de leite cru para cada época	54
<b>FIGURA 14.</b>	Matérias estranhas detectadas em amostra de queijo Minas frescal artesanal para cada época	55
<b>FIGURA 15.</b>	Matérias estranhas detectadas em amostras de leite e queijo Minas frescal artesanal	56
<b>FIGURA 16.</b>	Valores de pH para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	59

<b>FIGURA 17.</b>	Valores de acidez para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	60
<b>FIGURA 18.</b>	Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	60
<b>FIGURA 19.</b>	Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época	61
<b>FIGURA 20.</b>	Matérias estranhas detectadas no resíduo retido no dessorador, para cada época (A, B e C).	63
<b>FIGURA 21.</b>	Imagens de resíduo detectado em dessorador, após filtração do leite utilizado na fabricação de queijo Minas frescal	64

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b>	Características microbiológicas do “pool” de 30 espécimes de <i>Musca domestica</i> para cada um dos 12 diferentes locais de fabricação artesanal de queijo Minas frescal	40
<b>TABELA 2.</b>	Avaliação microbiológica de moscas e queijos Minas frescal ultrafiltrado “Controle”, “Queijo + Contato” e “Queijo + Caldo” durante estocagem a 10°C por 14 dias em diferentes épocas	42
<b>TABELA 3.</b>	Avaliação microbiológica de amostras de moscas, leite cru e queijo Minas frescal do local de fabricação artesanal estocadas a 10°C, para o 1º, 7º e 14º dias em diferentes épocas	49
<b>TABELA 4.</b>	Avaliação microscópica de amostras de leite cru e queijo Minas frescal coletadas do local de fabricação de queijo Minas Frescal artesanal, das diferentes épocas	54
<b>TABELA 5.</b>	Avaliação microbiológica de amostras de moscas, leite e queijo Minas frescal “controle” e “teste”, fabricados em Escala Piloto, durante estocagem a 10°C por 14 dias, para cada época	58
<b>TABELA 6.</b>	Avaliação microscópica do resíduo coletado no dessorador utilizado para filtração do leite cru	62
<b>TABELA 7.</b>	Avaliação microbiológica de “pool” de <i>Musca domestica</i> e de queijo Minas frescal, utilizados na avaliação da capacidade da <i>Musca domestica</i> promover a contaminação cruzada, de microrganismos patogênicos provenientes de habitat contaminado para queijo Minas frescal	66

## RESUMO

As moscas são consideradas responsáveis pela transmissão de doenças de origem alimentar ao atuarem como vetores mecânicos de microrganismos patogênicos, como *Shigella* sp, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni* desde o reservatório até os alimentos. Os produtos lácteos, principalmente os produzidos artesanalmente quase sempre em condições inadequadas de higiene, são os mais susceptíveis a estes tipos de vetores, representando sérios riscos à saúde do consumidor. A contagem total de bactérias aeróbias mesofílicas e de coliformes totais e fecais, a presença de microrganismos patogênicos em população de moscas domésticas e o potencial de transmissão dos mesmos para queijos Minas frescal foram estudados neste trabalho. Os resultados confirmaram a presença de *Musca domestica* em todos os ambientes de fabricação de queijo Minas frescal aqui estudados. As análises microbiológicas das amostras de moscas domésticas, matéria-prima (leite) e produto final (queijo Minas frescal), coletadas em local de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, demonstraram uma correlação entre os microrganismos patogênicos presentes no “pool” de moscas, no leite e no queijo. As análises microscópicas das amostras de leite e queijo artesanal apresentaram matérias prejudiciais à saúde humana como mosca inteira, fragmentos de mosca e pêlos de roedor, indicando condições higiênico-sanitárias precárias nas etapas de obtenção do leite e processamento dos queijos. Foi verificado também o potencial de transmissão dos microrganismos patogênicos (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*) das moscas em amostras comerciais de queijo Minas frescal ultrafiltrado. Através do processamento do queijo Minas frescal em planta piloto, pode-se verificar tanto a efetiva eliminação das matérias estranhas pela utilização da etapa de filtração do leite antes da fase de pasteurização, quanto o possível carreamento de microrganismos indesejáveis através do contato com homogeneizado de moscas. A capacidade de transmissão de microrganismos patogênicos de habitat contaminado artificialmente, via *Musca domestica*, para queijo Minas frescal pode ser verificado, comprovando assim o potencial de risco da presença de moscas domésticas em ambientes de fabricação de produtos lácteos/queijo.

## SUMMARY

The flies are considered responsible for the transmission of foodborne diseases origin when acting as mechanical vectors of pathogenic microorganisms, such as *Shigella* sp., *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157: H7, *Campylobacter jejuni* from the reservoir to food. The artisan dairy products are produced almost always in a non totally adequate conditions of hygiene. Therefore, the handmade dairy products are the most suitable to these types of vectors, representing serious risks to the consumer's health. The total counting of mesophilic microorganisms and total and fecal coliforms, the presence of pathogenic microorganisms in relation to the population of houseflies and the potential of transmission of the same for "Minas frescal" cheese were studied in this work. The results confirmed the presence of *Musca domestica* in all environments of manufacturing of "Minas frescal" cheese studied here. The microbiological analyses of the samples of houseflies, raw material (milk) and last item ("Minas frescal" cheese), collected in places of manufacturing of handmade "Minas frescal" cheese, demonstrated the direct correlation between pathogenic microorganisms present in "pool" of flies, in milk and cheese. The microscopical analyses of the milk and handmade cheese, that characterized themselves for presenting harmful material to human health such as the whole fly, fly fragments and rodent hairs, indicating precarious hygienical-sanitary conditions in the stages of the attainment of milk and the processing of cheese. It was verified that there is a real potential of transmission of the pathogenic microorganisms (*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*) from the flies to a commercial sample of "Minas frescal" cheese ultrafiltered. Through the processing of the "Minas frescal" cheese in pilot laboratory, it could be verified the effective elimination of extraneous materials by the use of the stage of filtration of milk before the pasteurization phase, although there is a possible undesirable carrying of microorganisms through the homogenized contact with flies. The capacity of transmission of pathogenic microorganisms of habitat contaminated artificially, through *Musca domestica*, to "Minas frescal" cheese can be verified, thus proving the risk potential of the presence of houseflies in environments of manufacturing of dairy products/cheese.

## 1. INTRODUÇÃO

Os insetos desempenham importante papel tanto na manutenção e ampliação da biodiversidade, quanto do ponto de vista industrial e comercial. Eles são agentes polinizadores fundamentais, como também coadjuvantes no tratamento de enfermidades. Por outro lado, os insetos e/ou seus fragmentos, como também outras matérias indesejáveis, como resíduos de areia, solo, vidro, ferrugem, quando presentes em alimentos são considerados matérias estranhas e indicam condições higiênicas inadequadas de manipulação e/ou processamento, estocagem ou distribuição do produto (Food and Drug Administration, 1998).

Certas espécies de insetos (moscas e baratas) e de roedores são responsáveis pela transmissão de doenças ao homem por atuarem como vetores mecânicos, veiculando microrganismos patogênicos tais como *Shigella* sp, *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, bem como do protozoário *Cryptosporidium parvum*, desde o reservatório até os alimentos. Contudo, os riscos associados a essas pragas são difíceis de serem determinados em decorrência de vários fatores interferentes, como por exemplo, o fato de que somente algumas espécies são capazes de carrear microrganismos patogênicos, a dificuldade de se diferenciar a praga vetor de doença da que não é vetor, e o reconhecimento das condições favoráveis à transmissão dos microrganismos patogênicos ao alimento. Assim, é necessária uma orientação suplementar para identificar e avaliar as condições sob as quais as pragas possam apresentar risco microbiano (Codex Alimentarius, 2001).

Os microrganismos patogênicos são carreados por todo o exoesqueleto assim como no aparelho digestivo de moscas domésticas e são eliminados através das excretas ou de partículas, necessárias para o amolecimento do alimento antes da ingestão, regurgitadas constantemente do conteúdo estomacal (Saide; González, 1997).

O isolamento de microrganismos patogênicos e a relação entre os picos sazonais de abundância e a prevalência de determinadas enfermidades, conferem às moscas a incriminação como vetores mecânicos. Bactérias têm sido identificadas no trato digestivo de várias espécies de moscas, constatando-se inclusive que algumas das espécies interferem no desenvolvimento de doenças de importância médica, devido à sua gravidade (Hamilton *et al.*, 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a *Musca domestica* como vetor mecânico de microrganismos patogênicos deteriorantes (microrganismos mesofílicos e coliformes totais) e patogênicos (*E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.) em queijo Minas Frescal. O estudo foi definido com base na ocorrência de matérias macroscópicas e/ou microscópicas provenientes de vetores mecânicos e dos patógenos mais comumente envolvidos em surtos alimentares veiculados por produtos lácteos.

Este estudo foi composto por várias etapas:

- Avaliação da presença de microrganismos patogênicos em “pool” de *Musca domestica* L., capturadas em diferentes locais;
- Determinação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal ultrafiltrado;
- Avaliação das condições higiênicas de um local de produção artesanal de queijo Minas frescal;
- Avaliação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de homogeneizado de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal durante a sua fabricação em escala piloto;
- Avaliação da capacidade da *Musca domestica* promover a contaminação cruzada, de microrganismos patogênicos provenientes de habitat contaminado para queijo Minas frescal.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Matérias estranhas e a legislação**

Até julho de 2003 a legislação brasileira em vigor, estabelecia diferentes limites permitidos para fragmentos de insetos e outras matérias estranhas presentes em alimentos, não se preocupando com a origem ou a inocuidade dos mesmos.

A Resolução 12/78 sobre Normas Técnicas Especiais para alimentos e bebidas, aprovada em março de 1978 pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) estabelecia no item características microscópicas, para este conjunto de normas, “ausência de sujidades, parasitos e larvas” (CNNPA, 1978).

Em abril de 1986, a Divisão Nacional de Alimentos (DINAL) do Ministério da Saúde, em revisão da norma para farinha de trigo, aprovou a Resolução nº 1/86 estabelecendo o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos em 100g de farinha e seus derivados (DINAL, 1986). Já, em agosto de 1994, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde aprovou a Portaria nº 74/94, alterando para 75 fragmentos de insetos em 50g de farinha de trigo, não sendo tolerada qualquer indicação de infestação viva, e estabelecendo para massas alimentícias, biscoitos, produtos de panificação e confeitaria o limite de 225 fragmentos de insetos em 225g de produto (SVS, 1994).

Em julho de 1998, a Portaria nº 519/98 foi aprovada visando à fixação de parâmetros de identidade e qualidade de chás-plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções, com limites para vários tipos de matérias estranhas estabelecidos no item Características microscópicas (SVS, 1998).

No período de 1978 a 2003, a legislação em vigor no Brasil para alguns produtos alimentícios, estabelecia a “ausência de sujidades, parasitas e larvas”.

Diferentemente de outros países, esta legislação era muito rígida e não compatível com a realidade, tornando o seu cumprimento difícil ou mesmo impossível ao considerar o princípio técnico-científico de nem sempre ser possível na agricultura convencional (campo aberto), no processamento, na manipulação, no armazenamento e distribuição, a obtenção de produtos totalmente livres de “sujidades, parasitos e larvas”, reconhecidas como inevitáveis e não prejudiciais à saúde humana (Barbieri, 1994; Vialta *et al.*, 2002; Barbieri, Yotsuyanagi, 2002).

Nos Estados Unidos, a U.S. Food and Drug Administration (FDA) é responsável por estabelecer os níveis máximos para a presença de matérias estranhas em alimentos, descritos na parte 21 do Código Federal de Regulamentos, na forma de manual “The Food Defect Action Levels – Levels of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans”. Estes níveis referem-se aos defeitos naturais ou inevitáveis que, se presentes nos alimentos, não são prejudiciais à saúde humana e são fixados acima de zero. Isto decorre da FDA reconhecer que economicamente não é possível plantar, colher ou processar alimentos totalmente livres de defeitos naturais e inevitáveis, tais como insetos e fungos, e que o uso de pesticidas não é uma alternativa para prevenir os defeitos em alimentos. A utilização de substâncias químicas com o objetivo de controlar insetos, roedores e outros contaminantes naturais têm pouco ou nenhum impacto nos defeitos naturais e inevitáveis nos alimentos, pois o uso primário de pesticidas no campo é o de proteger a plantação de ser devastada pelas pragas que se alimentam do caule (brocas) e de folhas (minadores). Por outro lado, o uso secundário é “estético”, com o propósito de prevenir que o alimento seja severamente danificado pelas pragas, o que o tornaria impróprio para o consumo (Food and Drug Administration, 1998) devido ao resíduo de pesticidas que são prejudiciais à saúde humana.

O Codex Alimentarius no *Recommended International Code of Practice – General Principles of Food Hygiene (GPFH)* (Codex Alimentarius, 2001) recomenda a prevenção e controle de todos os prováveis riscos e, em muitos casos, elabora recomendação específica completa para avaliação dos tipos

comuns de riscos levando em conta as boas práticas de produção primária, as facilidades de controles da construção e de processo. Entretanto, no caso de matérias indesejáveis, o GPFH não dispõe de orientação sobre como determinar se um tipo de matéria indesejável poderia apresentar um risco direto (ex: fragmentos de vidro) ou indireto (ex: moscas carreando riscos de origem alimentar, ácaros causando alergias). Além disso, o anexo de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) do GPFH recomenda a identificação do risco sem distinguir entre os tipos de matérias indesejáveis que apresentam riscos ou entre as pragas que carregam doenças e as que não apresentam riscos.

Assim, na 34<sup>a</sup> sessão do Codex Committee on Food Hygiene, realizada de 8 a 13 de outubro de 2001 em Bangkok, Tailândia, foi apresentada para discussão uma proposta inicial de guias para a avaliação de matérias indesejáveis em alimentos, preparada pelos Estados Unidos com a assistência da Austrália, Canadá, França e da Federação Internacional de Laticínios, enfatizando a necessidade de guias práticos baseados na ciência para diferenciar entre os tipos de matérias indesejáveis e as condições higiênicas inadequadas relacionadas aos riscos potenciais (Codex Alimentarius, 2001).

Seguindo esta premissa e considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de vigilância sanitária na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população, a ANVISA em julho/2003, aprovou a Resolução RDC 175/2003 que estabelece regulamento técnico para avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. De acordo com a origem da matéria estranha encontrada no produto alimentício, ela pode ser enquadrada como indicativo de condições higiênicas (Boas Práticas de Fabricação) ou de condições sanitárias precárias como matérias prejudiciais à saúde humana. Dentre as matérias que causam risco à saúde humana, incluem-se os vetores mecânicos, que são animais que veiculam o agente infeccioso desde o reservatório até o hospedeiro potencial, agindo como transportadores de tais agentes, carreando microrganismos patogênicos para os alimentos (ANVISA, 2003).

## 2.2 Patógenos em Dípteros

A mosca doméstica, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae), é reconhecida como agente importante na disseminação de várias enfermidades infecciosas para o homem e animais, entre elas a cólera, shigeloses e as salmoneloses (De Jesus *et al.*, 2004), podendo ainda servir como vetor de contaminação cruzada para outros microrganismos patogênicos em alimentos infantis. Pesquisas têm demonstrado que os insetos da ordem Diptera podem transmitir agentes infecciosos para o homem e animais devido à sua grande capacidade de dispersão e ao fato de terem contato muito próximo com o homem e seu ambiente, conferindo tal potencial a estes organismos (Thyssen *et al.*, 2004).

A *Musca domestica* (Díptera: Muscidae), conhecida simplesmente como mosca doméstica, é uma mosca de cor cinza-escura, medindo de 6 a 8mm de comprimento que possui aparelho bucal do tipo lambedor. Por ser um inseto de metamorfose completa, o seu ciclo evolutivo compreende as fases de ovo, larva, pupa e adulto, todas elas ocorrendo no meio ambiente, sempre associadas a locais que contenham matéria orgânica em decomposição (Torres *et al.*, 2002).

A composição da microflora da *Musca domestica*, bem como a carga bacteriana, estão fortemente associadas ao substrato nutritivo e ao local onde naturalmente habita. Se oferecidas condições, tornam-se potentes e constantes transmissores de importantes bactérias patogênicas, facultativas e oportunistas (Bizani, 1996).

Espécies de moscas muscóideas foram coletadas em 3 fazendas leiteiras e 8 granjas em San Bernardino (Califórnia) e testadas para *Salmonella* Enteriditis. Das 2.686 moscas coletadas foram identificadas 5 espécies, dentre as quais 92,3% da população pertencia à espécie *Musca domestica* proveniente exclusivamente das fazendas leiteiras, sendo estes indivíduos sorotipos positivos para *S. Enteriditis* (Mian *et al.*, 2002).

Um total de 15 “pools” de *Musca domestica* e 7 “pools” de *Hidrotaea aenescens* foram coletadas em granja para produção de ovos. *Salmonella* Enteritidis foram isoladas em 2 “pools” de mosca doméstica. Outras espécies de *Salmonella* foram isoladas em 3 “pools” de moscas, incluindo *Salmonella* Infantis das *Musca domestica* e *Hidrotaea aenescens*, e *Salmonella* Heidelberg das moscas domésticas (Olsen, Hammack, 2000).

Vários microrganismos patogênicos como *Shigella* sp (Levine *et al.*, 1999) e *Vibrio cholerae* (Fotedar, 2001), protozoários como *Giardia lamblia* e *Cryptosporidium parvum* (Graczyk *et al.*, 2003), além de alguns helmintos como *Ascaris* sp, *Toxascaris* sp, *Toxocara* sp, *Trichiurus* sp, *Capillaria* sp, oxiurídeos, tricostrongilídeos e *Taenia solium* (Monzón *et al.*, 1991, Martínez *et al.*, 2000 e Oliveira *et al.*, 2002) e vírus entéricos (Tan *et al.*, 1997) já foram isolados de moscas.

No aparelho digestivo de larva de mosca de estábulo (*Stomoxys calcitrans*) foi detectada a presença de *Enterobacter sakazakii*, patógeno emergente, causador de infecções como meningites, septicemia e enterocolites em recém-nascidos, prematuros e imunocomprometidos (Hamilton *et al.*, 2003).

Rahuma *et al.* (2005) detectaram microrganismos patogênicos em *Musca domestica* coletadas em Misurata, cidade da Líbia. Foram capturados 50 indivíduos em cada um dos 3 locais diferentes: Hospital Central, ruas e abatedouro. *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* e *Edwardsiella tarda* foram isoladas das moscas provenientes das ruas e abatedouro. *Shigella sonnei* foi detectada em apenas uma mosca que foi coletada no abatedouro. Nas moscas coletadas no hospital, ruas e abatedouro, 42%, 42% e 32% foram positivas para *E. coli*, 70%, 50% e 62% para *Klebsiella* spp., 2%, 20% e 10% para *Aeromonas* spp., 96%, 36% e 34% para *Pseudomonas* spp., 20%, 12% e 16% para *Staphylococcus* spp., e 24%, 22% e 18% para *Streptococcus* spp., respectivamente.

No nordeste de Kansas foram coletadas, por 4 meses, 3.440 moscas domésticas de 2 locais de fazenda de gado e analisadas individualmente para isolamento e quantificação de *E. coli* O157:H7. O patógeno foi detectado em 2,9% e 1,4% para as moscas domésticas coletadas de coqueiras e de local de estocagem de alimento para o gado, respectivamente. A contagem de *E. coli* O157:H7 foi de  $3,0 \times 10^1$  a  $1,5 \times 10^5$  UFC/mosca entre as amostras positivas (Muhammad, Zurek, 2004).

Moscas domésticas foram expostas por 30 minutos ao contato com uma solução aquosa de leite com açúcar, bife e salada de batata, previamente contaminados com gene fluorescente de *E. coli* ( $8 \log_{10}$  UFC/ml). Foi detectado *E. coli* ( $>1,7 \log_{10}$  UFC/mosca) em 43% (29/67), 53% (23/43) e 62% (32/52) de moscas no sistema leite com açúcar, bife e salada de batata, respectivamente. Para as moscas positivas, a média geométrica carregada ( $\log_{10}$  UFC/mosca) foi de  $2,93 \pm 1,24$  para leite com açúcar,  $3,77 \pm 1,28$  para bife e  $2,25 \pm 0,64$  para salada de batata. A transferência de bactérias pelas moscas contaminadas por *E. coli* presente nos alimentos, para uma superfície estéril de acordo com cada pouso foi determinada. *E. coli* transferida por mosca do sistema leite com açúcar foi  $3,5 \pm 0,7 \log_{10}$  UFC/pouso de mosca,  $3,9 \pm 0,7$  de bife e  $2,61 \pm 1,16$  de salada de batata (De Jesus *et al.*, 2004).

*Campylobacter* spp. e *E. coli* O157:H7 foram encontrados em indivíduos de *Musca domestica*, *Stomoxys calcitrans*, *Hydrotaea aenescens*, *Adia cinerella* e em amostras de fezes de peru em duas granjas no Arkansas (Szalanski *et al.*, 2004).

