

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

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE QUEIJOS TIPO MINAS FRESCAL
ELABORADOS POR DIFERENTES PROCESSOS TECNOLÓGICOS E
COMERCIALIZADOS EM CAMPINAS - SP**

JULIANE DÖERING GASPARIN CARVALHO
Farmacêutica e Bioquímica – Habilitação Tecnologia de Alimentos

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
2003

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Ce53a Carvalho, Juliane Döering Gasparin
Avaliação da qualidade de queijos tipo minas frescal
elaborados por diferentes processos tecnológicos e
comercializados em Campinas – SP / Juliane Döering Gasparin
Carvalho. – Campinas, SP: [s.n.], 2003.

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

1.*Listeria monocytogenes*. 2.Coagulase. 3.Estafilococos.
4.Queijo – Qualidade. I.Kuaye, Arnaldo Yoshiteru.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia
de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye
(Orientador)

Prof. Dra. Walkiria Hanada Viotto
(Membro)

Dra. Maria Helena Castro Reis Passos
(Membro)

Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira
(Membro)

“De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho, fazer da queda um passo de dança, do sonho uma ponte e da procura um encontro... Fica o desejo de boa sorte... Fica a vontade que lutas e venças.”

Fernando Sabino.

Dedico esta vitória

*Aos meus amados pais, Luiz Daivo e
Maria Helena, meus primeiros educadores,
e a minha querida irmã Heloíza.*

*Ao meu querido marido,
Clodoaldo, companheiro de todos
os momentos, o meu imenso amor*

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e marcante presença no decorrer dela;

A minha família pelo amor, carinho e incentivo no decorrer da minha caminhada;

A meu marido Clodoaldo pela compreensão e pelas valiosas palavras de estímulo, apoio e orientação;

Ao Prof. Dr. Arnaldo Yoshiteru Kuaye pela amizade e orientação no desenvolvimento deste trabalho;

A Prof. Dra. Walkiria Hanada Viotto pela sugestão do tema deste trabalho e co-orientação no seu desenvolvimento;

A Dra. Maria Helena Castro Reis Passos por sua disponibilidade, e pelas correções e sugestões na redação desta dissertação;

A Dra. Valéria Christina Amstalden Junqueira pelas correções e sugestões na redação desta dissertação;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – pelo suporte financeiro;

Ao DTA-FEA-UNICAMP pela oportunidade de realização deste mestrado;

A Dirce Yorika Kabuki, técnica do Laboratório de Higiene pela disponibilidade, apoio e colaboração na realização deste trabalho;

A Beth, técnica do Laboratório de Leite, pela atenção;

A Jacinta R.O. Franco pelo carinho e auxílio no dia-a-dia.

A estagiária Maria Silvia Lemos e Silva pela amizade e auxílio prestado;

Aos amigos do Laboratório de Higiene: João Anderson, Celina, Cíntia, Ana Lúcia, Arlete, Ivan e Alessandra; pela força e pela agradável convivência.

A todos os colegas da Pós-Graduação.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para execução deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS	xvii
RESUMO	xxi
SUMMARY	xxiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 QUEIJO MINAS FRESCAL	5
2.2 TECNOLOGIAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL	6
2.2.1 Processamento com Cultura Lática (Tradicional)	7
2.2.2 Processamento de Acidificação Direta com Ácido Lático	9
2.2.3 Processamento por Ultrafiltração	10
2.2.3.a) Higienização da membrana ultrafiltrante	13
2.3 QUEIJO MINAS FRESCAL, LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E SAÚDE PÚBLICA	14
2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PATÓGENOS AVALIADOS NESTE TRABALHO	15
2.4.1 Coliformes Fecais (termotolerantes a 45° C)	15
2.4.2 Estafilococos Coagulase Positiva	16
2.4.3 <i>Salmonella</i> spp	18
2.4.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.5 OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS EM LEITE E SEUS DERIVADOS	22
2.6 OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS EM QUEIJOS	25

3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL	31
3.1.1 Amostras	31
3.1.2 Meios de cultura	31
3.1.2.a) Meios de Cultura para Determinação de Coliformes Termotolerantes (45° C)	31
3.1.2.b) Meios de Cultura para Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva	32
3.1.2.c) Meios de Cultura para Detecção de <i>Salmonella</i>	32
3.1.2.d) Meios de Cultura para Detecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3.2 EQUIPAMENTOS	33
3.3 MÉTODOS	34
3.3.1 Amostragem	34
3.3.2 Análises Microbiológicas	35
3.3.2.a) Determinação de Coliformes Termotolerantes (45° C)	35
3.3.2.b) Determinação de Estafilococos Coagulase Positiva	35
3.3.2.c) Detecção de <i>Salmonella</i>	36
3.3.2.d) Detecção de <i>Listeria</i>	36
3.3.3 Análises Físico-Químicas	37
3.3.3.a) Determinação do pH	37
3.3.3.b) Determinação da Acidez Titulável	37
3.3.3.c) Determinação da Atividade de Água - Aa	37
3.3.3.d) Determinação do Teor de Umidade – Extrato Seco Total	38
3.3.4. Análise Estatística	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS	39