Sela *et al.* (2005) investigaram o potencial de transmissão de patógenos por mosca de frutas *Ceratitis capitata*. Em solução de sacarose foi adicionado *Escherichia coli* marcada com GFP (green fluorescent protein) para contato das moscas e posterior contato com maçãs. A detecção de *E. coli* foi positiva nas moscas e nas maçãs. Por microscópio de fluorescência foi observada a presença de *E. coli* marcada no labro das moscas.

Moscas domésticas foram coletadas em sistema de tratamento de água de lagoa em fazenda de suínos na Carolina do Norte. Foram utilizados 2 tipos de coletores, contendo diferentes líquidos atrativos e feromônio sexual. Em ambos os coletores, as moscas apresentaram concentração de coliformes fecais, *E. coli*, *Enterococci* e coliformes totais entre  $2,1 \times 10^3$  a  $>1,8 \times 10^9$  UFC/g de mosca, e esporos de *Clostridium perfringens* entre  $4,9 \times 10^1$  a  $1,3 \times 10^6$  UFC/g (Likirdopulos *et al.*, 2005).

Em mosca de fruta no México, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), foram identificadas 18 diferentes espécies de bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonaceae*, *Vibrionaceae*, *Micrococcaceae*, *Deinococcaceae*, *Bacillaceae*, e do gênero *Listeria* (Kuzina *et al.*, 2001). De uma porção de 96 moscas capturadas em 8 diferentes locais em Dacca, capital de Bangladesh, 66% foram positivas para *E. coli* e 20,8% para *Staphylococcus aureus* entre outros microrganismos patogênicos (Khan, Huq, 1978).

No Codex Alimentarius (anexo 2 do CX/FH 01/14 July 2001) são apresentados resultados de pesquisas demonstrando o envolvimento de moscas como vetor potencial de *E. coli* O157:H7 em carnes ou produtos de frutas e de *Salmonella* Enteritidis em ovos. Além disso, há também o estudo epidemiológico realizado para elucidação de uma epidemia de doença transmitida por EHEC-O157 (enterohemorrágica), proliferada por moscas como reservatório e vetor, na cidade de Obihiro e Prefeitura de Saga no Japão. Os padrões de DNA das linhagens de *E. coli* O157:H7 (EHEC-O157) isoladas de ambos pacientes e moscas em Saga, bem como a vero-toxina eram idênticos. A simples exclusão da exposição dos alimentos e utensílios às moscas cessou a epidemia em Saga ainda que as moscas excluídas continuassem positivas para EHEC-O157.

Moscas domésticas suspeitas em causar surto de EHEC O157 no Japão foram investigadas. Segundo Kobayashi *et al.* (1999), a EHEC O157 ingerida pela mosca doméstica se abriga no intestino e continua a ser excretada por no mínimo 3 dias após a sua ingestão. Por microscopia eletrônica de varredura, um grande

número do patógeno foi observado na superfície da mandíbula da mosca doméstica, e proliferado em espaço de minutos para o labro. A persistência da bactéria no intestino e fezes é principalmente o resultado da proliferação e acúmulo de EHEC O157 na mandíbula. Pesquisas mostram um aumento potencial na disseminação de *E. coli* O157:H7 pela excreção de *Musca domestica* em alimentos, particularmente durante as primeiras 24 horas depois da ingestão da bactéria (Sasaki *et al.*, 2000).

### **2.3 Queijo Minas frescal**

A produção de leite cru no Brasil em condições nem sempre adequada é agravada pela sua comercialização informal (clandestina) ou por seus subprodutos, particularmente o queijo minas frescal artesanal (Bulhões, Rossi Junior, 2002).

Em artigo da Folha de São Paulo de 02/03/99, o presidente da empresa Leite Brasil, Sr. Jorge Rubez, destaca que 50% do leite produzido no país não passa por inspeção representando notórios riscos à saúde da população. Esta matéria prima é também utilizada na produção artesanal de queijos em “fabriquetas” sem condições adequadas de higiene. Assim, estes produtos são produzidos e comercializados sem qualquer controle ou fiscalização que possibilite assegurar sua qualidade para o consumo, podendo comprometer a saúde do consumidor com doenças graves.

O queijo Minas produzido e comercializado clandestinamente é muito comum na região Sul e Sudeste do Brasil. É um produto de massa macia e nem sempre submetido à pasteurização. Seu alto teor de água, aliado a quase sempre condições higiênicas deficientes de processamento, manipulação, transporte e estocagem, o tornam bastante susceptível a microrganismos patogênicos e deteriorantes (Bulhões, Rossi Junior, 2002).

No Brasil existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias. Esses queijos são muito populares e devido ao bom rendimento de fabricação, são comercializados a preços acessíveis a uma maior faixa da população (Sena *et al.*, 2000). O queijo Minas frescal artesanal difere do industrializado por ser produzido a partir do leite cru, sem adição de fermento ou ácido láctico e por não sofrer inspeção sanitária de órgãos competentes (Carvalho, 2003).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos (DIPOA, 2004) entende-se por queijo Minas frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com a ação de bactérias lácticas específicas. De acordo com a Portaria 352 de 04 de setembro de 1997, que foi alterada pela Instrução Normativa nº 4 de 01 de março de 2004, o queijo Minas frescal é classificado como queijo semi-gordo: entre 25,0 e 44,9%, de muito alta umidade: com umidade não inferior a 55% (conhecido como massa branda ou “mole”), a ser consumido fresco (DIPOA, 1996, 1997, 2004).

O queijo caseiro Minas frescal por apresentar elevado teor de umidade, ser um produto altamente perecível e passar por uma grande manipulação, apresenta condições propícias para a contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, e muitas dessas bactérias podem ser patogênicas ou produzir metabólitos microbianos e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (Câmara *et al.*, 2002).

Apesar das exigências para que o leite destinado à fabricação de queijos seja higienizado por meios físicos e submetidos à pasteurização, é intensa a comercialização dos queijos que não passam por tais especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenagem,

contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (Pereira *et al.*, 1999).

O queijo minas frescal, além de ser um queijo fresco com alto conteúdo de umidade, utiliza temperaturas de 32-35°C em seu processamento, não é submetido à cura e apresenta baixa porcentagem de sal. Estas características geram condições ainda mais favoráveis para o desenvolvimento de patógenos (Carvalho, 2003).

Semelhante ao processo tradicional, o queijo Minas frescal fabricado por acidificação direta é obtido por coagulação enzimática, porém a acidificação é promovida pelo uso direto de ácido láctico no lugar de fermento láctico (Carvalho, 2003).

A utilização de ácido láctico industrial como substituto do fermento láctico foi estudada por Van Dender e Moreno (1992). Esta alteração na tecnologia de fabricação teve como resultados principais o aumento de umidade, aumento do pH final do queijo, diminuição da acidez e maior perda de sólidos solúveis no soro, se comparados com queijos produzidos convencionalmente. Apesar da maior perda de sólidos no soro, a utilização de ácido láctico aumenta o rendimento dos queijos.

Segundo Van Dender e Moreno (1992), o processamento de acidificação direta promove maior retenção de umidade e redução de acidez do queijo. A coalhada menos ácida retém mais facilmente o soro. A acidificação favorece a drenagem do soro aumentando a permeabilidade do gel como consequência da desmineralização da coalhada. O queijo Minas frescal produzido com uso de acidificação direta apresenta menores alterações na estocagem que os fabricados com uso de fermento láctico. Por outro lado, Naldini (2002) verificou que o produto obtido por acidificação direta foi mais sensível às contaminações microbiológicas, devido ao pH final mais elevado e à ausência de bactérias lácticas na competição com outros microrganismos.

Campos (2000) afirma que o uso de fermento láctico, mesmo em pequenas proporções (0,1% e 0,5%), confere ação protetora contra o crescimento de outros microrganismos.

Em termos gerais, dentro do campo da microbiologia de alimentos, sem dúvida as contaminações microbianas dos alimentos são indesejáveis e inclusive nocivas. Este aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para grupos de microrganismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogênicos que encontram no alimento um meio propício para o desenvolvimento e até mesmo a liberação de substâncias tóxicas (Franco, Almeida, 1992).

#### **2.4 Principais Contaminantes em Queijo Minas frescal**

Dentre alguns microrganismos importantes em alimentos, destaca-se a *Salmonella* spp., causadora de infecção alimentar; a *Escherichia coli*, que possui sorogrupos cuja patogenicidade é conhecida através da ação toxigênica e infecciosa, e o *Staphylococcus aureus*, que é toxigênico e produtor de toxina termoestável pré formada no alimento. Em 2000, segundo pesquisa realizada por Câmara *et al.* (2002), esses microrganismos foram responsáveis por 37,5%, 50% e 37,5%, respectivamente, de 8 surtos confirmados; sendo identificado *Staphylococcus aureus*, 33,3% em queijo Minas frescal artesanal.

De Buyser *et al.* (2001) considerou a *Salmonella* spp., o *Staphylococcus aureus*, a *Listeria monocytogenes* e a *E. coli* como as bactérias mais perigosas para segurança alimentar em queijos, em revisão bibliográfica realizada sobre a implicação do leite e seus derivados em doenças transmitidas por alimentos na França e em países industrializados.

Com o objetivo de avaliar as condições higiênico-sanitárias do queijo Minas frescal produzido artesanalmente em Cuiabá/MT, foi realizada análise microbiológica de 30 amostras obtidas em dois pontos de comercialização. Na determinação de Coliformes fecais, 28 amostras (93,33%) apresentaram valores  $>10^2$  NMP/g e somente 2 amostras (6,67%) estavam dentro dos padrões legais exigidos. Na contagem de *Staphylococcus aureus*, em 29 amostras (96,67%) obteve-se valores superiores a 103 UFC/g, estando apenas 1 amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal (Loguercio, Aleixo, 2001).

30 amostras de queijo Minas frescal de produção artesanal e 30 de produção industrial fiscalizadas pelo Serviço de Inspeção Estadual e Federal foram adquiridas no comércio do município de Jaboticabal, SP. 83,4% das amostras artesanais e 66,7% das industrializadas apresentaram-se em desacordo com o estabelecido pela ANVISA para coliformes fecais. Para *Staphylococcus coagulase* positiva, 20% das amostras artesanais e 10% das industrializadas apresentaram-se em desacordo com o estabelecido pela ANVISA. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. não foram encontrados nestas amostras (Salotti *et al.*, 2006).

A sobrevivência de *L. monocytogenes* durante as fases de fabricação, maturação e estocagem de queijos macios produzidos por coagulação ácida a partir de leite de cabra cru foram analisadas. O patógeno foi inoculado em concentrações de 10 a  $10^2$  UFC/ml. Houve diminuição na contagem de *L. monocytogenes* devido provavelmente ao efeito do baixo pH e à atividade do fermento láctico, mas não seu completo desaparecimento. Na concentração de 10 UFC/ml, a bactéria foi encontrada na superfície do produto até 7 dias após sua fabricação, e em seu interior, até 42 dias. Para a inoculação de  $10^2$  UFC/ml, os resultados foram positivos até 42 dias, tanto na superfície como no seu interior (Morgan *et al.*, 2001).

Das 168 amostras de variedades de queijo Minas (frescal, canastra, padronizado) com e sem registro no SIF (Serviço de Inspeção Federal) coletadas

em Belo Horizonte de 1995 a 1996, 64,9% foram condenadas devido à presença de Coliformes fecais (Pereira *et al.*, 1999).

A ocorrência de Coliformes Fecais e de *Escherichia coli* foi avaliada em amostras de queijo Minas frescal comercializadas na cidade de Poços de Caldas/MG. Foram analisadas 80 amostras, sendo que 30 (37,5%) e 24 (30,0%) amostras apresentaram valores médios de  $3,4 \times 10^5$  UFC/g e  $9,3 \times 10^4$  UFC/g, respectivamente (Almeida Filho, Nader Filho, 2002).

Em outro estudo, das 60 amostras de queijo Minas coletadas em feiras livres, mercado municipal e barracas de camelôs de São Paulo, 73,3% apresentaram Coliformes fecais e 26,7% *Staphylococcus aureus* em níveis acima do permitido pela legislação (Pedro, 2003).

Silva (1998) verificou que em 60 amostras de queijo Minas frescal adquiridas na Cidade do Rio de Janeiro, RJ, 38,4% das amostras apresentaram contagem de *Staphylococcus aureus* superiores a  $10^3$  UFC/g. Mandil *et al.* (1993) constataram que 67% das amostras do mesmo produto provenientes da cidade de Belo Horizonte, apresentaram contagens do mesmo microrganismo variando de  $10^1$  a  $10^6$  UFC/g.

Sabioni e Maia (1998) constataram contagens elevadas de *Staphylococcus aureus* ( $>10^6$  UFC/g) em 70% das amostras analisadas de queijo Minas frescal de fabricação artesanal. Para o mesmo tipo de amostra, coletadas em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP, Hoffmann *et al.* (2002) verificaram que 100% das amostras apresentaram contagem acima de  $10^4$  UFC/g para *S. aureus*, e 80% para *Salmonella*. Essas amostras apresentaram também resultados positivos para *E. coli*.

Vialta *et al.* (2004) avaliaram 108 amostras de leite e 206 de queijos comercializadas informalmente no estado de São Paulo e detectaram a presença de *Staphylococcus aureus* em 37% das amostras de leite e 29% de queijos, e

coliformes fecais em 11% e 22%, respectivamente, acima dos limites toleráveis pela legislação.

Peresi *et al.* (2001) analisaram 30 amostras de queijo Minas frescal artesanal comercializadas em feiras livres e 30 amostras industrializadas coletadas em supermercados de São José do Rio Preto. Os resultados revelaram que 23,3% das amostras industrializadas e 76,6% das artesanais estavam em desacordo com os padrões previstos na legislação. Coliformes fecais foi observado em 43% das amostras artesanais apresentando elevado número ( $>2,4 \times 10^3$ /g). Estafilococos coagulase positiva foi encontrado em 60% das amostras artesanais e em uma amostra industrializada (3,3%). Em 53% das amostras artesanais, verificou-se a presença de *S. aureus* numa faixa de  $1,0 \times 10^4$  a  $3,0 \times 10^6$  UFC/g. *Salmonella* foi detectada em 6,7% das amostras artesanais.

Em feiras livres da Cidade de São Paulo, no período de 1993 e 1994 foram coletadas amostras de queijo prato, mussarela e mineiro, para avaliação microscópica de matérias estranhas. Das 141 amostras analisadas, 75,9% apresentaram pelo menos um tipo de matéria estranha como ácaro, fragmentos de insetos, pêlo de roedor, pêlo de gado, ou resíduo vegetal (Correia, Roncada, 1997).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Avaliação da presença de microrganismos patogênicos em “pool” de *Musca domestica* L., capturadas em diferentes locais de fabricação de queijo Minas frescal artesanal**

##### **3.1.1 Captura e identificação das moscas**

As moscas foram capturadas, com uso de um puçá, em 12 diferentes locais de fabricação artesanal de queijo Minas frescal, sendo um da região rural de

Campinas/SP e 11 da região de Americana/SP. Foram transportadas para o Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas/SP em embalagens plásticas à temperatura ambiente.

De cada local de captura foram separados 30 espécimes de *Musca domestica* L. identificados segundo Gentry *et al.* (1991), dando origem ao “pool” de moscas de cada local.

### **3.1.2 Ensaio microbiológicos**

Cada “pool” de moscas dos diferentes locais foi analisado quanto à presença de bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Constatada a presença dos microrganismos nas moscas, foi selecionado o local “7” (sítio) situado na região rural de Americana/SP, como o mais adequado para as capturas de moscas a serem utilizadas nos ensaios deste trabalho. Este local foi selecionado por apresentar contaminação microbiológica mais expressiva, indicativo de práticas e condições higiênico-sanitárias precárias de fabricação, em comparação aos demais locais de captura de moscas.

### **3.2 Determinação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal ultrafiltrado (UF)**

O potencial de transmissão de microrganismos patogênicos foi avaliado por meio do contato de um “pool” de moscas vivas com uma porção de queijo Minas frescal ultrafiltrado e pela adição de “caldo” de moscas à amostra de queijo Minas frescal UF, conforme descrito no item 3.2.3.

### **3.2.1 Captura e identificação das moscas**

O “pool” de espécimes de *Musca domestica* utilizados para contato com o queijo Minas frescal UF e posterior preparo do caldo de moscas, foram capturados e identificados conforme descrito no item 3.1.1.

### **3.2.2 Queijo Minas frescal ultrafiltrado**

A escolha deste tipo de queijo Minas frescal baseou-se no fato do produto apresentar baixas contagens microbianas em função de seu processo de fabricação. Além disso, o produto apresenta valor de pH relativamente alto que, juntamente com o teor de umidade elevado, fornecem condições ideais para o desenvolvimento de bactérias patogênicas, sendo, portanto, usado para este estudo.

O queijo Minas frescal UF de um mesmo lote de fabricação, foi adquirido e transportado para o Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas/SP, em condição de refrigeração (10°C).

Utilizando-se procedimentos assépticos, em uma câmara de fluxo laminar, 3 peças de queijos Minas frescal UF foram divididas em três porções e cada porção de cada peça de queijo foi misturada para originar três amostras compostas. Uma das amostras compostas foi utilizada como “controle”, enquanto as demais foram destinadas aos procedimentos para avaliar o potencial de transmissão dos microrganismos a partir das moscas para o produto.

### **3.2.3 Contato de “pool” de *Musca domestica* vivas com queijo**

Foi realizado o contato de um “pool” com 30 espécimes de *Musca domestica* vivos, provenientes do local “7” de fabricação de queijos artesanal, com 225g de queijo em pedaços dispostos em saco plástico estéril com volume de 3000cm<sup>3</sup> por aproximadamente 1 hora, originando a amostra “Queijo+Contato”. A **Figura 1** apresenta o contato das moscas com o queijo Minas frescal ultrafiltrado. Após

este período, as moscas foram mortas por esmagamento e colocadas, em condições assépticas, em um saco de Stomacker e, a seguir, homogeneizadas manualmente com 100mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) resultando na amostra “caldo de mosca”.

### 3.2.4 Adição de caldo de *Musca domestica* com queijo

Em uma segunda etapa, a outra amostra de 225g de queijo Minas frescal UF foi homogeneizada com uma mistura de 185mL de citrato de sódio 2% e 40mL do “caldo de moscas”, originando a amostra “Queijo+Caldo”.



**Figura 1.** Contato do “pool” de moscas com o queijo Minas frescal ultrafiltrado.

### 3.2.5 Estocagem e análises realizadas

Foram realizadas análises microbiológicas (bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

e *Escherichia coli*) no primeiro dia e após 7 e 14 dias de estocagem, na amostra de queijo “controle” (sem contaminação) e nas amostras “Queijo+Contato” e “Queijo+Caldo”, sendo mantidas a 10°C. A amostra de “caldo de moscas” foi avaliada somente no primeiro dia.

Para a realização das análises microbiológicas, as amostras foram previamente incubadas a 35°C por 30 minutos para enriquecimento e para o preparo das diluições. 25g de queijo foi homogeneizado por 2 min em 225mL de solução estéril de citrato de sódio 2% (p/v), a 40-45°C, com um Stomacker Lab-Blender 400 (Seward Medical, London, UK).

As análises físico-químicas (pH, acidez, extrato seco total, gordura, cloreto de sódio, proteína total, índice de extensão de proteólise, índice de profundidade de proteólise e atividade de água) foram realizadas no queijo “controle” no primeiro dia e após 7 e 14 dias de estocagem. Este experimento foi repetido em três diferentes épocas (Época A, B e C).

### **3.3 Avaliação das condições higiênicas de um local de produção artesanal de queijo Minas frescal**

#### **3.3.1 Captura e identificação das moscas**

O “pool” de espécimes de *Musca domestica* foram capturados e identificados conforme descrito no item 3.1.1.

#### **3.3.2 Coleta de leite e queijo Minas frescal**

No mesmo local “7”, foram coletadas amostras de leite e de queijo Minas frescal de produção artesanal local para avaliação microbiológica, físico-química e microscópica.

As amostras foram transportadas para o Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, Campinas/SP, sob condição de refrigeração (10°C), para os procedimentos e as determinações analíticas.

### **3.3.3 Ensaio microbiológicos**

Utilizando-se procedimentos assépticos, em uma câmara de fluxo laminar, 3 peças de queijos Minas frescal artesanal foram divididas em três porções, sendo que cada porção de cada peça de queijo foi misturada para originar uma amostra composta para a avaliação microscópica, físico-química e microbiológica. As outras duas amostras compostas foram armazenadas a 10°C por 14 dias para avaliação físico-química e microbiológica.

As avaliações microbiológicas, físico-químicas e microscópicas, foram realizadas no primeiro dia para as amostras de leite e queijo. Após 7 e 14 dias de estocagem, as análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas somente para o queijo. As moscas foram avaliadas somente no primeiro dia, após serem mortas por esmagamento e homogeneizadas com Caldo Triptona de Soja (TSB) que originou o “caldo de mosca”, para as análises microbiológicas. As amostras de moscas, leite e queijo Minas frescal artesanal foram coletadas no mesmo local “7” em três épocas diferentes (Época A, B e C) para as respectivas análises.

## **3.4 Avaliação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de homogeneizado de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal durante a sua fabricação em escala piloto**

### **3.4.1 Preparo do homogeneizado de moscas**

Foi utilizado 420mL de caldo de Triptona de Soja - TSB (Merck-Germany) para homogeneizar 120 espécimes (aproximadamente 1 mosca para 20g de queijo) de *Musca domestica*, que foram identificados segundo Gentry *et al.* (1991), coletadas no local “7” de fabricação artesanal de queijo Minas frescal.

### 3.4.2 Processamento do queijo Minas frescal

O queijo Minas frescal foi fabricado em três épocas distintas em escala piloto no Centro de Pesquisas e Desenvolvimento de Laticínios - TECNOLAT do Instituto de Tecnologia de Alimentos - ITAL, utilizando-se a técnica de acidificação direta.

O leite cru, adquirido da Cooperativa de Laticínios - Jaguariúna, Campinas, SP, foi filtrado em um dessorador de nylon, com abertura de 100µm, para retirada de possíveis matérias estranhas presentes. A pasteurização foi realizada por 30 minutos a 63°C, sendo a seguir resfriado, e mantido a temperatura de 35°C durante o processo de fabricação.

Ao leite foi adicionado o volume de 50 mL de solução de cloreto de cálcio a 50% (25g de CaCl<sub>2</sub> em 100 litros de leite), ácido láctico diluído 1:10 em volume suficiente para o leite atingir valor de pH entre 6,0 e 6,1 e coalho líquido na proporção indicada pelo fornecedor (7-9mL/10L, ChrHansen) diluído em água destilada (1:9). Após a formação da coalhada, a massa foi cortada e após repouso por 5 minutos, foi iniciada agitação intermitente a cada 5 minutos durante 40 minutos, e em seguida, agitação contínua por 20 minutos. A seguir, foi adicionada salmoura (1kg NaCl/100L de leite) à mistura massa/soro.

Nesta etapa do processo, uma porção de aproximadamente 1,5Kg da massa de queijo foi retirada do tanque para adição do homogeneizado de moscas. Esta massa foi enformada originando o “queijo teste” (QT), como também a porção restante, sem adição do homogeneizado de moscas, dando origem ao “queijo controle” (QC).

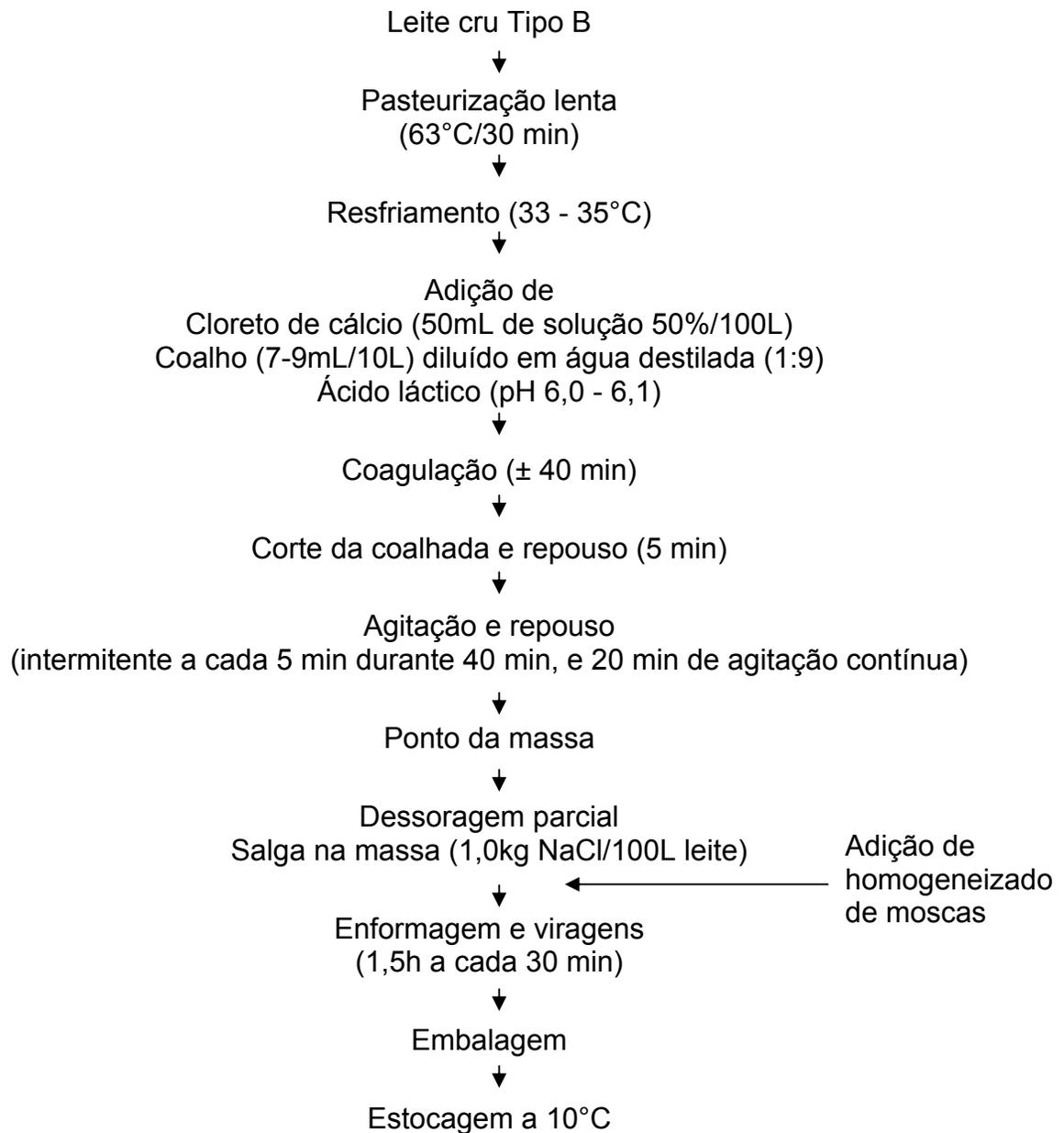
Após a enformagem e viragem das amostras dos queijos “teste” e “controle”, os mesmos foram pesados, embalados em “saquinhos” de polietileno e estocados a 10°C.

As análises microbiológicas (bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) foram efetuadas no primeiro dia e após 7 e 14 dias de estocagem na amostra QT e QC, sendo o homogeneizado de moscas, analisado apenas no primeiro dia. As análises físico-químicas foram realizadas nas amostras QC durante todo o período de estocagem (1º, 7º e 14º dia). A avaliação microscópica foi realizada

apenas no primeiro dia para as amostras QC. O leite foi analisado apenas no primeiro dia para todas as avaliações.

O fluxograma da fabricação do queijo Minas frescal está apresentado na **Figura 2**. As imagens das etapas da fabricação do queijo Minas frescal podem ser observadas na **Figura 3**.

Este ensaio foi repetido em três épocas distintas (Época A, B e C).



**Figura 2.** Fluxograma de fabricação de queijo Minas frescal em escala piloto por técnica de acidificação direta.



**Figura 3.** Etapas da fabricação do queijo Minas frescal: filtração do leite em dessorador (A), coleta de amostras para análises (B), controle de temperatura do leite para pasteurização (C), controle de temperatura da água para coagulação (D), diluição do coalho (E), adição e homogeneização de  $\text{CaCl}_2$ , ácido láctico e coalho (F), agitação da massa após corte (G), salga (H), enformagem (I), mistura da massa com caldo de moscas (J), enformagem dos “queijo teste” (K) e viragem dos queijos (L).

### **3.5 Avaliação da capacidade da *Musca domestica* em promover a contaminação cruzada de microrganismos patogênicos provenientes de habitat contaminado para queijo Minas frescal**

Um teste complementar foi realizado para verificar a capacidade da *Musca domestica* em promover a contaminação cruzada em queijo Minas frescal a partir de habitat contaminado artificialmente por microrganismos patogênicos. Os ensaios deste teste consistiram na avaliação microbiológica de amostras de queijo Minas frescal (produzido em escala piloto) colocado em ambiente fechado com um “pool” de 30 espécimes de *Musca domestica* identificados segundo Gentry *et al.* (1991), coletadas do local “7” de fabricação de queijo artesanal, contaminadas artificialmente pelos microrganismos patogênicos estudados neste trabalho.

Foi desenvolvido um sistema fechado composto de dois compartimentos, simulando um ambiente onde as moscas podiam voar e pousar livremente de um compartimento, onde foi inserida a placa com Agar (Tipo 900-Brasil) contendo 1,0mL de cada patógeno (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Salmonella* spp. ATCC 14028), para o outro compartimento onde foi disposto 225g de queijo Minas frescal em pedaços. As imagens do sistema fechado podem ser observadas na **Figura 4**. Este sistema contava com uma abertura para a entrada das moscas e com uma tampa para não permitir a saída das mesmas.

Em seguida, o “pool” de 30 moscas foi inserido nesse sistema, acoplando à abertura da entrada o saco plástico contendo as mesmas. Do outro lado, uma luminária foi colocada para que atraídas pela luminosidade (fototropismo positivo), as moscas adentrassem facilmente ao sistema onde permaneceram por um período de 5 horas. Neste período as moscas voavam e pousavam no cultivo de microrganismos e no queijo aleatoriamente. Este período de contato foi estabelecido de forma a reproduzir as condições ambientais ao qual o queijo é estocado, no processo artesanal, até seu destino final (pontos de venda). A seguir, as moscas e as amostras de queijo foram submetidas às análises microbiológicas.

Este experimento foi repetido em três épocas distintas (Época A, B e C).



**Figura 4.** Sistema fechado desenvolvido para verificar a proliferação de patógenos em queijo Minas frescal, pelo contato com *Musca domestica*, provenientes de habitat artificialmente contaminado.

### 3.6 Técnicas Microbiológicas Empregadas

A determinação de microrganismos mesofílicos, coliformes totais, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella* spp, foi realizada segundo os métodos da *American Public Health Association* - APHA (Vanderzant, Splittstoesser, 1992).

#### 3.6.1 Contagem total de mesófilos

O método de contagem de microrganismos em placas é um método geral, que pode ser utilizado tanto para contagem de grandes grupos microbianos, como os aeróbios mesófilos.

**3.6.1.a) Preparação das amostras e diluições seriadas.** A unidade analítica utilizada foi de 25g, retirada assepticamente da amostra e transferida para um saco stomacher, onde posteriormente foi homogeneizada e realizada a diluição inicial de 1:10 ( $10^{-1}$ ), adicionando-se 225ml de Caldo Trypticase de Soja – TSB (Merck – Germany) à amostra.

Para preparação da segunda diluição ( $10^{-2}$ ), foi transferido assepticamente, 1,0ml da diluição  $10^{-1}$  para 9,0 ml de água peptonada (Oxoid–England) a 1%. As diluições subseqüentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 1,0ml da diluição anterior para 9,0 ml.

**3.6.1.b) Inoculação.** Foram selecionadas cinco diluições adequadas da amostra ( $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ) e inoculado 1,0ml de cada diluição em placas de Petri separadas, estéreis e vazias.

**3.6.1.c) Adição do meio de cultura.** Nas placas inoculadas foi colocado, 15 a 20ml de Agar Padrão para Contagem – PCA (Merck - Germany), previamente fundido e resfriado. O inóculo foi misturado ao meio de cultura movimentando suavemente as placas, em movimentos na forma de oito ou em movimentos circulares, oito a dez vezes no sentido horário e oito a dez vezes no sentido anti-

horário. Após a completa solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48 horas.

**3.6.1.d) Contagem das colônias e cálculo dos resultados.** Foram selecionadas as placas com 25 a 250 colônias que foram contadas com auxílio de um Contador de colônias Phoenix – 1C 589. Foi calculado o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por grama ou ml da amostra multiplicando o número de colônias pelo inverso da diluição inoculada ( $\text{UFC/g ou ml} = \text{N}^\circ \text{ Colônias/ diluição}$ ).

### **3.6.2 Detecção de *Salmonella* spp.**

**3.6.2.1 Pré- Enriquecimento** (em caldo não seletivo). Foi transferida uma porção de 25 gramas ou 25 ml da amostra para um frasco de homogeneização, previamente esterilizado e adicionado 225ml de caldo pré-enriquecimento - Caldo Lactosado (Merck - Germany). A amostra foi homogeneizada e incubada a 35°C por 24hs.

**3.6.2.2 Enriquecimento Seletivo.** Após delicada homogeneização, foi transferido 1,0ml do caldo de pré-enriquecimento para tubo com 10ml de Caldo Tetrionato – TT (Difco - USA) e incubado a 35°C por 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado com caldo Selenito Cistina – SC (Difco - USA).

**3.6.2.3 Plaqueamento Diferencial.** Os tubos de enriquecimento seletivo foram agitados em agitador de tubos tipo “vortex” - TECNAL e estriada uma alçada do caldo TT em placas de Ágar Entérico de Hectoen – HE ( Merck- Germany) e Agar Xilose Lisina Desoxiolato-XLD (Merck–Germany). O mesmo procedimento foi utilizado com o Caldo SC (Difco – USA). As placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 24 horas e posterior verificação quanto ao desenvolvimento de colônias típicas de *Salmonella* sp.

Agar HE: Colônias transparentes, verde-azuladas, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H<sub>2</sub>S podem produzir colônias inteiramente pretas.

Agar XLD: Colônias transparentes, coloração rosa escuro, com ou sem centro preto. Cepas fortemente produtoras de H<sub>2</sub>S podem produzir colônias com centro preto grande e brilhante, ou mesmo inteiramente pretas.

**3.6.2.4 Confirmação Preliminar das Colônias Típicas de *Salmonella* spp.** Com auxílio de uma agulha de inoculação, foi removida uma porção da massa de células do centro da colônia típica e inoculada em tubos inclinados de Agar Lisina Ferro – LIA (Difco – USA) e Agar Tríplice Açúcar Ferro-TSI (Difco – USA). A inoculação foi feita por picadas e estrias na rampa, utilizando-se a mesma alçada para inocular ambos os tubos. Foi realizada a confirmação preliminar pelo menos em duas colônias típicas de cada placa, nos tubos de LIA e TSI. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas e posterior observação quanto à ocorrência de reação típica de *Salmonella*:

Reação típica de *Salmonella* em TSI: rampa alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do ágar). Reação atípica em TSI que não deve ser descartada se as demais reações em LIA se apresentarem típicas.

Reação típica de *Salmonella* em LIA: fundo e rampa alcalinos (púrpura, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H<sub>2</sub>S (escurecimento do meio). Reação atípica de LIA que não deve ser descartada se as demais reações em TSI se apresentarem típicas.

### **3.6.2.5 Testes Sorológicos e Bioquímicos para Confirmação Definitiva**

#### **3.6.2.5.a) Teste sorológico somático polivalente**

Foram marcados dois quadrados em uma lâmina de vidro. A partir da cultura de 24 horas de TSI, foi transferida uma alçada para cada um dos quadrados demarcados e adicionada uma gota de solução salina fisiológica estéril para cada um dos quadrados procedendo à homogeneização. Sobre apenas um dos quadrados foi adicionado uma gota de anti-soro somático polivalente anti-*Salmonella* (Difco-USA) e novamente homogeneizada. Segurando a lâmina contra um fundo preto bem iluminado, com delicados movimentos de inclinação e rotação

da lâmina, pode-se observar a ocorrência de aglutinação no quadrado com anti-soro no caso de teste positivo. O quadrado onde não foi adicionado o anti-soro é utilizado para comparação, evitando confundir a aparência turva (controle negativo) com a reação de aglutinação.

#### **3.6.2.5.b) Teste de urease**

Foi transferida uma alçada com inóculo pesado da cultura em TSI, para um tubo com Caldo Uréia de Christensen (Difco-USA) e incubado a 35°/24h. Paralelamente foi incubado um tubo não inoculado, para controle. A viragem alcalina do indicador foi observada com alteração do meio de cor pêssego para cor rosa escuro (teste positivo), ou permanência do meio de cor original (teste negativo). A maioria das cepas de *Salmonella* são urease negativa.

#### **3.6.2.5.c) Teste de fermentação do dulcitol**

Foi transferida uma alçada com inóculo pesado da cultura de TSI, para um tubo com Caldo de Vermelho de Fenol (Difco – USA) suplementado com 0,5% de Dulcitol. Os tubos foram incubados a 35°C/48h, com a tampa ligeiramente afrouxada. A viragem ácida do indicador foi observada com a alteração da cor do meio passando de avermelhada para amarela (teste positivo). A maioria das cepas de *Salmonella* fermentam o dulcitol.

#### **3.6.2.5.d) Teste do Indol**

Foi transferida uma alçada com inóculo leve da cultura em TSI, para tubos com Caldo Triptona 1% (Difco – USA) e incubados a 35°C/24h. Foi adicionado 0,2 a 0,3ml do Reagente de Kovacs (Laborclin – Brasil – SP) para cada 4,0 a 5,0ml de cultura em Caldo Triptona e procedimento de agitação leve. A formação de anel vermelho-violeta na superfície do meio de cultura implica em teste positivo, ou se o anel permanecer amarelado (cor do reagente de Kovacs) o teste é negativo. O desenvolvimento de coloração em tons entre vermelho e rosa indica teste indeterminado. As cepas de *Salmonella* são indol negativas.

#### **3.6.2.5.e) Teste de Malonato**

Da cultura em Caldo Triptona, foi transferida uma alçada com inoculo leve para o Caldo Malonato Modificado (Difco – USA), que foi incubado a 35°C/48h, juntamente com um tubo não inoculado como controle. A viragem alcalina do indicador, altera a cor do meio de verde para azul (teste positivo) ou permanência da cor verde do meio inalterada (teste negativo). A maioria das cepas de *Salmonella* são malonato negativas.

Considerar como *Salmonella* todas as colônias que apresentarem as seguintes características: reações típicas em LIA e TSI, teste sorológico somático polivalente (+), teste de urease (-), teste de fermentação de dulcitol (+), teste de indol (-) e teste de malonato (-).

#### **3.6.3. Contagem de *Staphylococcus aureus***

**3.6.3.a) Preparação da amostra e diluições seriadas.** A unidade analítica utilizada foi de 25g, retirada assepticamente da amostra e transferida para um saco stomacker, onde foi posteriormente homogeneizada e realizada a diluição inicial de 1:10 ( $10^{-1}$ ), adicionando-se 225ml de Caldo Tripticase de Soja – TSB (Merck - Germany) à amostra.

Para preparação da segunda diluição ( $10^{-2}$ ), foi transferido assepticamente 1,0ml da diluição  $10^{-1}$  para 9,0ml de água peptonada a 1% (Oxoid - England). As diluições subseqüentes foram obtidas de maneira similar, transferindo-se 1,0ml ou 10ml da diluição anterior para 9,0 ou 90,0ml de diluente respectivamente.

**3.6.3.b) Incubação.** Foi inoculado 0,1ml de cada diluição adequada da amostra ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ ) na superfície seca de Agar Baird-Parker – BP (Merck - Germany), previamente preparadas em placas de Petri. O inóculo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalski, a partir da diluição maior para as de menor diluição, até que todo o excesso de líquido fosse absorvido. Após a secagem dos meios inoculados, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 48horas.

**3.6.3.c) Contagem das colônias presuntivas.** Foram selecionadas placas com 20 a 200 colônias e contadas as colônias típicas características de *S. aureus* apresentando-se como colônias circulares, pretas, pequenas (máximo 1,5mm em diâmetro), lisas, convexas, com bordas perfeitas, massa de células esbranquiçadas nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou um halo transparente se estendendo para além da zona opaca.

**3.6.3.d) Confirmação das colônias típicas.** Foram selecionadas no mínimo cinco colônias típicas, e havendo menos do que cinco, todas foram tomadas. No caso da placa apresentar colônias suspeitas de mais de um tipo, típicas e atípicas, foram selecionadas pelo menos cinco de cada tipo, ou um número proporcional à distribuição dos diferentes tipos na placa. Cada colônia foi transferida para um tubo de caldo de Infusão Cérebro Coração- BHI (Merck - Germany), procedeu-se à homogeneização da massa de células com o caldo, uma alçada foi transferida para um tubo com Agar Trypticase de Soja - TSA (Oxoid - England) inclinado e ambos os tubos (BHI e TSA) foram incubados a 35°C/24horas, e realizadas as provas bioquímicas (teste de coagulase, catalase e termonuclease).