4.1.1 Prazo de Validade das Amostras	39
4.1.2 Porte das Indústrias de Laticínios	45
4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	47
4.2.1 Determinação do pH e Acidez Titulável	47
4.2.2 Determinação da Atividade de Água	49
4.2.3 Determinação do Teor de Umidade – Extrato Seco Total	50
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	51
4.3.1 Determinação de Coliformes Termolerantes (45° C)	51
4.3.2 Determinação de Estafilococos Coagulase Positiva	54
4.3.3 Detecção de <i>Salmonella</i>	57
4.3.4 Detecção de <i>Listeria</i>	58
4.3.5 Adequação Geral aos Padrões Microbiológicos	61
5. CONCLUSÕES	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
APÊNDICE A	85
A.1. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS	85
APÊNDICE B	93
B.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	93
APÊNDICE C	101
C.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Processamentos utilizados na produção de queijo Minas Frescal.	7
Figura 2.2	Fabricação de queijo Minas Frescal pelo método tradicional (adaptado de Oliveira, 1986).	8
Figura 2.3	Fabricação de queijo Minas Frescal através de ultrafiltração - MMV (adaptado de Vieira <i>et al.</i> , 1984 e Kosikowski, 1986).	11
Figura 4.1	Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas por acidificação direta (AD).	41
Figura 4.2	Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas com adição de cultura láctica (CL).	41
Figura 4.3	Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas por ultrafiltração (UF).	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Incidência de <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras de leite cru em vários países	24
Tabela 2.2	Ocorrências de contaminação em humanos transmitida por queijos e seus respectivos patógenos causadores	25
Tabela 2.3	Ocorrência de <i>Listeria</i> spp em queijos macios	28
Tabela 4.1	Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por três diferentes processamentos	39
Tabela 4.2	Critério de classificação para o porte das indústrias de laticínios	46
Tabela 4.3	Distribuição das amostras de queijo Minas Frescal coletadas, em relação ao porte de suas indústrias produtoras.	46
Tabela 4.4	Características físico-químicas das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por diferentes processamentos	47
Tabela 4.5	Determinação de significância na comparação dos valores médios de pH (teste t) para os três diferentes processamentos	48
Tabela 4.6	Determinação de significância na comparação dos valores médios de acidez titulável (teste t) para os três diferentes processamentos.	49
Tabela 4.7	Determinação de significância na comparação das médias de umidade (teste t) para os três diferentes processamentos	50
Tabela 4.8	Adequação das amostras de queijo Minas Frescal à Resolução RDC 12 - ANVISA quanto ao Número Mais Provável de coliformes termotolerantes (45°)	51

Tabela 4.9	Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras acima do LMEL para coliformes termotolerantes (45° C).	53
Tabela 4.10	Adequação das amostras de queijo Minas Frescal à Resolução RDC 12 quanto à contagem de estafilococos coagulase positiva.	54
Tabela 4.11	Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras com estafilococos coagulase positiva acima do LMEL.	56
Tabela 4.12	Ocorrência do gênero <i>Listeria</i> , <i>L. monocytogenes</i> e <i>L. innocua</i> , em amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por diferentes processamentos	58
Tabela 4.13	Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras positivas para <i>Listeria</i> .	61
Tabela 4.14	Amostras de queijo Minas Frescal produzidos por diferentes alternativas tecnológicas em desacordo com a legislação brasileira.	62
Tabela 4.15	Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras em desacordo com a legislação brasileira.	63
Tabela A.1	Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas por Acidificação Direta	85
Tabela A.2	Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas com Cultura Lática	87
Tabela A.3	Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas por Ultrafiltração.	89

Tabela A.4	Caracterização do porte das indústrias produtoras dos queijos Minas Frescal avaliados nesta pesquisa	91
Tabela B.1	Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzidos por Acidificação Direta	93
Tabela B.2	Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzidos com adição de Cultura Lática	95
Tabela B.3	Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzidos por Ultrafiltração	97
Tabela C.1	Avaliação microbiológica de queijos Minas frescal obtidos por processamento de Acidificação Direta.	101
Tabela C.2	Avaliação microbiológica de queijos Minas frescal obtidos por processamento com adição de Cultura Lática.	103
Tabela C.3	Avaliação microbiológica de queijos Minas frescal produzidos pelo processamento de Ultrafiltração.	107