#### **3.6.4) Detecção de *Listeria monocytogenes***

**3.6.4.a) Enriquecimento seletivo.** Foi homogeneizado 25g da amostra com 225ml de Caldo de Enriquecimento para *Listeria* - LEB (Difco - USA) em stomacher e incubado a 30°C/24horas.

**3.6.4.b) Plaqueamento seletivo diferencial.** Foi homogeneizado cuidadosamente o stomacher do enriquecimento seletivo e estriada uma alçada em placa de Agar Oxford-OXA (Oxoid – England) e uma alçada em uma placa de Agar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam – LPM (Oxoid – England). As placas de Agar Oxford foram incubadas a 35°C/24-48horas e as placas de LPM a 30°C/24-48horas. O Caldo LEB foi reincubado por 24 horas adicionais e o plaqueamento repetido com 48 horas de incubação. Após a incubação de OXA e LPM por 24 horas, foi

observada a presença de colônias típicas e, em caso negativo, as placas foram reincubadas e observadas novamente com 48 horas.

São consideradas colônias típicas de *Listeria*:

Oxa - Colônias esféricas, pretas, rodeadas por um halo preto de hidrólise da esculina.

LPM - As colônias de *Listeria* no ágar LPM devem ser observadas sob luz oblíqua (transluminação), através de uma fonte de luz branca, posicionadas em ângulo de 45° em relação à fonte de luz. Nessas condições as colônias de *Listeria* tendem a apresentar uma coloração azulada com aparência de vidro moído.

**3.6.4.c) Confirmação de colônias típicas.** Foram selecionadas pelo menos 5 colônias típicas de cada placa, para confirmação. Cada colônia foi estriada em placas de Ágar Trypticase de Soja (Merck - Germany) suplementado com 0,6% de extrato de Levedura (Merck - Germany) – TSA-YE, para purificação, e as placas incubadas a 30°C/24-48hs. Foram selecionadas as colônias típicas, bem isoladas, para realização das provas de confirmação. Com uma alça de inoculação, a colônia foi transferida para um tubo TSA-YE inclinado e para um tubo de Caldo Trypticase de Soja 0,6% de extrato de levedura - TSB-YE, incubando-os a 30°C/24h. Foi utilizada a cultura em caldo e agar para a realização das provas bioquímicas (teste de catalase, motilidade, nitrato, Agar Tríplice Açúcar Ferro, verificação de hemólise e fermentação da dextrose, xilose, rhamnose, monitol, maltose e esculina).

### **3.6.5) Determinação do número mais provável de coliformes fecais, totais e *E. coli* por grama (NMP/g)**

Foram selecionadas 3 diluições adequadas da amostra e transferidos 1ml para tubos contendo caldo Lauril Sulfato Triptose – LST (Difco - USA) que continham tubos de Dühran invertidos. Após a incubação a 35°C durante 48 horas dos tubos positivos que apresentaram produção de gás, foi transferido 0,1ml para três tubos, um contendo caldo lactosado verde brilhante bile – VB (Merck - Germany), incubado a 35°C durante 48 horas, para verificar a presença de

coliformes totais, outro contendo Caldo EC (Merck - Germany), incubado a banho-maria (Fanen) a 44,5°C durante 24 horas para detectar coliformes fecais. Os tubos que turvaram e apresentaram produção de gás, foram considerados positivos e a leitura realizada através da tabela de Hoskin. Em outro tubo contendo LST-MUG (Difco - USA) também foi transferido 0,1 ml a partir do crescimento em caldo LST para de verificação de *E.coli*. Os tubos foram incubados em banho-maria (Fanen) a 44,5°C por 24 horas e em seguida feita a leitura com a luz UV-Transluminador (Merck - Germany).

### **3.7 Análises físico-químicas**

As determinações físicas e químicas foram realizadas de acordo com metodologias oficiais. O leite foi avaliado quanto a acidez, gordura, extrato seco total (EST), densidade, pH, proteína total, lactose e cinzas. No queijo Minas Frescal foram realizadas as análises de extrato seco total (EST), cloreto de sódio, gordura, proteína total, índice de extensão de proteólise (IEP), índice de profundidade de proteólise (IPP), pH, atividade de água e acidez.

O acompanhamento da estocagem dos queijos foi feito por meio de análises periódicas (após 1, 7 e 14 dias de estocagem).

#### **3.7.1 Extrato seco total (EST)**

O teor de extrato seco total das amostras de leite e de queijo foi determinado pelo método de secagem das amostras mais areia tratada até peso constante, em estufa à temperatura entre 102-104°C (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1982).

#### **3.7.2 Cloreto de sódio**

O teor de sal das amostras de queijo foi determinado adicionando-se uma quantidade conhecida e em excesso de nitrato de prata para reagir com o NaCl presente na amostra. Em seguida, o excesso de nitrato de prata adicionado foi quantificado por titulação com tiocianato de amônia, e a quantidade de NaCl determinada por diferença (SERRES *et al.*, 1973).

### **3.7.3 Gordura**

Para determinação do teor de gordura presente nas amostras de leite foi utilizado o método de Gerber, e para o queijo foi utilizado o método de Gerber-Van Gulik (ANVISA, 2005).

### **3.7.4 Atividade de água (Aw)**

A atividade de água dos queijos foi determinada a partir do ponto crioscópico do extrato aquoso dos queijos, por meio de crioscopia eletrônica, de acordo com metodologia desenvolvida por VAN DENDER *et al.* (1995).

### **3.7.5 pH**

Foi determinado por meio de um potenciômetro digital (MICRONAL B-375)

### **3.7.6 Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado em mufla regulada para temperatura em torno de  $550 \pm 5^\circ\text{C}$  (HORWITZ, 2005).

### **3.7.7 Acidez**

A determinação da acidez titulável presente no leite foi realizada por meio do método de Dornic (NaOH 0,11N), sendo expressa em graus Dornic ( $^\circ\text{D}$ ). A acidez do queijo foi determinada por titulação com NaOH 0,1N, sendo o resultado expresso em porcentagem de ácido láctico (ANVISA, 2005).

### **3.7.8 Densidade**

Determinação da densidade no leite por meio de termolactodensímetro (ANVISA, 2005).

### **3.7.9 Lactose**

O teor de lactose foi determinado de acordo com o método fenol sulfúrico espectrofotométrico adaptado de ACTON (1977).

### **3.7.10 Nitrogênio não protéico (NNP)**

O teor de nitrogênio não-protéico das amostras foi determinado pela dosagem do nitrogênio no sobrenadante obtido após precipitação da totalidade das proteínas em presença do ácido tricloroacético a 12%, segundo o método de ASCHAFFENBURG; DREWRY (1959).

### **3.7.11 Nitrogênio total (Nt)**

O teor de nitrogênio total das amostras foi determinado pelo método oficial Kjeldahl (INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION, 1962; 1964).

### **3.7.12 Proteína total (de leite e de queijo)**

O teor de proteína total foi calculado multiplicando-se o valor de nitrogênio total pelo fator 6,38. (LANARA, 2003).

### **3.7.13 Nitrogênio solúvel nos queijos em pH 4,6 (NS)**

O teor de nitrogênio solúvel das amostras foi determinado pela dosagem do nitrogênio no sobrenadante obtido após precipitação isoelétrica das caseínas utilizando HCl 1,41N (VAKALERIS; PRICE, 1959).

### **3.7.14 Índice de extensão de proteólise (IEP)**

O índice de extensão de proteólise é calculado por:

$$\text{IEP (\%)} = \frac{\% \text{ nitrogênio solúvel a pH 4,6}}{\% \text{ nitrogênio total}} \times 100$$

### **3.7.15 Índice de profundidade de proteólise (IPP)**

O índice de profundidade de proteólise é calculado por:

$$\text{IPP (\%)} = \frac{\% \text{ nitrogênio não proteico}}{\% \text{ nitrogênio total}} \times 100$$

Os resultados das análises físico-químicas receberam tratamento estatístico utilizando o Teste de Tukey, para comparação das médias ao nível de significância de 5%.

### **3.8 Análises microscópicas**

As análises microscópicas foram realizadas, em duplicata, segundo metodologias recomendadas pela A.O.A.C. (Ziobro, 2005). As matérias estranhas detectadas foram identificadas quanto à sua origem segundo Gentry *et al.* (1991) e Gohram (1985).

#### **3.8.1 Sujidades em leite**

As amostras de leite foram analisadas segundo metodologia 960.49 item A da A.O.A.C, conforme descrito a seguir:

Uma alíquota de 225g de leite foi pesada em béquer e diluída com igual volume de solução aquecida de oxalato de sódio ( $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ ) a 3% ou de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 2%. Esta mistura foi filtrada em papel de filtro riscado em funil de Büchner, com uso de bomba de vácuo, e examinado ao microscópio estereoscópico em aumento de 30 vezes para identificação das sujidades.

#### **3.8.2 Sujidades em queijo**

As amostras de queijo foram analisadas segundo metodologia 994.05 da A.O.A.C., conforme descrito a seguir:

Os queijos foram cortados em cubos e alíquotas de 225g foram pesadas em béqueres de 2 litros. Foi adicionado 1litro de água filtrada aquecida (70°C) e 60 mL de HCl. Em seguida foi adicionado 15mL de Igepal CO-630 e foi levado à ebulição em chapa de aquecimento com agitação magnética por 30 minutos. Em porções, o material foi transferido para peneira nº 230 e lavado com jato de água

filtrada aquecida (70°C), até que a espuma fosse mínima ou ausente. A peneira foi colocada em um refratário com solução de lauril sulfato de sódio a 1% suficiente para cobrir o resíduo da mesma, e mantida a 65-75°C com uso de chapa de aquecimento. Gentilmente a peneira foi agitada para a dispersão do resíduo e mantida em repouso por 10 minutos. Em seguida, as paredes da peneira e o resíduo foram lavados com água filtrada aquecida e o resíduo transferido para béquer de 400mL com auxílio de pisseta contendo água filtrada. O conteúdo do béquer foi filtrado em papel de filtro riscado em funil de Hirsh com uso de bomba de vácuo, e examinado ao microscópio estereoscópico em aumento de 30 vezes para a identificação das sujidades.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da presença de microrganismos patogênicos em “pool” de *Musca domestica* L. capturadas em diferentes locais de fabricação de queijo Minas frescal artesanal

Os microrganismos presentes em “pool” de 30 moscas domésticas capturadas de cada um dos 12 diferentes locais de fabricação artesanal de queijo Minas frescal estão apresentados na **Tabela 1**. Verifica-se que as moscas de todos os locais analisados (“1” a “12”) apresentaram número elevado de bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais e fecais e *E. coli*, bem como a presença de *Salmonella* spp. *S. aureus* foi detectado somente nos locais “7” e “11”, distinguida das demais espécies por meio dos testes de coagulase (coagulação do plasma sanguíneo) e termonuclease (estabilidade térmica da nuclease). Além destes, outros 7 locais apresentaram contagens presuntivas de *Staphylococcus* spp., entre  $3,5 \times 10^3$  e  $3,0 \times 10^4$  UFCml<sup>-1</sup>, em Agar Baird-Parker (BP).

Assim, foi possível verificar que os microrganismos patogênicos, *E. coli* e *Salmonella* spp., são comuns em todos os ambientes de fabricação artesanal de queijo Minas frescal, que foram estudados neste trabalho, e que a presença de *S. aureus* foi restrita à apenas dois deles.

Em um estudo realizado para identificar as bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas contidas nas peças bucais e membros locomotores da *Musca domestica* L de zonas urbanas e rurais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, Bizani (1996) verificou que o grupo composto pelas enterobactérias participou com 44,37% e *Staphylococcus* spp. com 22,23% do total da população.

**Tabela 1.** Características microbiológicas do “pool” de 30 espécimes de *Musca domestica* para cada um dos 12 diferentes locais de fabricação artesanal de queijo Minas frescal

Local de Coleta	Características Microbiológicas					
	Bactérias Aeróbias Mesofílicas (UFCmL <sup>-1</sup> )	Coliformes totais (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFCmL <sup>-1</sup> )
1	4,7x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
2	11,0x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
3	7,4x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
4	3,9x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
5	4,5x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
6	4,8x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
7	3,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	5,9x10 <sup>3</sup>
8	3,1x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
9	4,8x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
10	9,1x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
11	4,5x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	1,2x10 <sup>3</sup>
12	5,5x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10

UFCmL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro; NMPmL<sup>-1</sup>: Número mais provável por mililitro; P: Presença; A: Ausência

*Listeria monocytogenes* não foi detectada em nenhum “pool” de moscas avaliadas neste estudo. Normalmente, as bactérias do gênero *Listeria* são ubiqüitárias, podendo ser encontradas em vegetação, solo e água e já foram isolados de animais de sangue quente, além de artrópodes, peixes, insetos, larvas, anfíbios e moluscos (Pearson, 1970). Contudo, a espécie *L. monocytogenes*, associada com patogenicidade, não foi detectada em animais inferiores como formigas, mosca varejeira, besouros, lesmas, entre outros, capturados em áreas irrigadas com águas de esgoto contaminadas com  $10^3$ - $10^4$  células de listeria por litro (Muller, 1988).

Segundo Bizani (1996), a carga microbiana e a composição da microbiota da *Musca domestica* estão associadas a dois fatores: o substrato nutritivo e o local onde naturalmente habita, e se forem oferecidas condições, tornam-se potentes e constantes transmissores de importantes bactérias patogênicas, facultativas e oportunistas.

#### **4.2 Determinação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal ultrafiltrado (UF)**

A avaliação do potencial de transmissão de microrganismos presentes em *Musca domestica* L. para o queijo Minas frescal foi feita a partir de moscas capturadas no local “7” de fabricação artesanal.

Os resultados apresentados na **Tabela 2** indicam a presença de bactérias aeróbias mesofílicas, de coliformes totais, de *E. coli* e de *Salmonella* spp. em população de *Musca domestica* capturada no local “7” de fabricação artesanal de queijo Minas frescal. Essa mesma microbiota foi encontrada nas amostras de queijos (Queijo+Contato e Queijo+Caldo), mas não na amostra de queijo controle. Neste caso não foi observada a presença do *S. aureus*, embora o mesmo microrganismo tenha sido detectado no “pool” de moscas no estudo da presença, na etapa inicial. *L. monocytogenes* não foi detectada nesta população de *Musca domestica* e nem nas amostras de queijos. A contaminação inicial (1º dia) de

**Tabela 2.** Avaliação microbiológica de moscas e queijos Minas frescal ultrafiltrado “Controle”, “Queijo + Contato” e “Queijo + Caldo” durante estocagem a 10°C por 14 dias em diferentes épocas.

Época	Amostra	Dias estocagem	Bactérias aeróbias mesofílicas (UFCmL <sup>-1</sup> )	Coliformes Totais (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Escherichia coli</i> (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFCmL <sup>-1</sup> )	
A	Moscas	-	2,2x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		1	<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
		7	<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
		14	<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
	“Queijo + Contato”	1	3,5x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	9,3x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	1,9x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
	“Queijo + Caldo”	1	1,2x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	7,4x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	4,4x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
	B	Moscas	-	1,6x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
			1	<10	<3,0	<3,0	A	A	<10
7			<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
14			<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
“Queijo + Contato”		1	7,5x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	>3,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	2,2x10 <sup>9</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
“Queijo + Caldo”		1	9,6x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	>3,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	5,7x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
C		Moscas	-	>3,0x10 <sup>9</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
			1	<10	<3,0	<3,0	A	A	<10
	7		<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
	14		<10	<3,0	<3,0	A	A	<10	
	“Queijo + Contato”	1	4,5x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	2,0x10 <sup>9</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	1,8x10 <sup>9</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
	“Queijo + Caldo”	1	4,8x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		7	4,1x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	
		14	7,6x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10	

UFCmL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro; NMPmL<sup>-1</sup>: Número mais provável por mililitro; P: Presença; A: Ausên

bactérias aeróbias mesofílicas aumentou na primeira semana e manteve-se praticamente constante até o final (14º dia) da estocagem a 10°C.

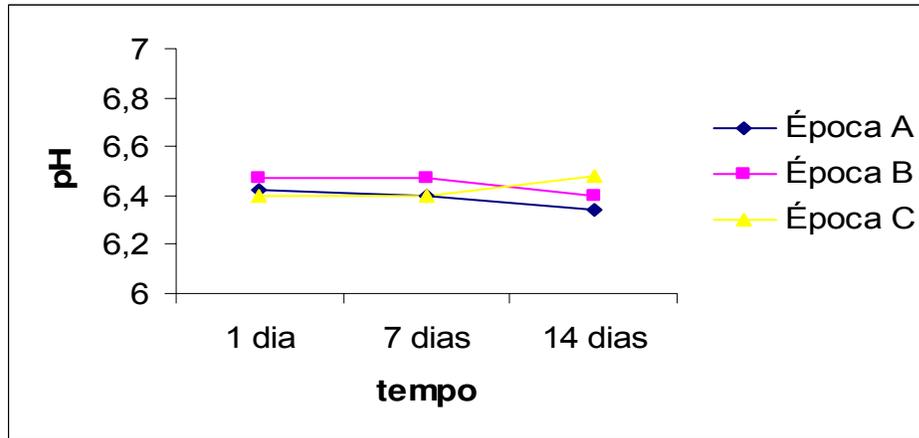
No contexto deste estudo, as informações sobre a composição físico-química do queijo Minas frescal UF utilizado, são importantes para avaliar se este produto apresenta as condições ideais para o desenvolvimento de microrganismos, que são influenciadas, principalmente pelo pH, teor de umidade e NaCl. Já, os índices de proteólise fornecem informações sobre alterações importantes que este produto pode sofrer e que levam à limitação de seu período de conservação, sendo também utilizados para avaliação de sua qualidade.

O **Anexo 1** mostra a comparação dos parâmetros das análises físico-químicas dos queijos Minas frescal UF - Controle (sem contaminação) entre as épocas (A, B e C) e ao longo do período (1º, 7º e 14º dia) de estocagem a 10°C. Verifica-se que o EST (1º dia), NaCl (1º, 7º e 14º dia), gordura (7º dia), proteína total (1º, 7º e 14º dia), IPP (14º dia) e pH (1º, 7º e 14º dia) diferiram significativamente entre os queijos em função das épocas avaliadas e que os parâmetros NaCl (A e B), IEP (C) e pH (A, B e C) diferiram significativamente ao longo do período da estocagem.

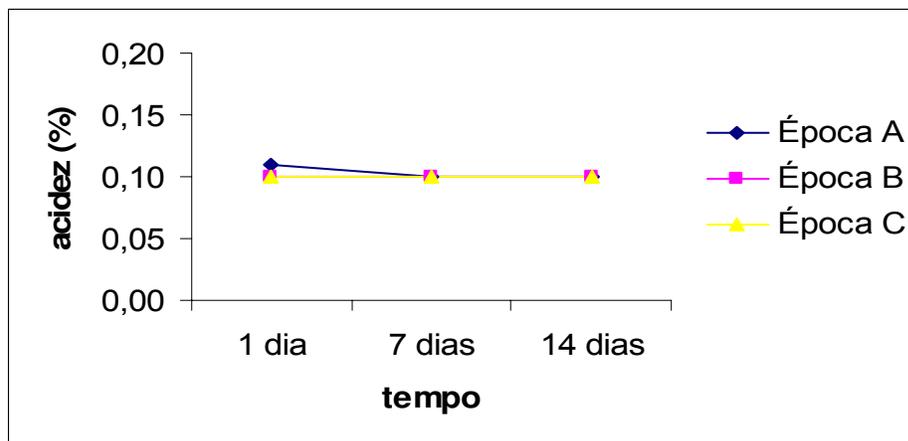
Nas **Figuras 5, 6, 7 e 8** pode-se observar a variação do pH, acidez, IEP (porcentagem de nitrogênio solúvel a pH 4,6 pela porcentagem de nitrogênio total) e IPP (porcentagem de nitrogênio não proteico pela porcentagem de nitrogênio total) do queijo Minas frescal UF durante os 14 dias de estocagem, para as 3 épocas, respectivamente.

Carvalho (2003) observou valores de pH 6,47, atividade de água 0,986 e acidez 0,16% para amostras comerciais de queijo Minas frescal ultrafiltrado, próximos aos encontrados neste estudo.