RESUMO

O queijo Minas Frescal é um produto obtido a partir da coagulação enzimática do leite pasteurizado. Diferentes procedimentos de fabricação têm sido adotados pelas indústrias de laticínios: o tradicional com adição de cultura lática (CL), a acidificação direta (AD) e a ultrafiltração (UF). Estes queijos apresentam pH e teor de umidade (>55 %) elevados, características que favorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas. A contaminação microbiana de queijos, aliada à grande oferta e ao consumo deste produto, representa um sério risco para a saúde pública. Este trabalho avaliou a influência de diferentes procedimentos de fabricação na qualidade microbiológica de queijos tipo Minas Frescal comercializados no varejo de Campinas. Foram analisadas 31 amostras de queijo Minas Frescal, de cada tipo de processamento, para determinação de: coliformes termotolerantes (45°C), estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*; conforme a Resolução – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001. As amostras também foram submetidas às determinações físico-químicas de pH, acidez titulável, atividade de água e umidade. Os resultados das análises microbiológicas demonstraram que o número de amostras acima do Limite Máximo Estabelecido pela Legislação - LMEL para coliformes termotolerantes (45° C) foi de 64,5 % para o processamento AD, 29 % para o CL e 9,7 % para o UF. Quanto ao estafilococos coagulase positiva, as amostras CL apresentaram maior percentagem de resultados acima do LMEL (12,9 %) em relação às amostras AD (9,7 %). Foi detectada *Listeria* spp em 7 amostras AD (22,6 %) e em 4 amostras CL (12,9 %), sendo *L. monocytogenes* identificada em 3 amostras (42,9 %) do processamento AD positivas para *Listeria* spp. Não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas e as amostras UF não apresentaram estafilococos coagulase positiva e *Listeria* spp. O maior número de amostras em desacordo com a legislação (71%) evidenciou a suscetibilidade do processamento AD em relação à contaminação por patógenos. A deficiência na qualidade microbiológica dos queijos Minas Frescal mostrou-se independente do porte da indústria produtora.

SUMMARY

The Minas Frescal cheese is a product obtained from the enzymatic coagulation of the pasteurized milk. Different processes have been used by dairy industry: the traditional with addition of latic culture (CL), direct acidification (AD) and ultrafiltration (UF). This cheese presents high pH and moisture content (>55 %), characteristics that allow the growth of pathogenic bacteria. The microbial contamination of cheeses, together with the great offer and the consumption of these cheeses, represent a serious risk for the public health. This work evaluated the influence of different cheese making processes on the microbial quality of Minas Frescal cheeses commercialized at Campinas market. Thirty one samples of cheese from each process were analyzed for the determination of Fecal coliforms (45° C), Coagulase-positive staphylococci, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*; according to the Resolution – RDC - nº12 from Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, January 2nd, 2001. The samples were also submitted to physical-chemical determinations of pH, titratable acidity, water activity and moisture content. The microbial results showed that the number of samples above the legal pattern - LMEL - for Fecal coliforms (45° C) was 64,5% for the AD processing, 29% for CL and 9,7% for UF. For the Coagulase-positive staphylococci, the CL samples presented larger percentage of positive results (12,9%) compared to the AD samples (9,7%). *Listeria* spp was detected in 7 AD samples (22,6 %) and 4 CL samples (12,9 %). *L. monocytogenes* was found in 3 (42,9%) of the positive AD samples for *Listeria* spp. *Salmonella* was not isolated in the analyzed samples. UF samples did not presented coagulase-positive staphylococci or *Listeria* spp. The larger number of AD samples in disagreement with the legislation (71%) showed the susceptibility of this process to the contamination by pathogens. The poor microbiological quality verified for the Minas Frescal cheese was independent of the size of the industry.

1. INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos de laticínios mais importantes do Brasil, sendo considerado o único queijo genuinamente nacional. Possui grande aceitação no mercado interno e sua tecnologia de produção, por ser bastante simples, atrai o interesse de indústrias de pequeno, médio e grande porte.

A procura dos consumidores por produtos alimentícios de qualidade e a necessidade das indústrias de laticínios em obter maior produtividade e lucratividade com seus produtos têm levado a utilização de diferentes tecnologias de processamento na fabricação de queijos.

Ao longo da evolução do queijo Minas Frescal, têm surgido diversas alternativas tecnológicas para o processamento deste queijo. Dentre estas, três alternativas ganharam importância devido ao seu largo emprego na indústria de laticínios; são elas: a tradicional, a de acidificação direta e a de ultrafiltração.

A mais antiga destas alternativas é a tradicional, onde o uso de fermento láctico fornece ao queijo a proteção promovida pelas bactérias lácticas. Na procura por um queijo que apresentasse menores alterações físico-químicas durante a sua vida de prateleira e maior rendimento, foi desenvolvido o processamento de acidificação direta, com a substituição da cultura láctica pelo ácido láctico industrial.

Mais recentemente, a ultrafiltração pelo método criado por Maubois, Mocquot e Vassal – MMV, baseada na tecnologia de membranas, trouxe maior rendimento e higiene suplementar para o produto, devido ao processamento em circuito fechado e à enformagem do queijo diretamente na embalagem de comercialização.

Os produtos derivados do leite, em especial os queijos, são considerados veículos comuns de patógenos de origem alimentar, pois constituem um meio apropriado para o desenvolvimento destes microrganismos. Os queijos frescos e

macios, em particular, fornecem excelentes condições de crescimento para patógenos e têm sido implicados com freqüência em surtos alimentares, citados pela literatura, em diversos países (Rudolf e Scherer, 2001).

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 a cura e apresenta baixa percentagem de sal. Estas características geram condições ainda mais favoráveis para o desenvolvimento de patógenos.

As bactérias patogênicas envolvidas em surtos alimentares veiculados por produtos lácteos em geral são a *Salmonella*, o *S. aureus* e a *L. monocytogenes*. Devido ao risco representado por estes microrganismos e das doenças causadas por eles através dos alimentos, a sua prevenção assume destacada relevância para a saúde pública. A legislação brasileira, através da Resolução RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), estabelece os padrões microbiológicos para estes microrganismos em queijos.