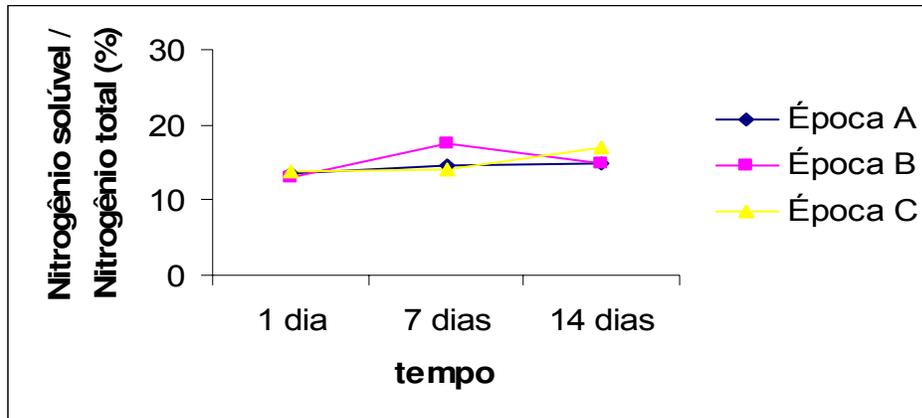
Utilizou-se, neste estudo, amostra comercial de queijo Minas frescal ultrafiltrado (UF) obtido a partir de leite acidificado diretamente. Este produto apresenta um maior poder tamponante em relação ao leite devido à concentração de proteínas e sais insolúveis, e de maior teor de umidade, devido à retenção de proteínas do soro (lactoalbuminas e globulinas) na massa do queijo, enquanto no processo tradicional, estas são perdidas no soro (Van Dender, 1995). Além disso, a supressão do fermento láctico aumenta as possibilidades de desenvolvimento de eventuais microrganismos



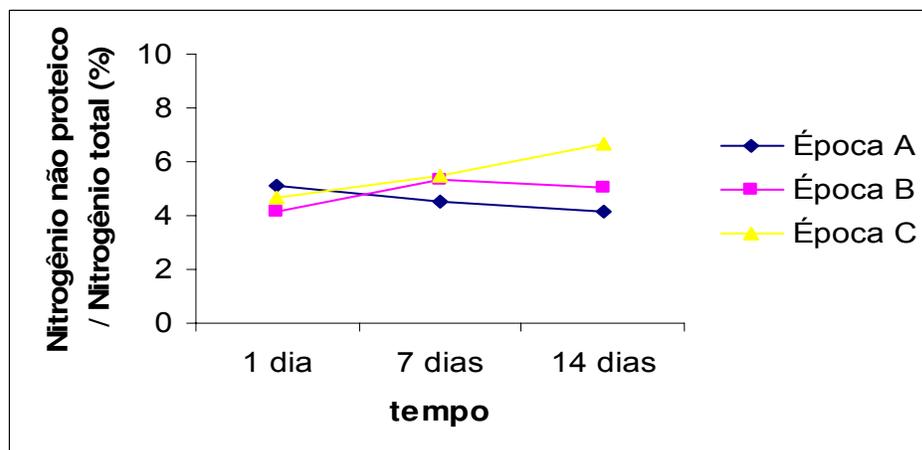
**Figura 5.** Valores de pH para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 6.** Valores de acidez para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 7.** Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 8.** Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal UF durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.

contaminantes, uma vez que o queijo perdeu a importante função antagônica desempenhada pelas bactérias lácticas (Furtado *et al.*, 1980a).

O queijo Minas frescal, segundo legislação vigente, classifica-se como semi-gordo (contém entre 25 e 44,9% de gordura) e de muita alta umidade (umidade não inferior a 55%) (DIPOA, 1996, 2004) e de acordo com a literatura especializada, os valores de pH do queijo obtido por ultrafiltração situam-se na faixa de 5,1 a 6,45 (Vieira, 1983, 1984; Van Dender, 1995). Avaliando a variação dos valores de gordura no extrato seco e de umidade encontrados nos queijos de cada época no 1º dia de análise, A=43,83%, B=53,26% e C=44,61%, e > 55%, respectivamente, verifica-se que o queijo B não está de acordo com a legislação. Este queijo é classificado como gordo (45,0 a 59,9% de gordura no extrato seco). Os queijos Minas frescal UF apresentam uma variação dos valores de pH de 6,34 a 6,48, estando portanto, de acordo com a literatura.

Assim, esta etapa do estudo revela que as bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes fecais, *E. coli* e *Salmonella* spp. presentes nos espécimes de *Musca domestica* são carregados pela mesma para o produto, independentemente da forma de contaminação, por contato das moscas vivas ou pela adição de caldo de moscas ao queijo. As variações significativas principalmente com relação aos teores de sal e de umidade verificadas entre os queijos nas diferentes épocas avaliadas e mesmo ao longo da estocagem a 10°C, não são suficientes para a inibição do desenvolvimento da microbiota indesejável presente.

Com relação aos índices de proteólise verifica-se no **Anexo 1** que os valores de IEP obtidos para os queijos das três épocas não apresentam diferença significativa entre elas. Ao longo da estocagem observa-se diferença significativa para a época C no 14º dia. Quanto ao IPP verifica-se diferença significativa entre as épocas no 14º dia de estocagem não havendo diferença ao longo da estocagem. Estes resultados são coerentes, uma vez que o queijo Minas frescal obtido por ultrafiltração do leite apresenta menor taxa de proteólise comparando com aquele obtido por tecnologia tradicional (Van Dender, 1995). Este fato deve-se à influência exercida pelas proteínas do soro que integram estes queijos e que são resistentes à ação das proteinases do coalho e das bactérias lácticas (Boer, Nooy, 1980 citado por Van Dender 1995).

No queijo UF, o IEP mensura a formação do nitrogênio solúvel em pH 4,6 (peptídeos de alto e médio peso molecular), formado principalmente pela ação do coagulante residual sobre a  $\alpha_{s1}$ -caseína e seus fragmentos e, em menor proporção, à

ação da plasmina sobre a  $\beta$ -caseína. Por sua vez, o IPP mensura a formação do nitrogênio não protéico (aminoácidos e peptídeos de baixo peso molecular) formado pela ação de peptidases bacterianas, principalmente as bactérias lácticas, sobre os peptídeos de alto e médio peso molecular, formados pela ação do coagulante residual (Van Dender, 1995).

### **4.3 Avaliação das condições higiênicas de um local de produção artesanal de queijo Minas frescal**

#### **4.3.1 Presença de microrganismos patogênicos em *Musca domestica*, leite cru e queijo Minas frescal de produção artesanal**

“Pool” de moscas, leite cru e queijo Minas frescal de fabricação artesanal foram coletados no mesmo dia e avaliados quanto às características microbiológicas, microscópicas, físico-químicas e à presença de microrganismos patogênicos, visando verificar se as moscas domésticas desse ambiente de fabricação artesanal são capazes de veicular e transmitir os microrganismos para o produto final.

Os resultados apresentados na **Tabela 3** mostram contagens elevadas de bactérias aeróbias mesofílicas e de coliformes totais em todas as amostras de moscas, leite e queijos avaliadas. *E. coli* foi detectada nas amostras de moscas, leite e queijos de todas as épocas avaliadas (A, B e C).

O leite cru tem sido confirmado como uma das fontes mais prováveis transmitidas por alimentos em surtos de *E. coli* investigados na última década, sendo a carga microbiana inicial diretamente relacionada à higiene da ordenha e utensílios utilizados para sua coleta e transporte (Campos *et al.*, 2006).

*Salmonella* spp. foi detectada nas amostras de moscas e queijos com 1 dia de fabricação nas 3 épocas (A, B e C), não tendo sido detectada nas amostras de leite cru. Este microrganismo foi capaz de sobreviver durante a estocagem (7 e 14 dias) somente nas amostras de queijo da época A. Provavelmente este patógeno não sobreviveu após 7 e 14 dias de estocagem nos queijos das épocas B e C, devido a algum fator inibidor (competição entre os microrganismos pelo substrato, produção de substâncias inibidoras) presente nos mesmos (**Tabela 3**).

*S. aureus* foi detectado nas amostras de moscas das épocas B e C, na amostra de leite da época B e nas amostras de queijos com 1 dia das épocas B e C. Durante todo o período de estocagem, *S. aureus* foi detectado nos queijos das três épocas com 7 e 14 dias. *L. monocytogenes* não foi detectada em nenhuma das amostras de todas as épocas estudadas (**Tabela 3**).

Esses resultados, principalmente os da época A para *Salmonella* sp. e os da época B para *S. aureus*, sugerem que a mosca doméstica tenha atuado como um vetor de transmissão desses microrganismos patogênicos para as amostras de queijo.

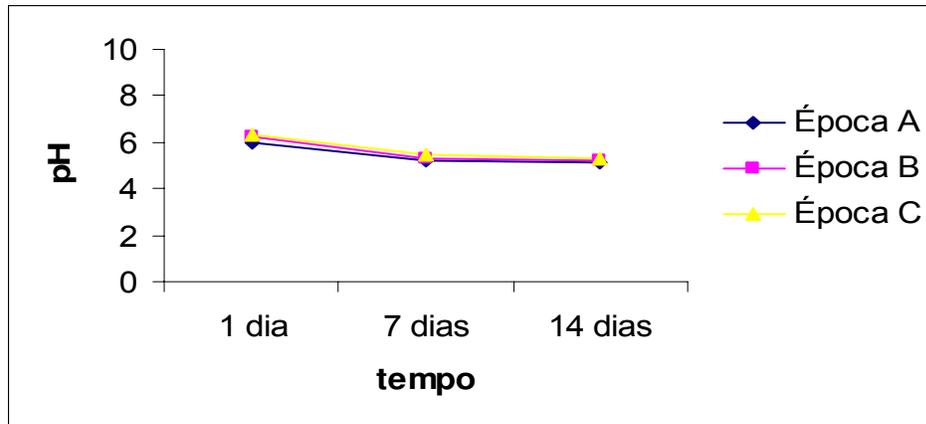
#### 4.3.2 Características físico-químicas

Para o leite cru verificam-se diferenças significativas entre as amostras somente para os parâmetros acidez (época C menos ácido), EST (> na época A) e proteína total (< na época C) (**Anexo 2**). Essas diferenças refletiram na composição físico-química do queijo Minas frescal artesanal obtido, conforme se observa no **Anexo 3**. De acordo com esses dados houve diferença significativa para os parâmetros proteína total (> na época B), pH (mais ácidos nas épocas A e B) e  $A_w$  (< na época A) para os queijos com 1 dia de fabricação. Ao longo do período de estocagem dos queijos observam-se diferenças significativas para os parâmetros EST (época A), IEP (épocas A e B), IPP (épocas B e C), pH (épocas A, B e C) e  $A_w$  (épocas A e B). Nas **Figuras 9, 10, 11 e 12** pode-se observar a variação do pH, acidez, IEP (porcentagem de nitrogênio solúvel a pH 4,6 pela porcentagem de nitrogênio total) e IPP (porcentagem de nitrogênio não proteico pela porcentagem de nitrogênio total) para o queijo Minas frescal artesanal para as 3 épocas durante a estocagem refrigerada por 14 dias, respectivamente.

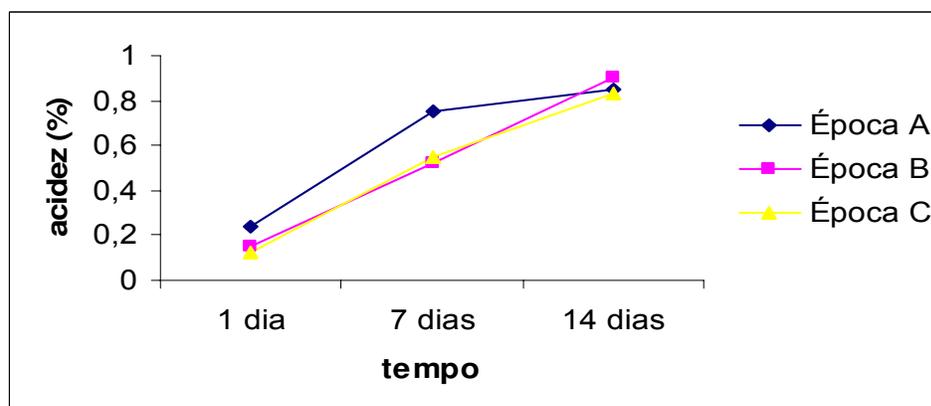
**Tabela 3.** Avaliação microbiológica de amostras de moscas, leite cru e queijo Minas frescal do local de fabricação artesanal estocadas a 10°C, para o 1º, 7º e 14º dias em diferentes épocas.

Época	Amostra	Dias estocagem	Bactérias aeróbias mesofílicas (UFCmL <sup>-1</sup> )	Coliformes Totais (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Escherichia coli</i> (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFCmL <sup>-1</sup> )
A	Moscas	-	2,2x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
	"Leite cru"	-	3,0x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
		1	2,2x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
		7	2,7x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	2,7x10 <sup>4</sup>
		14	7,3x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	4,4x10 <sup>5</sup>
B	Moscas	-	4,5x10 <sup>4</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	1,2x10 <sup>3</sup>
	"Leite cru"	-	6,0x10 <sup>4</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	6,0x10 <sup>2</sup>
		1	1,1x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	3,8x10 <sup>2</sup>
		7	4,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	2,4x10 <sup>5</sup>
		14	7,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	1,4x10 <sup>5</sup>
C	Moscas	-	3,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	1,2x10 <sup>3</sup>
	"Leite cru"	-	6,4x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
		1	7,0x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	2,0x10 <sup>3</sup>
		7	2,9x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	3,9x10 <sup>4</sup>
		14	3,4x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	8,8x10 <sup>4</sup>

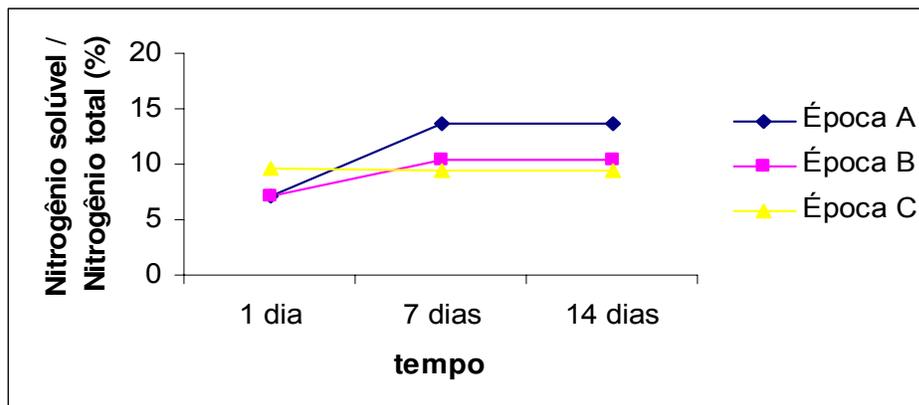
UFCmL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro; NMPmL<sup>-1</sup>: Número mais provável por mililitro; P: Presença; A: Ausência



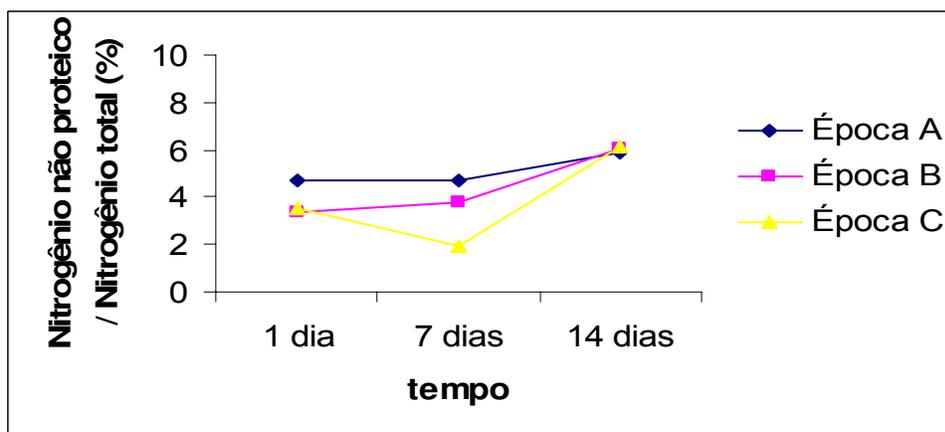
**Figura 9.** Valores de pH para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 10.** Valores de acidez para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 11.** Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 12.** Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.

De acordo com os resultados das análises físico-químicas apresentados no **Anexo 3**, verifica-se que, de modo geral, não houve diferenças significativas entre os queijos A, B e C para os valores de EST e NaCl. Com relação aos valores de pH, o queijo da época A para o 1º dia, apresentou valor significativamente menor que os das demais épocas (B e C). No entanto, não houve diferença significativa, para os queijos das três épocas com 7 e 14 dias de estocagem. O valor de acidez no queijo A aumentou no 7º dia mantendo-se praticamente constante até o 14º dia de estocagem. No caso dos queijos B e C, houve um aumento significativo para este parâmetro ao longo do período de estocagem.

A diminuição dos valores de pH obtidos durante a estocagem para os queijos artesanais deste estudo deve-se provavelmente à presença das bactérias lácticas próprias do leite, uma vez que estes queijos foram produzidos com leite cru e sem a adição de fermento láctico ou ácido láctico. Portanto, pode-se deduzir que outro efeito inibidor possa ter contribuído para a inibição de *Salmonella* spp. nos queijos das épocas B e C.

*L. monocytogenes* não foi detectada em nenhuma das amostras das 3 épocas. Segundo Kozak *et al.* (1996), a alimentação dos animais com silagem contaminada, prática pouco utilizada no Brasil, consiste na principal razão da contaminação de leite cru por *L. monocytogenes*. Outros fatores, tais como o sistema lactoperoxidase e a microbiota natural (principalmente lactobacilos termófilos e leveduras) presente em leite cru ou em queijo fabricado com leite cru podem interferir no desenvolvimento deste microrganismo (Gay, Amgar, 2005).

Como citado por outros autores, os queijos artesanais apresentam composição centesimal irregular, o que também foi observado neste trabalho. De acordo com os resultados apresentados no **Anexo 3**, o valor de gordura no extrato seco total (época A=40,43%, B=41,74% e C=46,86%) obtido para o queijo da época C no 1º dia de análise (caracterização do queijo) está fora dos limites estabelecidos pela legislação. Sendo assim, este queijo é classificado como gordo, ou seja, aquele que contém entre 45,0 e 59,9% de gordura no extrato seco (DIPOA 1996, 2004).

Com relação aos índices de proteólise (**Anexo 3**), verifica-se que, diferentemente do que ocorreu para o queijo Minas frescal UF, o IEP do queijo Minas frescal artesanal aumentou em 92,7% para o queijo A e 45,7% para o queijo B após 7 dias, e manteve-se praticamente constante para o queijo da época C ao longo do período de

estocagem. Como esses queijos foram fabricados sem o uso de fermento láctico, supõe-se que o IEP mais elevado para o queijo da época A com 14 dias e, em menor proporção para os queijos das épocas B e C, seja conseqüência da concentração, da atividade e do tipo da microbiota contaminante presente nos queijos das diferentes épocas.

O IPP aumentou em 79,88% e 74,86% para os queijos das épocas B e C, respectivamente, mostrando que estes queijos continham maior concentração de peptidases bacterianas, provavelmente de bactérias lácticas.

### 4.3.3 Análises microscópicas

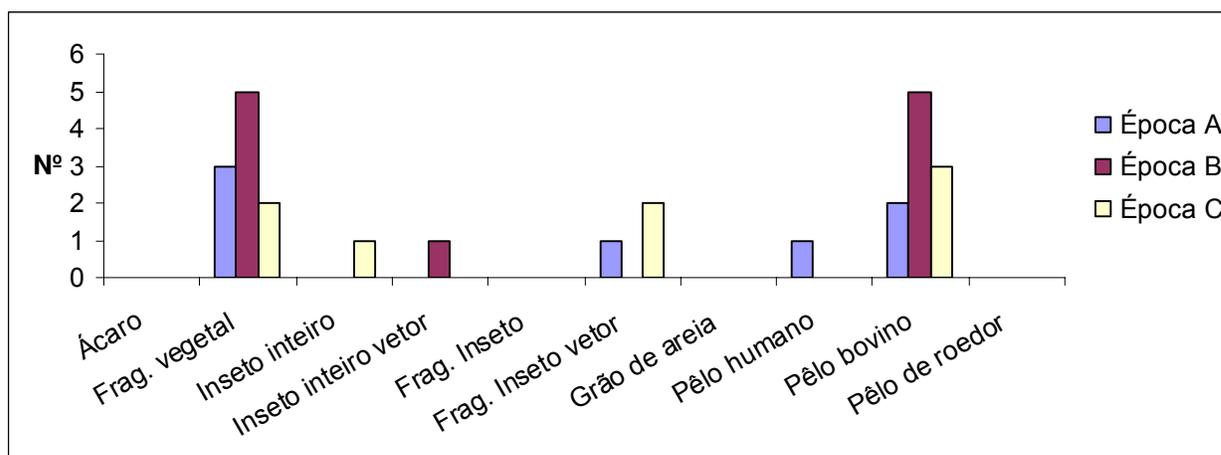
Na **Tabela 4** observam-se os resultados obtidos da análise microscópica para as amostras de leite e de queijo Minas frescal de produção artesanal.