A contaminação de queijos por *L. monocytogenes*, em especial, tem adquirido importância crescente devido aos diversos surtos ocorridos, inclusive com vítimas fatais. Este microrganismo apresenta capacidade de multiplicação em temperaturas de refrigeração e, ao contrário dos outros microrganismos que causam apenas problemas gastrointestinais, a listeriose leva a infecções mais graves em indivíduos susceptíveis, constituindo uma ameaça à saúde pública.

Apesar da importância da ocorrência de *L. monocytogenes* em produtos lácteos, existem poucos estudos sobre a sua incidência em queijos produzidos no Brasil, disponíveis na literatura. O mesmo ocorre quando o assunto abrange a qualidade do Minas Frescal produzido através das três alternativas tecnológicas citadas.

No contexto apresentado, este trabalho tem como objetivo geral avaliar a influência das diferentes formas de processamento na qualidade de queijos tipo

Minas Frescal comercializados no varejo do município de Campinas – SP: utilização de cultura lática (tradicional), utilização de ácido láctico (acidificação direta) e ultrafiltração (método MMV). A qualidade dos queijos foi considerada sob os aspectos de qualidade microbiológica e características físico-químicas.

A qualidade microbiológica dos queijos Minas Frescal foi avaliada para os microrganismos: coliformes termotolerantes (45°C), estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*; de acordo com o que estabelece a legislação brasileira segundo a Resolução – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001.

As características físico-químicas foram avaliadas através das determinações de pH, acidez titulável, atividade de água e umidade dos queijos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO MINAS FRESCAL

Conforme o próprio nome sugere, o queijo Minas Frescal surgiu nas serras mineiras, na metade do século XVIII, onde o leite produzido pelos rebanhos passou a ser utilizado nas fazendas para a fabricação de queijo, destinado à alimentação dos exploradores de ouro. Apreciado desde então, este alimento logo passou a fazer parte da refeição dos brasileiros (Agridata, 2002).

Hoje, o Minas Frescal é definido como um produto fresco obtido do leite pasteurizado, integral ou parcialmente desnatado, através de coagulação enzimática. Possui elevado teor de umidade, massa crua, não curado, sendo levemente prensado ou não. Deve ser conservado sob refrigeração e consumido nos 15 primeiros dias após a sua fabricação (Peresi *et al.*, 2001). Sua consistência é macia, de untura manteigosa com crosta mal formada, de cor esbranquiçada e sua textura apresenta poucas e pequenas olhaduras mecânicas - cabeça de alfinete - Portaria nº 352 do Ministério da Agricultura, de 04 de setembro de 1997 (Brasil, 1997b).

A produção de queijo Minas Frescal, dos tipos industrial e artesanal¹, no Brasil se difundiu principalmente devido à simplicidade da tecnologia empregada na sua fabricação, não necessitando de maturação. Estas características possibilitaram um retorno rápido do investimento aos produtores e, conseqüentemente, custos menores para os consumidores (Oliveira, 1986; Oliveira *et al.*, 1998).

Sua produção passou a ser computada a partir de 1979, quando correspondia a 5,8 % (8.297 t) do total de queijos produzidos no Brasil (Van Dender, 1995). Oito anos depois, em 1987, esta produção havia mais do que

¹ O queijo Minas Frescal artesanal difere do industrializado por ser produzido a partir de leite cru, sem adição de fermento ou ácido láctico e por não sofrer inspeção sanitária de órgãos competentes.

triplicado (26.609 t), alcançando o terceiro lugar na produção nacional de queijos (Furtado, 1991). Já em 1993, a produção de Minas Frescal atingiu 30.248 t, mantendo a colocação anterior no ranking nacional (Datamark, 1993).

Um Levantamento feito por Oliveira *et al.* (1998) indicou que o Minas Frescal representava cerca de 40 % da produção nacional de queijos, e que a sua produção estava concentrada em indústrias de pequeno e médio porte, das regiões Sul e Sudeste do Brasil. Apesar de diversos estados brasileiros produzirem o Minas Frescal, o Estado de Minas Gerais é responsável por 50 % da produção nacional deste queijo, sob inspeção federal, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo - ABIQ em 1998 (FAPEMIG, 2000).

2.2 TECNOLOGIAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL

Partindo da produção artesanal nas fazendas leiteiras, a tecnologia de fabricação do queijo Minas Frescal tem evoluído continuamente, visando a melhoria da qualidade deste produto. A fabricação com leite pasteurizado, o uso de cloreto de cálcio e o emprego de fermento láctico, dentre outras providências, contribuíram para aumentar a vida de prateleira dos queijos e garantir segurança alimentar para os consumidores (Wolfschoon-Pombo *et al.*, 1978; Furtado *et al.*, 1980a). Os processamentos utilizados atualmente na fabricação do queijo Minas Frescal pelas indústrias de laticínios são relacionados na Figura 2.1.

A grande diversidade de processamentos utilizados na produção do Minas Frescal, os quais variam conforme a região, o estado ou, mais especificamente, a indústria de laticínios, é refletida nas variações dos parâmetros físico-químicos deste queijo (Oliveira *et al.*, 1998)

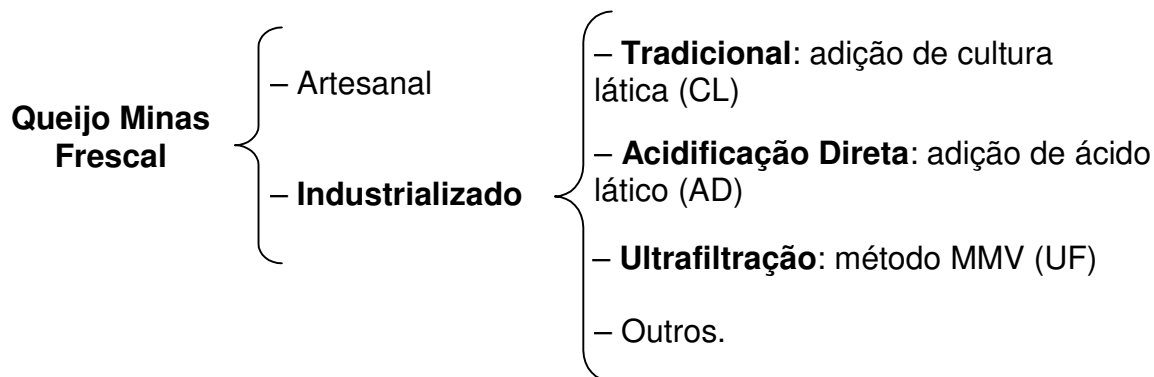


Figura 2.1 – Processamentos utilizados na produção de queijo Minas Frescal.

A literatura, de modo geral, cita uma composição variada para o queijo Minas Frescal logo após sua fabricação: 55-60 % de umidade, 1,4-1,6 % de sal (NaCl), 17-19 % de gordura e pH de 5,0-5,3 para queijos fabricados com fermento lático. No caso dos queijos fabricados com ácido lático, o pH varia entre 6,1-6,3 e a umidade, de 60-63 % (Wolfschoon-Pombo *et al.*, 1978, Furtado *et al.*, 1980a; Lourenço Neto, 1998).

2.2.1 Processamento com Cultura lática (Tradicional)

No método tradicional, o queijo tipo Minas Frescal é obtido por coagulação enzimática do leite pasteurizado com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada com a ação de bactérias ácido lácticas específicas. Na Figura 2.2, pode-se observar o fluxograma de fabricação do queijo Minas Frescal tradicional.

Segundo Fox *et al.* (2000), as bactérias ácido lácticas possuem grande importância na produção de queijos. Seu papel principal é a produção de ácido lático, que por sua vez tem função de melhorar a atividade do coagulante, auxiliar na expulsão do soro da coalhada, reduzindo então o conteúdo de umidade dos queijos, e promover a prevenção do crescimento de bactérias indesejáveis (deteriorantes e patogênicas). A produção do ácido lático ocorre através da

metabolização do principal açúcar do leite, a lactose, e é essencial para preservação do queijo (Ross *et al.*, 2000).

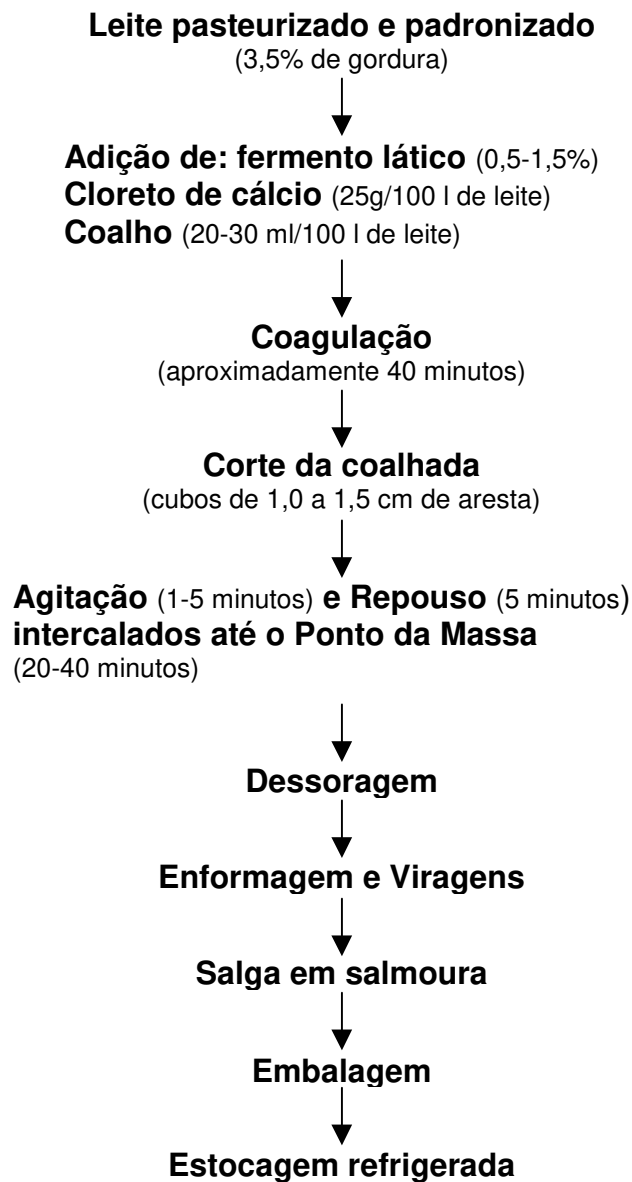


Figura 2.2 – Fabricação de queijo Minas Frescal pelo método tradicional (adaptado de Oliveira, 1986).