Pode-se verificar que o leite e o queijo das três épocas apresentaram pelo menos um tipo de matéria estranha prejudicial à saúde humana (mosca inteira, fragmento de mosca e pêlo de roedor). A presença destas matérias estranhas indica risco à saúde quanto ao consumo destes produtos, devido aos diversos patógenos que estes vetores podem carrear para o alimento. Além destas, outras matérias não prejudiciais (ácaro, fragmento vegetal, inseto inteiro, fragmento de inseto, grão de areia, pêlo humano e pêlo bovino), mas indicativas de nível higiênico foram detectadas. A variação das matérias estranhas detectadas na amostra de leite e queijo Minas frescal artesanal para cada época, estão apresentadas nas **Figuras 13 e 14** respectivamente. Na **Figura 15** são apresentadas as imagens das matérias estranhas encontradas nas amostras de leite e queijo artesanais.

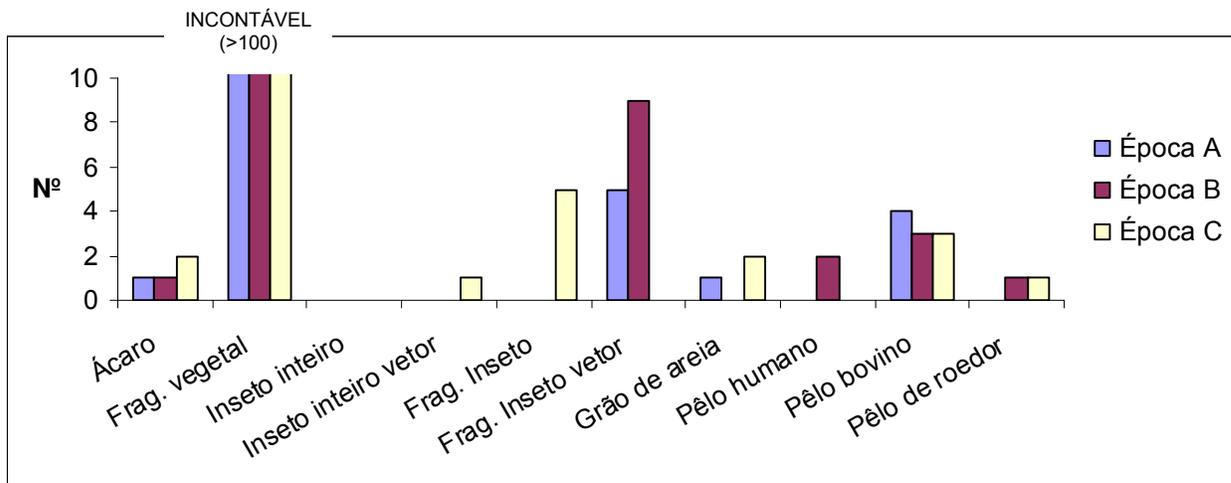
**Tabela 4.** Avaliação microscópica de amostras de leite cru e queijo Minas frescal coletadas do local de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, nas diferentes épocas.

Matérias Estranhas	Época					
	A		B		C	
	Leite	Queijo	Leite	Queijo	Leite	Queijo
Ácaro	ND	1	ND	1	ND	2
Fragmento vegetal	3	Incontável (>100)	5	Incontável (>100)	2	Incontável (>100)
Inseto inteiro	ND	ND	1 (mosca)	ND	1 (vespa)	1 (mosca)
Fragmento inseto	1 (mosca)	5 (mosca)	ND	9 (mosca)	2 (mosca)	5 (formiga)
Grão de areia	ND	1	ND	ND	ND	2
Pêlo humano	1	ND	ND	2	ND	ND
Pêlo bovino	2	4	5	3	3	3
Pêlo de roedor	ND	ND	ND	1	ND	1

ND – não detectada

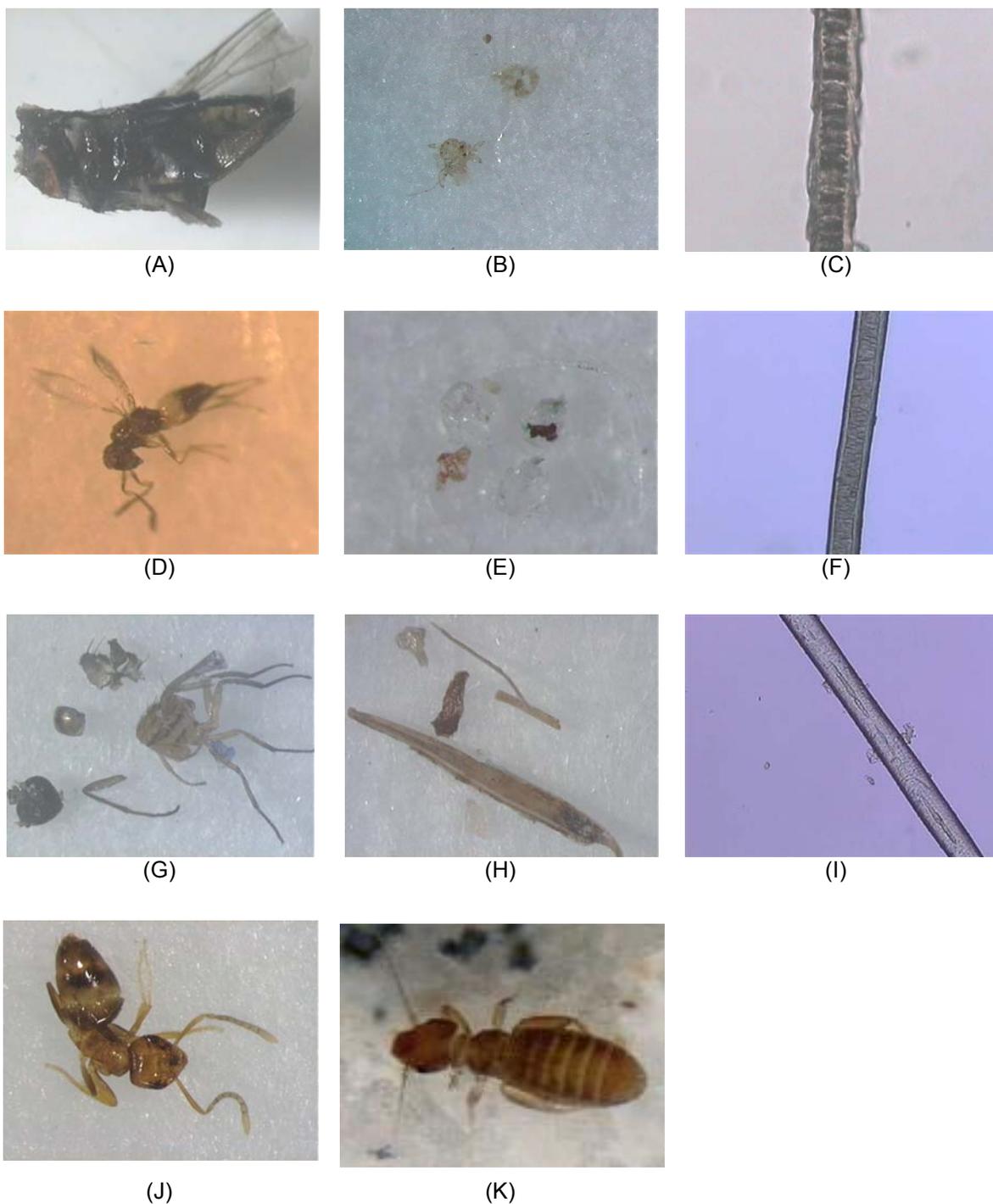


**Figura 13.** Matérias estranhas detectadas em amostra de leite cru para cada época (A, B e C).



**Figura 14.** Matérias estranhas detectadas em amostra de queijo Minas frescal artesanal para cada época (A, B e C).

Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Vialta *et al.* (2002), que do total de 314 amostras, sendo 108 de leite e 206 de queijos, comercializadas informalmente no estado de São Paulo, detectaram pelo menos um tipo de sujidade (pêlo humano, suíno, bovino, eqüino e roedor, fios diversos, grão de areia, ácaro, inseto inteiro e fragmento de inseto) em 301 amostras. Também foram encontrados materiais estranhos prejudiciais à saúde humana (mosca inteira ou fragmentada, e/ou pêlo de roedor) em 28 (26%) das amostras de leite e 90 (43,7%) de queijos.



**Figura 15.** Matérias estranhas detectadas em amostras de leite e queijo Minas frescal artesanal: mosca (A), ácaro (B), pêlo de roedor (C), vespa (D), grão de areia (E), pêlo bovino (F), fragmentos de mosca (G), fragmentos vegetais (H), pêlo humano (I), formiga (J) e psocóptera (K).

#### 4.4 Avaliação do potencial de transmissão de microrganismos patogênicos de homogeneizado de *Musca domestica* para o queijo Minas frescal durante a sua fabricação em escala piloto

No **Anexo 4** estão apresentados os resultados das análises físico-químicas do leite utilizado na fabricação de queijo Minas frescal em escala piloto nas 3 épocas. Diferenças significativas foram observadas para pH, acidez, gordura, EST, proteína total e cinzas, entre as 3 épocas.

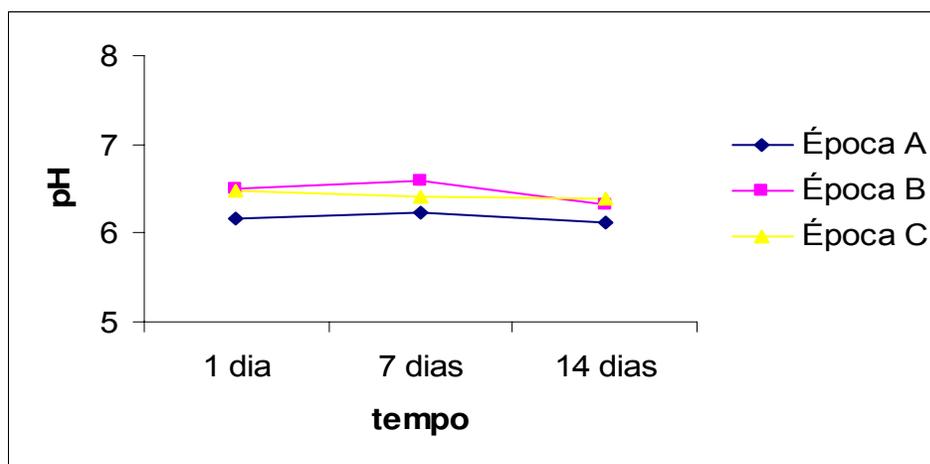
A **Tabela 5** apresenta os resultados das análises microbiológicas das amostras de moscas, de leite cru e pasteurizado, e do “queijo controle” - QC (sem adição do homogeneizado de moscas) e “queijo teste” - QT (com adição de homogeneizado de moscas) nos 3 processamentos de queijo Minas frescal obtido por acidificação direta e realizados em diferentes épocas. Verifica-se que a adição do caldo de moscas contendo contagens elevadas de bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais e *E. coli* nas 3 épocas, originou queijos com 1 dia de fabricação também apresentando contagens elevadas desta microbiota. Estas populações aumentaram em aproximadamente 1 ciclo logarítmico durante a estocagem para o queijo teste, enquanto no queijo controle estas contagens permaneceram praticamente constantes. *E. coli* foi detectada em todas as amostras analisadas, menos no leite pasteurizado e no queijo controle. *Salmonella* spp. foi detectada nas moscas das épocas A e C e nos queijos testes correspondentes, no 1º dia para a época A e durante os 14 dias de estocagem para a época C. *L. monocytogenes* não foi encontrada em nenhuma amostra das 3 épocas analisadas. *S. aureus* foi detectado nas amostras de leite cru das 3 épocas, não sendo detectado nas demais amostras das épocas A e B. Na época C, este patógeno foi detectado nas moscas e no queijo teste com 1 dia de fabricação. Estes resultados comprovam a veiculação de *S. aureus* para o queijo.

**Tabela 5.** Avaliação microbiológica de amostras de moscas, leite e queijo Minas Frescal “controle” e “teste”, fabricados em Escala Piloto, durante estocagem a 10°C por 14 dias, para cada época

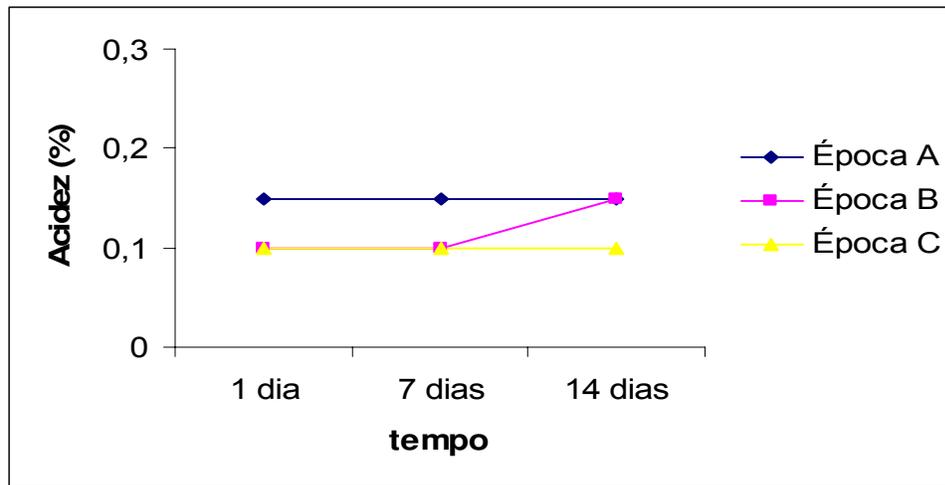
Época	Amostra	Dias estocagem	Bactérias aeróbias mesofílicas (UFCmL <sup>-1</sup> )	Coliformes Totais (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Escherichia coli</i> (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFCmL <sup>-1</sup> )
A	Moscas	-	4,6x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
	Leite cru	-	2,2x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	2,6x10 <sup>2</sup>
	Leite Pasteur.	-	7,1x10 <sup>2</sup>	0,9	<0,3	A	A	<10
	Queijo Teste	1	3,5x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
		7	8,7x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
		14	5,6x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
	Queijo Controle	1	1,0x10 <sup>5</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
		7	3,0x10 <sup>4</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
		14	4,3x10 <sup>4</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
B	Moscas	-	3,1x10 <sup>9</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
	Leite cru	-	1,8x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	1,6x10 <sup>3</sup>
	Leite Pasteur.	-	4,1x10 <sup>2</sup>	<0,3	<0,3	A	A	<10
	Queijo Teste	1	2,7x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	2,4x10 <sup>2</sup>	A	A	<10
		7	1,6x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
		14	1,1x10 <sup>8</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	<10
	Queijo Controle	1	7,0x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	<3,0	A	A	<10
		7	6,0x10 <sup>4</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	<3,0	A	A	<10
		14	2,8x10 <sup>4</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	<3,0	A	A	<10
C	Moscas	-	1,4x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	2,4x10 <sup>3</sup>
	Leite cru	-	9,1x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	A	A	4,6x10 <sup>3</sup>
	Leite Pasteur.	-	6,2x10 <sup>2</sup>	<0,3	<0,3	A	A	<10
	Queijo Teste	1	1,2x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	1,8x10 <sup>2</sup>
		7	1,1x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
		14	8,5x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	A	<10
	Queijo Controle	1	<3,0x10 <sup>4</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
		7	<3,0x10 <sup>4</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	<3,0	A	A	<10
		14	2,5x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	<3,0	A	A	<10

UFCmL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro; NMPmL<sup>-1</sup>: Número mais provável por mililitro; P: Presença; A: Ausência

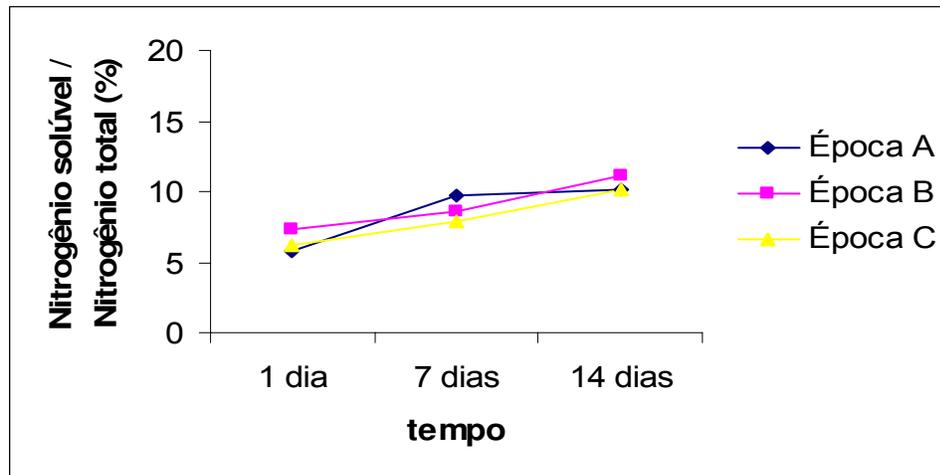
O **Anexo 5** apresenta as comparações dos resultados das análises físico-químicas entre as épocas (A, B e C) e ao longo do período de estocagem. Diferenças significativas são observadas entre as épocas para os parâmetros EST (1º e 14º dia), NaCl (7º dia), gordura (1º e 7º dia), proteína total (7º e 14º dia), pH (1º, 7º e 14º dia) e IEP (1º e 14º dia). Com relação aos índices de proteólise observam-se diferenças significativas entre os queijos para o parâmetro IEP entre as épocas e ao longo do período de estocagem, com aumento de 75,7%, 51,6% e 63,8% para os queijos das épocas A, B e C, respectivamente. Quanto ao IPP, não foi verificada variação significativa entre os dias e nem ao longo do período de estocagem dos mesmos. Nas **Figuras 16, 17, 18 e 19**, pode-se observar a variação do pH, acidez, IEP (porcentagem de nitrogênio solúvel a pH 4,6 pela porcentagem de nitrogênio total) e IPP (porcentagem de nitrogênio não proteico pela porcentagem de nitrogênio total) para as 3 épocas durante a estocagem refrigerada, respectivamente.



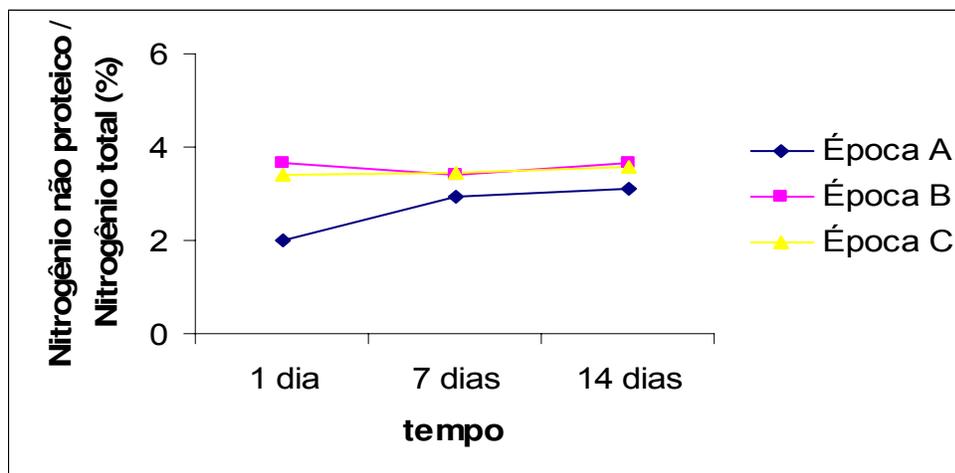
**Figura 16.** Valores de pH para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 17.** Valores de acidez para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 18.** Valores de índice de extensão de proteólise (IEP) para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.



**Figura 19.** Valores de índice de profundidade de proteólise (IPP) para queijo Minas frescal produzido em escala piloto durante estocagem a 10°C por 14 dias para cada época.

Observou-se que os valores de umidade obtidos para os queijos das 3 épocas (A=61,00%, B=60,97% e C=58,80%) estão de acordo com a legislação. Segundo os valores de gordura no extrato seco total (A=47,54%, B=47,78% e C=69,49%), os queijos das épocas A e B classificam-se como gordo (45,0 a 59,9%) e o da época C como extra-gordo (mínimo de 60%). Portanto, estes queijos estão em desacordo com a legislação, segundo a qual são classificados como semi-gordos (25,0 a 44,9%) (DIPOA, 1996, 2004). Os valores de pH (A=6,17, B=6,49 e C=6,47) estão de acordo com a literatura, que cita que o pH do queijo Minas frescal elaborado com ácido láctico, se situa em torno de 6,0 (Furtado, 1990).

Os resultados obtidos nesta etapa (escala piloto), assim como os da 2ª etapa (método artesanal) confirmam que, quando presentes nas moscas, os microrganismos patogênicos são capazes de se desenvolver nos queijos se houver condições adequadas para tal.