A contínua produção de ácido láctico no queijo Minas Frescal tradicional, no entanto, provoca alterações físico-químicas que acabam por reduzir a vida de prateleira do queijo. O aumento de acidez diminui a retenção de soro, formando uma crosta amarelada e amolecendo a textura do queijo com o passar do tempo (Furtado *et al.*, 1980a).

2.2.2 Processamento de Acidificação Direta com Ácido Láctico

Semelhante ao processamento tradicional, o queijo tipo Minas Frescal é obtido por coagulação enzimática, porém a acidificação é promovida pelo uso direto de ácido láctico no lugar de fermento láctico. O fluxograma para este processamento apresenta basicamente as mesmas etapas do processamento tradicional (Figura 2.2), diferindo apenas na adição de ingredientes.

Estudos realizados por Wolfschoon-Pombo *et al.* (1978) visando a substituição do fermento láctico mesofílico homofermentativo, à base de *Lactococcus lactis ssp lactis* e *Lactococcus latiss ssp cremoris*, pelo uso de ácido láctico industrial, resultaram em melhorias na durabilidade e no rendimento do queijo.

Comparando os processamentos tradicional e por acidificação direta, Furtado *et al.* (1980b) apontaram o segundo como mais vantajoso, pois o rendimento obtido foi maior, a firmeza foi mantida por maior tempo, o sabor manteve-se menos ácido e a retenção de umidade foi considerada excelente (61,10 %). Da mesma forma, Campos *et al.* (1971) e Van Dender e Moreno (1992) obtiveram aumento da umidade e redução de acidez do queijo.

O aumento no teor de umidade do queijo é responsável pelo aumento de rendimento quando se utiliza ácido láctico, já que uma 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 fabricado com o uso de acidificação direta apresenta ainda menores alterações na estocagem que os queijos fabricados tradicionalmente com

o fermento láctico (Furtado *et al.*, 1980a; Van Dender e Moreno, 1992). Em contrapartida às vantagens apresentadas pelo método, Dornellas (1997) e Naldini (2002) constataram que o produto obtido com a acidificação direta foi mais susceptível às contaminações microbianas, devido ao pH final mais elevado e as bactérias ácido lácticas não estarem presentes para competir com outros microrganismos.

2.2.3 Processamento por Ultrafiltração

A ultrafiltração é a tecnologia de membranas mais difundida e utilizada, fornecendo uma nova forma de concentrar solutos de alto peso molecular presentes em solução sem aplicação de calor e sem o uso de condições químicas ou físicas severas. Para as proteínas, isto significa concentração sem qualquer modificação importante de sua estrutura e funcionalidade. Na indústria láctea, a ultrafiltração se implantou no início da década de 70, sendo que a maioria das pesquisas e estudos publicados sobre este assunto têm se dirigido para esta área (Viotto, 1993). Em laticínios, sua maior aplicação ocorre no fracionamento de soro para a produção de concentrados protéicos de soro e na fabricação de uma enorme variedade de queijos por grandes indústrias de muitos países (Maubois, 1991; Viotto, 1993).

Na ultrafiltração do leite, a membrana retém 100 % da gordura, 94-100 % de componentes protéicos, vitamina B12 e ácido fólico. A água e componentes solúveis como a lactose, sais e algumas vitaminas hidrossolúveis atravessam a membrana ultrafiltrante, sendo concentrados apenas parcialmente de acordo com a retenção de umidade (Maubois e Mocquot, 1975; Beaton, 1979; Green *et al.*, 1984). A porção protéica é formada pela retenção da lactoalbumina e lactoglobulina junto a caseína, o que contribui significativamente para o rendimento do queijo (Kosikowski, 1986; El Gazzar e Marth, 1991).

O queijo Minas Frescal produzido por ultrafiltração utiliza o método proposto por Maubois, Mocquot e Vassal, denominado MMV. Este método tem como

principal característica o uso direto do retentado² obtido na ultrafiltração do leite para produção de queijos. Neste processo, o dessoramento do coágulo, difícil de ser controlado no processo tradicional, passa a ser feito no próprio leite antes da coagulação, reduzindo assim as perdas e a quantidade de ingredientes a serem adicionados (Maubois & Mocquot, 1975). O fluxograma da fabricação do queijo Minas Frescal pelo processo de ultrafiltração MMV pode ser observado na Figura 2.3.