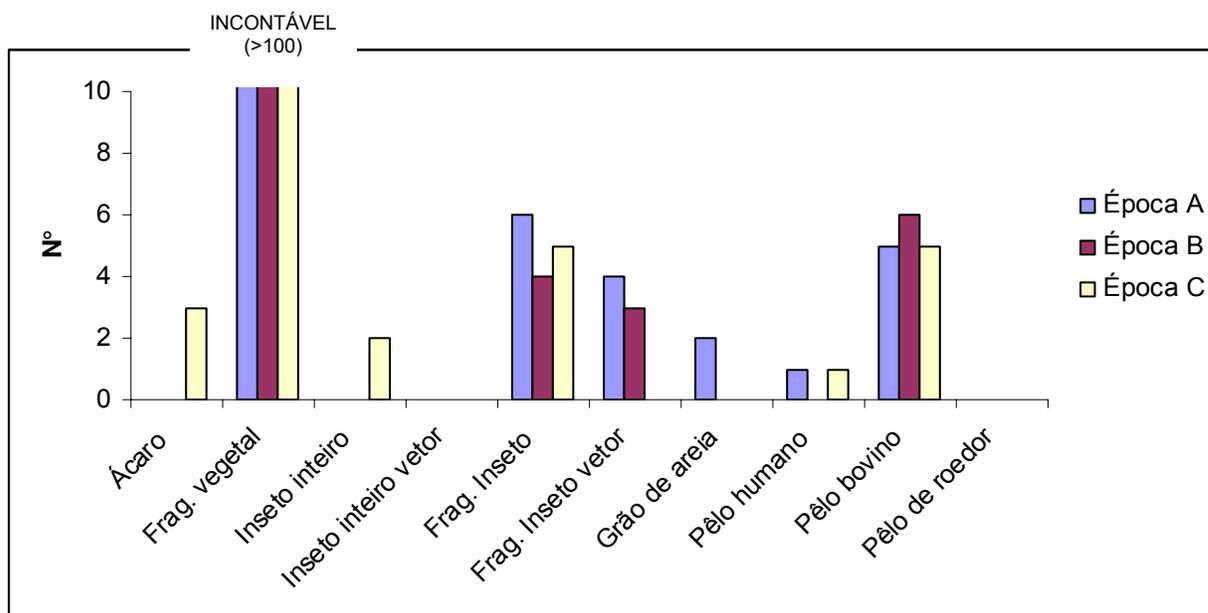
Os resultados da análise microscópica do resíduo coletado no dessorador utilizado para filtração do leite cru estão relacionados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Avaliação microscópica do resíduo coletado no dessorador utilizado para filtração do leite cru

Matérias Estranhas	Época		
	A	B	C
Ácaro	ND	ND	3
Frag. vegetal	Incontável (>100)	Incontável (>100)	Incontável (>100)
Inseto inteiro	ND	ND	2 (psocóptera)
Frag. inseto	4 (mosca) 6 (formiga)	3 (mosca) 4(vespa)	5 (vespa)
Grão de areia	2	ND	ND
Pêlo humano	1	ND	1
Pêlo bovino	5	6	5
Pêlo de roedor	ND	ND	ND

ND – não detectada

As matérias estranhas detectadas no dessorador para cada época, estão apresentadas na **Figura 20**. Pode-se observar a presença de diversos materiais estranhos como ácaro, fragmentos vegetais, inseto inteiro (psocóptera), fragmentos de insetos (formiga e vespa), grão de areia, pêlo humano e pêlo bovino. Além destes, foi detectada também a presença de fragmentos de mosca, considerados vetores mecânicos.



**Figura 20.** Matérias estranhas detectadas no resíduo retido no dessorador, para cada época (A, B e C).

A **Figura 21** apresenta a imagem dos resíduos no dessorador após a filtração do leite, etapa anterior à pasteurização. A análise microscópica do leite filtrado e de queijo “controle” revelou ausência de matérias estranhas, enquanto que no resíduo retido foram identificados diferentes tipos de materiais (**Figura 20**). Estes resultados demonstram a eficiência do processo de filtração do leite com relação à remoção das matérias estranhas. Este fato, correlacionado aos resultados das análises microbiológicas, demonstram que a qualidade microbiológica do produto final pode estar associada ao contato transitório da matéria prima com matérias estranhas ao longo de todo processo de elaboração do queijo.



**Figura 21.** Imagens de resíduo detectado em dessorador, após filtração do leite utilizado na fabricação de queijo Minas frescal.

#### **4.5 Avaliação da capacidade da *Musca domestica* em promover a contaminação cruzada de microrganismos patogênicos provenientes de habitat contaminado para queijo Minas frescal**

Os resultados dos ensaios para verificar a capacidade de transmissão dos microrganismos patogênicos presentes em *Musca domestica* provenientes de habitat contaminado para o queijo Minas frescal, estão apresentados na **Tabela 7**. Verifica-se a presença dos microrganismos patogênicos, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, nas amostras de moscas e de queijo teste, após tempo de contato entre os mesmos de 5 horas.

Esses dados indicam que as moscas, após o contato com os microrganismos patogênicos, são capazes de disseminar para o alimento, a contaminação ambiental que tiveram contato ou que se alimentaram.

Assim, a *Musca domestica* quando presente em ambiente de fabricação de produtos lácteos/queijo pode ser considerada como um fator de risco de contaminação microbiológica ao produto. Ela é atraída pelo alimento e pode acidentalmente, pousar ou cair, carreando para o produto, as suas contaminações. Portanto, a contaminação das moscas está estritamente relacionada ao ambiente onde esses insetos se alimentam e vivem.

**Tabela 7.** Avaliação microbiológica de “pool” de *Musca domestica* e de queijo Minas frescal, utilizados na avaliação da capacidade da *Musca domestica* promover a contaminação cruzada, de microrganismos patogênicos provenientes de habitat contaminado para queijo Minas frescal

Época	Amostra	Bactérias aeróbias mesofílicas (UFCmL <sup>-1</sup> )	Coliformes Totais (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Escherichia coli</i> (NMPmL <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> (UFCmL <sup>-1</sup> )
A	Moscas	7,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	4,0x10 <sup>3</sup>
	Queijo contato	5,0x10 <sup>7</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	3,0x10 <sup>3</sup>
	Queijo controle	1,0x10 <sup>5</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
B	Moscas	4,5x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	1,2x10 <sup>3</sup>
	Queijo contato	1,1x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	3,7x10 <sup>2</sup>
	Queijo controle	2,8x10 <sup>4</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10
C	Moscas	1,4x10 <sup>6</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	2,4x10 <sup>3</sup>
	Queijo contato	1,2x10 <sup>5</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	≥2,4x10 <sup>3</sup>	P	P	1,8x10 <sup>2</sup>
	Queijo controle	<3,0x10 <sup>5</sup>	<3,0	<3,0	A	A	<10

UFCmL<sup>-1</sup>: Unidade formadora de colônia por mililitro; NMPmL<sup>-1</sup>: Número mais provável por mililitro; P: Presença; A: Ausência

## 5.CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste trabalho foi possível comprovar a presença de patógenos em “pool” de *Musca domestica* de diferentes locais de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, sendo as bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes totais, *E. coli* e *Salmonella* spp. comuns a todos os ambientes de fabricação de queijo.

O potencial de transmissão das bactérias aeróbias mesofílicas, coliformes fecais, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* das moscas para a amostra comercial de queijo Minas frescal ultrafiltrado, foi verificado tanto por contato das moscas vivas com o queijo, como pela adição de caldo de moscas ao queijo.

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de moscas domésticas, matéria-prima (leite) e produto final (queijo Minas frescal), coletadas em local de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, mostraram correlação entre as amostras. Os microrganismos patogênicos presentes no “pool” de moscas foram também detectados no leite e no queijo. Outra correlação observada se faz entre os resultados da análise microscópica e microbiológica para as amostras de leite e queijo artesanal, indicando o envolvimento da *Musca domestica* como vetor mecânico de patógenos nela presentes.

Os resultados dos ensaios para verificar a capacidade de transmissão dos microrganismos patogênicos presentes em *Musca domestica* para o produto processado durante a fabricação de queijo Minas frescal, possibilitaram a conclusão de que a mosca doméstica quando presente em ambiente de fabricação de produtos lácteos/queijo, pode ser considerada um fator de risco de contaminação microbiológica ao produto. Ela é atraída e pode acidentalmente pousar ou cair no produto, carregando as suas contaminações para o alimento.

É possível concluir que a contaminação microbiológica de *Musca domestica* está relacionada ao seu habitat, ou seja, onde elas se alimentam e vivem, e que estes insetos atuam como vetores mecânicos na transmissão de microrganismos patogênicos para outros ambientes.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACTON, G.H. The determination of lactose in milk. **Australian Journal of Dairy Technology**. v. 32, n. 2, p. 11, 1977.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. **Métodos Físico-químicos para Análise de Alimentos**. Instituto Adolfo Lutz, 4ª edição. Brasília, 1018p. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Resolução RDC nº 175, de 8 de julho de 2003. **Diário Oficial da União**. Seção 1, nº 130, ISSN 1677-7042, p. 32-33.

ALMEIDA FILHO, E.S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas Frescal de produção artesanal, comercializados em Poços de Caldas/MG. **Higiene Alimentar**. 16(102/103): 71-73, nov-dez. 2002.

ASCHAFFENBURG, R.; DREWRY, J. New procedure for the routine determination of the various non casein proteins of milk. International Dairy Congress, 15. London, 1959. **Proceedings...** International Dairy Federation, 1959. 3: 1631-1637.

BARBIERI, M.K. **Desenvolvimento de um método para determinação de matérias estranhas em bananas-passas e avaliação da contaminação de produtos comerciais em Campinas**. 1994. 110p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

BARBIERI, M.K.; YOTSUYANAGI, K. Avaliação da qualidade higiênica de café cru, torrado e moído de diferentes procedências. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.5, p. 101-107, 2002.

BIZANI, D. **Isolamento e identificação de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas contidas nas peças bucais e membros locomotores da *Musca domestica* Linnaeus, 1758 de zonas urbana e rural do município de Porto Alegre, RS, Brasil.** 1996. 95p. Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

BOER, R.; NOOY, P.F.C. **Low-fat semi-hard cheese from ultrafiltrated milk.** *Nordeuropaeisk Mejeri-Tidsskrift*, Vanloese, Denmark, 46 (3): 52-61, 1980.

BULHÕES, C.C.C.; ROSSI JUNIOR, O.D. Ocorrência de bactérias do gênero *Aeromonas* em queijo-de-minas frescal artesanal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, vol.54, n°3, p. 320-24, 2002.

CÂMARA, S.A.V.; AMARAL, G.B.; MULLER, M.T.; SILVEIRA, K.C.S.; ALMEIDA, T.N. De; MEDEIRO, C.F. Avaliação microbiológica de queijo tipo minas artesanal, comercializado no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

CAMPOS, A.C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal.** 2000. 80p. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, Campinas, 2000.

CAMPOS, M.R.H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; VIEIRA, C.A.S.; JAYME, L.B.; SANTOS, P.P.; SERAFINI, A.B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.4, jul./ago. 2006.

CARVALHO, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em**

**Campinas – SP.** 2003. 83p. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia e Alimentos. – UNICAMP, Campinas, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Outbreak of Listeriosis associated with homemade cheese-North Carolina.** MMWR: Mortality Weekly Report, v.50, n.26, p.560-562, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. CX/FH 01/14 – Discussion Paper on proposed draft guidelines for evaluating objectionable matter in food. JOINT FAO/WHO Food Standards Programme, **Codex Committee on Food Hygiene**, 34<sup>a</sup> Session, Bangkok, Thailand, 8-13 October 2001.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Ministério da Saúde. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativa a alimentos e bebidas. Resolução Normativa nº12/78. **Diário Oficial**, Brasília 24 de jul. 1978, Seção I, pt. I, p.11525.

CORREIA, M.; RONCADA M.J. Características microscópicas de queijo prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres da Cidade de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, vol. 31, nº 3, p. 296-301, 1997.

DE BUYSER, M.L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and different industrialised countries. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, jul., 2001.

DE JESUS, A.J.; OLSEN, A.R.; BRYCE, J.R.; WHITING, R.C. Quantitative contamination and transfer of *Escherichia coli* from foods by houseflies, *Musca domestica* L. (Diptera:Muscidae). **International Journal of Food Microbiology**, vol.93, nº 2, p. 259-262, 2004.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Regulamentos Técnicos de

Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União** de 11/03/1996, Seção 01, p.3977. Brasília, 1996.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Regulamentos Técnicos para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Portaria nº352 de 04 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União** de 08/09/1997, Seção 01, p.19684. Brasília, 1997.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Instrução Normativa nº 4 de 01 de março de 2004. **Diário Oficial da União** de 05/03/2004, Seção 01, p.5. Brasília, 2004.

DIVISÃO NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS. Ministério da Saúde. Estabelece provisoriamente o limite máximo de até 30 fragmentos de insetos em 100g do produto. Portaria nº 1, de 4 de abril de 1986. **Diário Oficial**, Brasília, Seção I, pt. I, p. 5039, 1986.

FDA - Food & Drug Administration, 2002. **Bacteriological Analytical Manual. Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov>>. Acesso em: 11 de agosto de 2006.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **The Food Defect Action Levels – level of natural or unavoidable defects in foods that present no health hazards for humans**. US Food and Drug Administration Center For Food Safety and Applied Nutrition. May 1995; revised March 1997; revised May 1998. Disponível na internet: <http://www.fda.gov>, data de acesso 10/09/04.

FOTEDAR, R. Vector potencial of houseflies (*Musca domestica*) in the transmission of *Vibrio cholerae* in India. **Acta Tropical**, vol. 78, p. 31-34, 2001.

- FRANCO, R.M.; ALMEIDA, L.E.F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v.6, n.21, p.33-36, 1992.
- FURTADO, M.M.; SOUZA, H.M.; MUNCK, A.V. A fabricação do queijo Minas frescal sem o emprego de culturas lácticas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.35, n.207, p.15-21, 1980a.
- FURTADO, M.M. **A arte e a ciência do queijo**. (2ª ed.) São Paulo: Editora Globo S.A., 1990. 297p.
- GAY, M.; AMGAR, A. Factors moderating *Listeria monocytogenes* growth in raw milk and in soft cheese made from raw milk. **EDP Sciences - Le lait**, n.85, p.153-170, 2005.
- GENTRY, W.J.; HARRIS; K.L.; GENTRY JR., J.W. **Microanalytical Entomology for Food Sanitation Control**. Flórida, LithoGraphics, vol. I, p.78-91, vol.II plate 250-252, 1991.
- GORHAM, J. R. **Principles of food analysis for filth, decomposition, and foreign mater**. FDA Technical Bulletin N° 1. Washington, 1985
- GRACZYK, T.K.; GRIMES, B.H.; KNIGHT, R.; DA SILVA, A.J.; PIENIAZEK, N.J.; VEAL, D.A. Detection of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia* carried by synanthropic flies by combined fluorescent in situ hybridization and a monoclonal antibody. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol.68, p. 228-32, 2003.
- HAMILTON, J.V.; LEHANE, M.J.; BRAIG, H.R. Isolation of *Enterobacter sakasaki* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Emerging Infectious Diseases**, Bangor, vol. 9, n° 10, October, p. 1355-56, 2003.
- HOFFMANN. F. L.; DA SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas Frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**. São Paulo. v. 16, n. 96, p. 69-76, maio, 2002.

HORWITZ, W. ed. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg, MD, USA, A.O.A.C. International. 18<sup>th</sup> ed. 2005. Chapter 33, 87p.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total nitrogen content of milk by Kjeldahl method**. Brussels: FIL/IDF, 1962. (FIL-IDF, 20).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the protein content of processed cheese products**. Brussels: FIL/IDF, 1964. (FIL-IDF, 25).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Determination of the total solids content of cheese and processed cheese**. Brussels: FIL/IDF, 1982. (FIL-IDF, 4A).

KHAN, A.R.; HUQ, F. Disease agents carried by flies in Dacca city. **Bangladesh Medical Research Council Bulletin**, Bangladesh, vol. 4, n° 2, p. 86-93, 1978.

KOBAYASHI, M.; SASAKI, T.; SAITO, N.; TAMURA, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, H.; AGUI, N. Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 61, n° 4, p.625-629. 1999.

KOZAK, J.; BALMER, T.; BYRNE, R.; FISHER, K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. **Food Control**, Oxford, v.7, n.4/5, p.215-221, aug./out. 1996. Special issue.

KUZINA, L.V.; PELOQUIM, J.J.; VACEK, D.C.; MILLER, T.A. Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera:Tephritidae). **Current Microbiology**, vol. 42, n° 4, april, p. 290-4, 2001.

LANARA. Laboratório Nacional de Referência Animal. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-químicas, para controle de leite e produtos lácteos**. p. 54, 2003.

LEVINE, M.M.; COHEN, D.; GREEN, M.; LEVINE, O.S.; MINTZ, E.D. **Fly control and shigellosis**. *Lancet*, 353:1020, 1999.

LIKIRDOPULOS, C.A.; SIMMONS, O.D.; WATSON, D.W.; SOBSEY M.D. **Collection methods for evaluating microbial indicator concentrations of houseflies (*Musca domestica*) on swine farms in eastern North Carolina**. *Animal Waste Management Symposium*, 2005.

LOGUERCIO, A.P.; ALEIXO, J.A.G. Microbiologia de Queijo Tipo Minas Frescal Produzido Artesanalmente. **Ciência Rural**. v.31, n.6, Santa Maria, 2001.

MANDIL, A.; MORAIS, V.A.D.; PEREIRA, M.L.; FAGUNDES, J.M.S.; CARMO, L.S.; CORREIA, M.G.; CASTRO, E.P.; GOMES, M.J.V.M. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos comercializados em Belo Horizonte, MG, no período de 1984 a 1991. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 8., 1993, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre, 1993.

MARTÍNEZ, M.J.; DE ALUJA, A.S., GEMMELL, M. Failure to incriminate domestic flies (Diptera: Muscidae) as mechanical vectors of *Taenia* eggs (Cyclophyllidae: Taeniidae) in rural Mexico. **Journal of Medical Entomology**, vol. 37, p.489-91, 2000.

MIAN, L.S.; MAAG, H.; TACAL, J.V. Isolation of *Salmonella* from muscoid flies at commercial animal establishments in San Bernardino Country, California. **Journal of Vector Ecology**, vol. 27, nº 1, p. 82-5, 2002.

MONZÓN, R.B.; SÁNCHEZ, A.R.; TADIAMAN, B.M.; NAJOS, A.O.; VALENCIA, E.G.; RUEDA, R.R. A comparison of the role of *Musca domestica* (Linnaeus) and *Chrysomya megacephala* (Fabricius) as mechanical vectors of helminthic parasites in a typical slum área of metropolitan manila. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, vol. 22, p. 222-8, 1991.

MORGAN, F., BONIN, V.; MALLEREAU, M.P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufactured, ripening and storage of soft latic cheese made

from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**. Amsterdam, v.64, n.1/2, p. 217-221, feb. 2001.

MUHAMMAD, J.A.; ZUREK, L. Association of Escherichia coli O157:H7 with houseflies on a cattle farm. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, nº12, p.7578-7580. 2004.

MULLER H.E. Listeriosis in animals. **Turk Journal Infect**. v. 2, n. 4, p. 505-19, 1988.

NALDINI, M.C.M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas Frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP, Campinas, 2002.

OLIVEIRA, V.C.; MELLO, R.P.; D'ALMEIDA, J.M. Dípteros muscóideos como vetores mecânicos de ovos de helmintos em jardim zoológico, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 614-20, 2002.

OLSEN, A.R.; HAMMACK, T.S. Isolation of *Salmonella* spp. from the housefly, *Musca domestica* L., and the dump fly, *Hydrotaea aenescens* (Wiedemann) (Diptera: Muscidae), at caged-layer houses. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 7, p. 958-960, July, 2000.

PEARSON, H.E. Human infections caused by organisms of the *Bacillus* species. **American Journal of Clinical Pathology**. V.53, p.506-515, 1970.

PEDRO, S.C.M. **Avaliação da qualidade higiênico sanitária dos locais de venda e de amostras de queijo minas meia cura, comercializado na cidade de São Paulo**. 2003. 85p. Tese de Mestrado - Faculdade de Saúde Publica, USP, São Paulo, 2003.

PEREIRA, M.L.; GASTELOIS, M.C.A.; BASTOS, E.M.A.F.; CAIAFFA, W.T.; FALEIRO, E.S.C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.51, nº5, 1999.

PERESI, J.T.M.; GRACIANO, R.A.S.; ALMEIDA, I.A.Z.C. de; LIMA, S.I. de; RIBEIRO, A.K.; CARVALHO, I.S de; LIMA, M de. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial. Qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes microbianos. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo. v. 15, n. 83, p. 63-70, abr. 2001.

RAHUMA, N.; GHENGHESH, K.S.; BEN AISSA, R; ELAMAARI, A. Carriage by the housefly (*Musca domestica*) of multiple-antibiotic-resistant bacteria that are potentially pathogenic to humans, in hospital and other urban environments in Misurata, Lybia. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 99, n 8, p.795-802(8), December, 2005.

SAIDE, P.C.M.; GONZÁLEZ, H.D. Importancia de las moscas como vectores potenciales de enfermedades diarreicas en humanos. **Revista Biomédica**, vol. 8, nº 3, p.163-170, 1997.

SABIONI, J. G.; MAIA, A. R. P. Correlação entre a população de *Staphylococcus aureus* e a atividade de termonuclease em queijo Minas Frescal. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo. v. 12, n. 54, p. 13-17, mar./abr. 1998.

SALOTTI, B.M.; CARVALHO, A.C.F.B.; AMARAL, L.A.; VIDAL-MARTINS, A.M.C.; CORTEZ, A.L. Qualidade Microbiológica do queijo Minas Frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, abr./jun. 2006.

SASAKI, T. KOBAYASHI, M. AGUI, N. Epidemiological potencial of excretion and regurgitation by *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) in the dissemination of *Escherichia coli* O157:H7 to food. **Journal of Medical Entomology**. vol. 37, nº6, p.945-949, 2000.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Estabelece o limite máximo de 75 fragmentos de insetos em 50g de farinha de trigo e 225 fragmentos em

225g para massas alimentícias, biscoitos, produtos de panificação e confeitaria.  
Portaria nº 74, de 4 agosto de 1994. **Diário Oficial**, Brasília p.11809, 1994.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Ministério da Saúde. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de chás-plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. **Diário Oficial**. Brasília. 1998.

SELA, S.; NESTEL, D ; PINTO, R. ;NEMNY-LAVY, E.; BAR-JOSEPH, M. Mediterranean fruit fly as a potencial vector of bacterial pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**. p. 4052-4056. July 2005.

SENA, M.J. ; CERQUEIRA, M.M.O.P. ; MORAIS, C.F.A. ; CORRÊA, E.S.; SOUZA, M.R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p.41-44, 2000.

SERRES, L.; AMARIGLIO, S.; PETRANSXIENE, D. **Controle de la qualité des produits laitiers**. Ministère de l'Agriculture. Direction des Services Vétérinaires. Tome I. Analyse Physique et Chimique (Chimie VII-6), 1973.

SILVA, M.C.D.; HOFER, E.; TIBANA, A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.61, n.3, p.354-356, mar. 1998.

SZALANSKI, A.L., OWENS, C.B.; MCKAY, T; STEELMAN, C.D. Detection of *Campylobacter* and *Escherichia coli* O157:H7 from filth flies by polymerase chain reaction. **Medical and Veterinary Entomology**, vol. 18, nº 3, p. 241-6, 2004.

TAN, S.W.; YAP, K.L.; LEE, H.L. Mechanical transport of rotavirus by the legs and wings of *Musca domestica* (Diptera:Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, vol. 34, p. 527-31, 1997.

THYSSEN, P.J.; MORETTI, T.C.; UETA, M.T.; RIBEIRO, O.B. O papel dos insetos (Blattodea, Díptera e Hymenoptera) como possíveis vetores mecânicos de helmintos em ambiente domiciliar e peridomiciliar. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, vol. 20, nº 4, p. 1096-1102, 2004.

TORRES, J.R.; OLIVEIRA, C.M.B.; WALD, V.B. Influência sazonal sobre os períodos de pré-pupa e de pupa de *Musca domestica*, na região de Porto Alegre, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. vol. 30, nº1, p.37-42, 2002.

VAKALERIS; D.G.; PRICE, W.V. Rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. **Journal of Dairy Science**. Champaign, 42 (2): 264-276, 1959.

VAN DENDER, A.G.F.; MORENO, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal. **Revista do Instituto Cândido Tostes**. V.47, n.279-281, p. 76-77, 1992.

VAN DENDER, A G. F.; SEVILHANO, L. de A; YOTSUYANAGI, K.; JARDIM, D. C. P. Determinação de atividade de água usando crioscopia eletrônica. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, mai./jun., v. 50, n. 293, p.18-26, 1995.

VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D.F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association - APHA, 1992. 1219p.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; VIEIRA, M.C.; BARBIERI, M.K.; GENOVEZ, M.E.; ROXO, E.; SCARCELLI, E.; GRASSO, L.M.P.S.; SOUZA, F.K.H.; ALMEIDA, A.R. Caracterização microbiológica e microscópica de queijo minas produzido informalmente. CD dos **Anais** do XVIII Congresso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, p. 3059-3062, 2002.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A.L.S.; BARBIERI, M.K.; GRAEL-MARASCA, E.T.; SOUZA, F.K.H.; MARTINI, M. Caracterização microbiológica e microscópica de

leite e queijos comercializados informalmente no Estado de São Paulo. **Anais** do XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Recife, 2004.

VIEIRA, S.D.A.; GOUDÉDRANCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS, J.L. Éléments de fabrication d'un nouveau fromage brésilien de type "Minas frescal" par le procédé M.M.V. **La Technique Laitière**, Rennes, France, n.978, p.17-20 juil./août, 1983.

VIEIRA, S.D.A.; GOUDÉDRANCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS, J.L. Parâmetros para a fabricação de queijo Minas frescal por meio de ultrafiltração. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.39, n.235, p.53-58, 1984.

ZIOBRO, G., Chapter Editor. Extraneous Materials: Isolation. In: HORWITZ, W. (Ed). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. Gaithersburg, MD, USA, A.O.A.C. International. 18<sup>th</sup> ed. 2005. Chapter 16, 76p.

## Anexo 1. Características físico-químicas para o queijo Minas frescal ultrafiltrado

“Controle” durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey.

Parâmetro	Época	Dias de estocagem a 10°C			d.m.s. (5%)
		1	7	14	
pH	A	6,42 ± 0,01 bA	6,40 ± 0,01 bA	6,34 ± 0,01 cB	0,02
	B	6,47 ± 0,00 aA	6,47 ± 0,00 aA	6,40 ± 0,00 bB	
	C	6,40 ± 0,01 bA	6,40 ± 0,01 bA	6,48 ± 0,01 aB	
d.m.s. (5%)		0,02	0,03	0,03	
Acidez (%)	A	0,11 ± 0,01 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,01
	B	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	
	C	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	
d.m.s. (5%)		0,01	0,00	0,00	
EST (%)	A	36,30 ± 0,48 aA	35,48 ± 1,58 aA	35,47 ± 1,00 aA	2,79
	B	32,52 ± 1,04 aA	34,39 ± 0,96 aA	33,30 ± 2,09 aA	
	C	33,33 ± 0,95 bA	33,99 ± 1,12 aA	33,15 ± 1,39 aA	
d.m.s. (5%)		2,15	3,13	3,90	
Gordura (%)	A	15,91 ± 1,68 aA	16,44 ± 1,15 abA	15,86 ± 1,04 aA	3,31
	B	17,32 ± 0,52 aA	17,54 ± 1,70 aA	16,83 ± 0,94 aA	
	C	14,87 ± 0,25 aA	14,17 ± 0,67 bA	13,08 ± 1,09 bA	
d.m.s. (5%)		2,57	3,12	2,57	
NaCl (%)	A	1,41 ± 0,01 bAB	1,35 ± 0,04 bB	1,45 ± 0,03 bA	0,07
	B	1,16 ± 0,03 cB	1,29 ± 0,04 bAB	1,41 ± 0,07 bA	
	C	1,59 ± 0,01aA	1,66 ± 0,04 aA	1,62 ± 0,03 aA	
d.m.s. (5%)		0,00	0,09	0,12	
Proteína total (%)	A	14,52 ± 0,12 aA	14,02 ± 0,43 aA	14,22 ± 0,05 aA	0,64
	B	13,67 ± 0,35 abA	12,01 ± 0,80 bA	13,24 ± 0,93 abA	
	C	12,99 ± 0,50 bA	12,82 ± 0,51 abA	12,32 ± 0,35 bA	
d.m.s. (5%)		0,90	1,51	1,44	
IEP (%)	A	13,41 ± 0,41 aA	14,61 ± 1,33 aA	14,95 ± 0,38 aA	2,08
	B	13,11 ± 0,76 aA	17,45 ± 2,68 aA	14,91 ± 1,39 aA	
	C	13,73 ± 0,45 aB	14,04 ± 1,45 aB	17,06 ± 1,13 aA	
d.m.s. (5%)		1,41	4,81	2,65	
IPP (%)	A	5,11 ± 1,13 aA	4,49 ± 0,73 aA	4,16 ± 0,86 bA	2,31
	B	4,12 ± 1,72 aA	5,32 ± 1,16 aA	5,03 ± 0,81 abA	
	C	4,63 ± 1,53 aA	5,51 ± 0,87 aA	6,65 ± 0,66 aA	
d.m.s. (5%)		3,71	2,35	1,96	
Aw	A	0,98 ± 0,00 aA	0,98 ± 0,00 aA	0,98 ± 0,00 aA	0,00
	B	0,98 ± 0,00 aA	0,98 ± 0,01 aA	0,99 ± 0,01 aA	
	C	0,98 ± 0,00 aA	0,98 ± 0,00 aA	0,98 ± 0,00 aA	
d.m.s. (5%)		0,00	0,01	0,01	

Média ± desvio padrão; Letras maiúsculas diferentes na horizontal indicam diferença significativa P<0,05 para variável estocagem; Letras minúsculas diferentes na vertical indicam diferença significativa P<0,05 para variável época.

d.m.s.: diferença mínima significativa, EST: extrato seco total, IEP: índice de extensão de proteólise, IPP: índice de profundidade de proteólise.

**Anexo 2.** Características físico-químicas de leite cru do local de fabricação de queijo Minas frescal artesanal, das diferentes épocas.

Características físico-químicas	Época			d.m.s. (5%)
	A	B	C	
PH	6.60 ± 0.00 a	6.66 ± 0.00 a	6.81 ± 0.00 a	0,200
Acidez (°D)	18.13 ± 0.31 a	18.66 ± 0.30 a	17.09 ± 0.30 b	0,757
EST (g/100g)	12.72 ± 0.18 a	11.60 ± 0.11 b	11.04 ± 0.45 b	0,710
Gordura (%)	3.70 ± 0.00 a	3.53 ± 0.06 a	3.53 ± 0.49 a	0,718
Lactose (g/100mL)	4.52 ± 0.00 a	4.37 ± 0.00 a	4.38 ± 0.00 a	0,200
Proteína total (g/100mL)	3.37 ± 0.02 a	3.34 ± 0.04 a	3.25 ± 0.00 b	0,060
Cinzas (g/100mL)	0.74 ± 0.00 a	0.72 ± 0.01 a	0.72 ± 0.01 a	0,020
Densidade	1.0286 ± 0.00 a	1.0273 ± 0.00 a	1.0264 ± 0.00 a	0,100

média ± desvio padrão, d.m.s.: diferença mínima significativa, EST: extrato seco total

**Anexo 3.** Características físico-químicas para as amostras de queijo Minas frescal do local de fabricação artesanal durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey.

Parâmetro	Época	Dias de estocagem a 10°C			d.m.s. (5%)
		1	7	14	
pH	A	6,00 ± 0,16 bA	5,24 ± 0,08 bB	5,12 ± 0,09 aB	0,28
	B	6,22 ± 0,02 abA	5,32 ± 0,02 bB	5,20 ± 0,03 aB	0,90
	C	6,31 ± 0,01 aA	5,49 ± 0,03 aB	5,27 ± 0,04 aB	0,25
d.m.s. (5%)		0,23	0,12	0,15	
Acidez (%)	A	0,24 ± 0,07 aB	0,75 ± 0,08 aA	0,85 ± 0,07 aA	0,11
	B	0,15 ± 0,03 bC	0,52 ± 0,03 bB	0,90 ± 0,02 aA	0,10
	C	0,12 ± 0,03 bC	0,55 ± 0,03bB	0,83 ± 0,08 aA	0,10
d.m.s. (5%)		0,04	0,04	0,07	
EST (%)	A	37,79 ± 0,89 aA	36,19 ± 0,13 aB	34,71 ± 0,43 aC	1,44
	B	37,21 ± 2,48 aA	37,69 ± 1,14 aA	36,43 ± 0,34 aA	3,98
	C	36,32 ± 0,80 aA	36,75 ± 1,96 aA	34,53 ± 1,21 aA	3,53
d.m.s. (5%)		3,99	3,28	1,93	
Gordura (%)	A	15,28 ± 1,31 aA	16,49 ± 0,43 aA	14,61 ± 0,14 bA	2,01
	B	15,53 ± 2,92 aA	15,16 ± 0,75 aA	17,44 ± 1,06 aA	4,62
	C	17,02 ± 0,76 aA	14,80 ± 1,05 aB	15,77 ± 0,60 abAB	2,07
d.m.s. (5%)		4,71	1,97	1,77	
NaCl (%)	A	1,30 ± 0,20 aA	1,19 ± 0,17 bA	1,25 ± 0,12 aA	0,41
	B	1,40 ± 0,08 aA	1,48 ± 0,01 aA	1,42 ± 0,02 aA	0,12
	C	1,35 ± 0,00 aA	1,32 ± 0,03 abA	1,36 ± 0,04 aA	0,06
d.m.s. (5%)		0,31	0,24	0,18	
Proteína total (%)	A	14,77 ± 0,33 bA	14,50 ± 1,96 bA	15,56 ± 0,50 aA	2,96
	B	20,27 ± 4,61 aA	16,86 ± 0,42 bA	14,67 ± 0,29 aA	6,71
	C	14,95 ± 0,72 bB	21,69 ± 0,94 aB	14,77 ± 0,69 aB	1,98
d.m.s. (5%)		5,77	3,20	1,29	
IEP (%)	A	7,08 ± 2,54 aB	13,65 ± 1,84 aA	13,65 ± 1,84 aA	4,59
	B	7,10 ± 2,04 aB	10,37 ± 0,59 bB	10,37 ± 0,59 bA	3,35
	C	9,68 ± 5,76 aA	9,44 ± 0,65 bA	9,44 ± 0,65 bA	8,54
d.m.s. (5%)		9,57	2,95	2,24	
IPP (%)	A	4,74 ± 0,93 aA	4,69 ± 0,44 aA	5,91 ± 0,49 aA	1,65
	B	3,38 ± 0,96 aB	3,75 ± 0,27 bB	6,08 ± 0,20 aA	1,47
	C	3,50 ± 0,10 aAB	1,92 ± 0,21 cB	6,12 ± 2,23 aA	3,24
d.m.s. (5%)		1,94	0,81	3,31	
Aw	A	0,97 ± 0,00 bB	0,97 ± 0,01 aA	0,97 ± 0,00 aA	0,01
	B	0,99 ± 0,01 aA	0,97 ± 0,00 aB	0,97 ± 0,00 aB	0,01
	C	0,98 ± 0,00 aA	0,97 ± 0,00 aA	0,97 ± 0,00 aA	0,00
d.m.s. (5%)		0,01	0,01	0,00	

Média ± desvio padrão; Letras maiúsculas diferentes na horizontal indicam diferença significativa P<0,05 para variável estocagem; Letras minúsculas diferentes na vertical indicam diferença significativa P<0,05 para variável época.

d.m.s.: diferença mínima significativa, EST: extrato seco total, IEP: índice de extensão de proteólise, IPP: índice de profundidade de proteólise.

**Anexo 4.** Características físico-químicas para as amostras de leite utilizado para a fabricação de queijos Minas frescal em Escala Piloto, das diferentes épocas.

Características físico-químicas	Época			d.m.s. (5%)
	A	B	C	
PH	6.63 ± 0.00 c	6.69 ± 0.00 b	6.75 ± 0.00 a	0,01
Acidez (°D)	14.42 ± 0.00 b	13.94 ± 0.00 c	15.38 ± 0.00 a	0,01
EST (g/100g)	10.96 ± 0.05 b	9.99 ± 0.08 c	11.90 ± 0.03 a	0,13
Gordura (%)	3.43 ± 0.06 ab	3.23 ± 0.12 b	3.63 ± 0.06 a	0,20
Lactose (g/100mL)	4.60 ± 0.00 a	4.70 ± 0.00 a	4.60 ± 0.00 a	0,10
Proteína total (g/100mL)	2.89 ± 0.07 a	2.64 ± 0.03 b	2.89 ± 0.02 a	0,11
Cinzas (g/100mL)	0.67 ± 0.01 b	0.67 ± 0.03 b	0.79 ± 0.02 a	0,05
Densidade	1.03 ± 0.00 a	1.03 ± 0.00 a	1.03 ± 0.00 a	0,01

média ± desvio padrão, d.m.s.: diferença mínima significativa, EST: extrato seco total

**Anexo 5.** Características físico-químicas para as amostras de queijo Minas frescal “controle”, fabricadas em Escala Piloto, durante estocagem a 10°C por 14 dias para as diferentes épocas, pelo teste de Tukey.

Parâmetro	Época	Dias de estocagem a 10°C			
		1	7	14	d.m.s. (5%)
pH	A	6.17 ± 0.02 bB	6.23 ± 0.02 cA	6.11 ± 0.03 bC	0,05
	B	6.49 ± 0.03 aA	6.59 ± 0.05 aA	6.33 ± 0.04 aB	0,10
	C	6.47 ± 0.02 aA	6.42 ± 0.01 bB	6.38 ± 0.02 aB	0,04
d.m.s. (5%)		0,06	0,08	0,07	
Acidez	A	0,15 ± 0,00 aA	0,15 ± 0,00 aA	0,15 ± 0,00 aA	0,00
	B	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,15 ± 0,00 aB	0,01
	C	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,10 ± 0,00 aA	0,00
d.m.s. (5%)		0,06	0,06	0,06	
EST (%)	A	39.00 ± 0.40 bA	39.08 ± 1.58 aA	38.90 ± 1.95 bA	3,67
	B	39.03 ± 1.14 bB	40.35 ± 0.53 aAB	42.21 ± 0.53 aA	1,96
	C	41.20 ± 0.45 aA	42.60 ± 2.50 aA	40.94 ± 0.36 abA	3,71
d.m.s. (5%)		1,86	4,35	2,96	
Gordura (%)	A	18.54 ± 1.37 bB	19.44 ± 1.00 bAB	21.45 ± 0.33 aA	2,50
	B	18.65 ± 1.15 bB	20.47 ± 0.10 bA	20.92 ± 0.20 aA	1,69
	C	28.63 ± 6.49 aA	23.43 ± 0.39 aB	21.42 ± 0.56 aB	5,10
d.m.s. (5%)		9,74	1,55	0,98	
NaCl (%)	A	1.39 ± 0.05 aA	1.44 ± 0.11 aA	1.28 ± 0.05 aA	0,19
	B	1.15 ± 0.06 aA	1.15 ± 0.06 bA	1.18 ± 0.13 aA	0,22
	C	1.20 ± 0.15 aA	1.12 ± 0.06 bA	1.26 ± 0.08 aA	0,26
d.m.s. (5%)		0,24	0,20	0,23	
Proteína total (%)	A	14.56 ± 1.49 aA	14.18 ± 0.35 bA	14.61 ± 0.21 bA	2,23
	B	14.69 ± 0.21 aB	15.22 ± 0.35 aB	16.11 ± 0.31 aA	0,74
	C	14.10 ± 0.49 aA	14.60 ± 0.23 abA	14.60 ± 0.91 bA	1,53
d.m.s. (5%)		2,28	0,78	1,42	
IEP (%)	A	5.77 ± 0.83 bB	9.74 ± 3.20 aA	10.14 ± 0.47 bA	4,30
	B	7.34 ± 0.19 aB	8.64 ± 0.12 aB	11.13 ± 1.15 aA	1,70
	C	6.19 ± 0.67abB	7.92 ± 0.36 aAB	10.14 ± 0.47 bA	2,00
d.m.s. (5%)		1,56	4,65	0,19	
IPP (%)	A	2.02 ± 1.21 aA	2.92 ± 0.35 aA	3.11 ± 0.07 aA	1,83
	B	3.66 ± 0.52 aA	3.41 ± 1.37 aA	3.65 ± 0.90 aA	2,48
	C	3.40 ± 1.11 aA	3.46 ± 0.27 aA	3.56 ± 0.77 aA	2,00
d.m.s. (5%)		2,49	2,08	1,72	
Aw	A	0.99 ± 0.00 aA	0.99 ± 0.01 aA	0.99 ± 0.00 aA	0,01
	B	0.99 ± 0.00 aA	0.99 ± 0.00 aA	0.98 ± 0.01 aA	0,02
	C	0.99 ± 0.00 aA	0.99 ± 0.00 aA	0.98 ± 0.00 aA	0,02
d.m.s. (5%)		0,00	0,01	0,02	

Média ± desvio padrão; Letras maiúsculas diferentes na horizontal indicam diferença significativa P<0,05 para variável estocagem; Letras minúsculas diferentes na vertical indicam diferença significativa P<0,05 para variável época.

d.m.s.: diferença mínima significativa, EST: extrato seco total, IEP: índice de extensão de proteólise, IPP: índice de profundidade de proteólise.