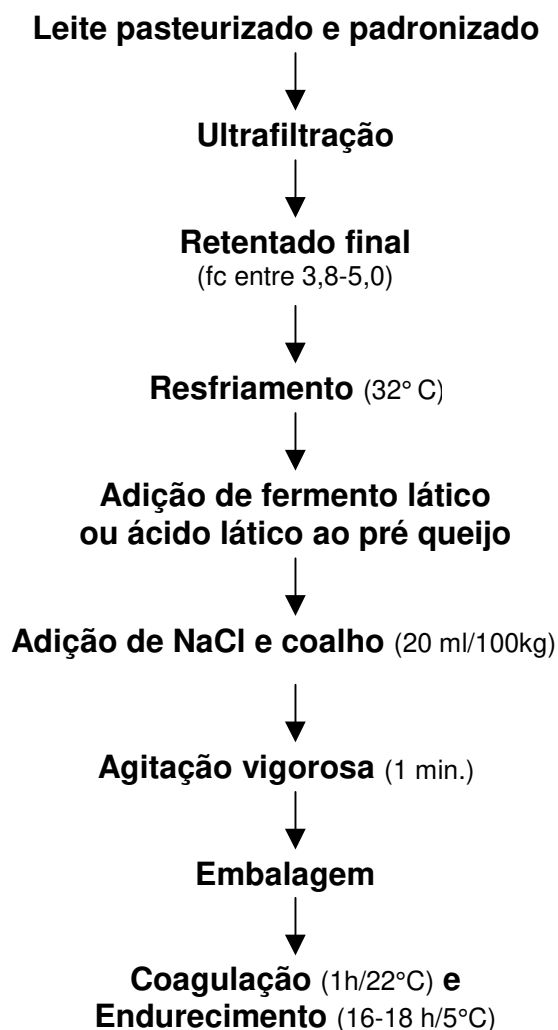


Figura 2.3 – Fabricação de queijo Minas Frescal através de ultrafiltração - MMV (adaptado de Vieira *et al.*, 1984 e Kosikowski, 1986).

² Concentrado de proteína e gordura pela redução do volume aquoso do leite.

O retentado pode ser concentrado a um fator de concentração próximo de 4, possibilitando a utilização de 1/5 da quantidade de coalho necessário no processamento tradicional (Kosikowski 1986). Van Dender (1995) conseguiu, através da ultrafiltração pelo método MMV, um rendimento médio de 11,85 %, a partir de uma quantidade fixa de leite, além de uma economia de aproximadamente 85 % de coalho e 81 % de fermento láctico.

O produto tem tido boa aceitação no mercado, porém é considerado bem diferente do produto tradicional, principalmente com relação ao sabor e à consistência (Vieira *et al.*, 1984). No Brasil são fabricadas atualmente duas variedades comerciais de queijo Minas Frescal pelo método MMV, uma integral e outra *light* em relação ao teor de gordura (Van Dender, 1995). As indústrias, na tentativa de tornar o produto mais atraente, já estão também adicionando corantes e essências que imitam outros queijos, como o Cheddar.

Vieira *et al.* (1984), ao prepararem queijos Minas Frescal diretamente na embalagem utilizando o processo de ultrafiltração, mostraram que além das vantagens econômicas obtidas devido ao alto rendimento, a enformagem do queijo diretamente na embalagem de comercialização garante higiene suplementar, eliminando os riscos de contaminação associados à manipulação e aumentando a vida útil do produto em relação aos queijos Minas Frescal produzidos por outros métodos. Por outro lado, havendo contaminação da matéria-prima ou problemas na pasteurização do leite, os microrganismos também serão concentrados.

Beaton (1979), Renner e Abd El-Salam (1991) afirmaram que o grau de contaminação do retentado é determinado principalmente pela qualidade da matéria-prima, pelo fator de concentração, pela temperatura do processo, pelo tempo de residência e pelas condições higiênicas dos equipamentos de ultrafiltração.

O uso de temperaturas entre 50-60° C resulta em fluxos mais elevados de permeado³, o que reduz o tempo de residência no equipamento e evita o crescimento de microrganismos mesófilos durante o processamento (Beaton, 1979).

2.2.3.a) Higienização da membrana ultrafiltrante

Durante a operação de ultrafiltração, um filme composto de gordura, proteína, células bacterianas e matéria inorgânica, é formado. Para a remoção deste filme, o sistema de membranas é submetido ao procedimento *Cleaning in Place* – CIP – à alta velocidade e dura em média 1-2 horas (Beaton, 1979).

Uma limpeza eficiente, primeiramente elimina os resíduos do produto, pouco aderidos, com bastante água e em seguida, detergentes alcalinos a base de hidróxido de sódio (0,1 – 0,5 %) são aplicados para a remoção de resíduos orgânicos como proteínas e gorduras. Os ácidos nítrico e fosfórico são utilizados para a remoção de compostos minerais que se precipitam dentro dos poros da membrana, como os sais de cálcio. Os compostos de cloro (100 – 200 mg/l) são utilizados como sanitizantes e agentes de dilatação dos poros da membrana, promovendo arraste do material alojado dentro dos poros. Proteases, lipases ou detergentes enzimáticos são utilizados muitas vezes para suplementar ou substituir os detergentes alcalinos (Beaton, 1979; Giesi, 1991).

De modo geral, é conveniente que a higienização do equipamento seja feita imediatamente antes e logo após o processo de ultrafiltração a fim de restabelecer o fluxo inicial e garantir a qualidade bacteriológica da membrana (Beaton, 1979). No caso de operação contínua durante todo o dia, uma higienização periódica da membrana deve ser feita a cada 6-18 h, dependendo da produção, da concentração e da temperatura de trabalho (Beaton, 1979).

³ Material que passa pela membrana ultrafiltrante.

2.3 QUEIJO MINAS FRESCAL, LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E SAÚDE PÚBLICA

A grande oferta e o consumo de queijos dos mais variados tipos, aliada à ocorrência comum de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp e *Salmonella* spp, em derivados lácteos, fizeram com que a contaminação microbiana de queijos assumisse uma relevância destacada para a saúde pública.

Neste cenário, a contaminação dos queijos Minas Frescal assume importância destacada, sendo considerada pela Vigilância Sanitária um problema emergente que exige maior atenção por parte dos órgãos oficiais, principalmente no que concerne ao controle higiênico-sanitário do produto (Pinto *et al.*, 1996)

No Brasil, a legislação específica vem sendo atualizada ao longo dos anos. A última alteração ocorreu com a aprovação da Resolução – RDC nº.12, de 2 de janeiro de 2001, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (Brasil, 2001), em substituição à Portaria SVS/MS 451, de 19 de setembro de 1997 (Brasil, 1997a). Os limites estabelecidos pela legislação anterior para coliformes termotolerantes (45° C) e estafilococos coagulase positiva, $m=10$ e $M=10^2$, em queijo de muito alta umidade (55 %) com bactérias lácticas em forma viável e abundantes, incluindo o Minas Frescal, foram modificados para $m=10^3$, $M=5 \times 10^3$ para coliformes a 45°C e $m=10^2$, $M=10^3$ para estafilococos coagulase positiva.

A Resolução – RDC nº12 (Brasil, 2001) prevê ainda uma menor tolerância para coliformes termotolerantes a 45°C ($m=5 \times 10$ e $M=5 \times 10^2$) e para estafilococos coagulase positiva ($m=10^2$ e $M=5 \times 10^2$), em queijos fabricados somente com ácido láctico, pois estes não possuem a proteção conferida pelo uso do fermento láctico.

Silva e Castro (1995) avaliaram um surto provocado por queijo Minas, ocorrido na cidade de Contagem – MG, onde 14 das 15 pessoas expostas ao produto contaminado (93,3%) adoeceram. A análise do queijo fabricado artesanalmente a partir de leite cru revelou a presença de *Salmonella* do grupo D, *S. aureus* (10^5 UFC/g) e coliformes fecais em número superior a $1,1 \times 10^5$ NMP/g.

Diante das pesquisas realizadas e do período de incubação apresentado pelas pessoas expostas, foi concluída a ocorrência de infecção por *Salmonella* do grupo D associada à intoxicação estafilocócica.

Dias *et al.* (1995) analisaram 21 surtos provocados principalmente por queijo Minas Frescal, ocorridos em diferentes cidades mineiras entre os anos de 1992 e 1994, e notificados ao Serviço de Vigilância Sanitária. Das 239 pessoas expostas ao alimento, 218 (91,3 %) apresentaram sintomatologia característica de intoxicação estafilocócica e 49 (20,5 %) foram hospitalizadas. Do total de surtos notificados, 13 (61,90 %) apresentaram coliformes fecais com contagens entre 10^3 e 10^5 NMP/g e 18 (85,7 %) revelaram a presença *S. aureus* entre 10^5 e 10^9 UFC/g do produto.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DOS PATÓGENOS AVALIADOS NESTE TRABALHO

2.4.1 Coliformes Fecais (termotolerantes a 45° C)

Os coliformes fecais são membros da família *Enterobacteriaceae* e incluem os bastonetes curtos aeróbios e anaeróbios facultativos, Gram-negativos, catalase positiva e oxidase negativa que fermentam lactose a 45° C. O grupo dos coliformes fecais é composto principalmente pela *Escherichia coli*, mas algumas espécies de *Enterobacter* e *Klebsiella* podem produzir ácido e gás a partir da lactose e outros carboidratos sem produzir H₂S (ICMSF, 1998; Holt *et al.*, 2000).

Estes microrganismos fazem parte da flora normal do intestino de animais de sangue quente e, portanto, a sua presença nos alimentos constitui um indicador de contaminação fecal (Peresi *et al.*, 2001). A *E. coli* produz enterotoxinas e/ ou outros fatores de virulência, incluindo fatores invasivos e de colonização que causam doenças diarreicas.

O grupo dos coliformes fecais ainda é encontrado na água, no solo, nas plantas e nos alimentos, principalmente nos produtos de origem animal e nos

manipulados por pessoas. Uma vez que suas células são sensíveis a altas temperaturas, sua presença em produtos pasteurizados, como o leite, ou cozidos representa contaminação após o tratamento térmico. A sobrevivência destes microrganismos em baixas temperaturas depende da espécie e do substrato (ICMSF, 1998).

A contaminação por coliformes fecais pode ser originada de uma sanitização imprópria das superfícies e equipamentos de uma planta de processamento. Neste caso, sua presença reflete a qualidade da sanitização e não a poluição direta do produto (Banwart, 1989).

Os coliformes são responsáveis pelo desenvolvimento de estufamento precoce em queijos, caracterizado pela produção de gás H₂ em 1 a 2 dias após a sua fabricação. Estes microrganismos podem ser inibidos pelo aumento na concentração de sal, dentre outros fatores (Fox *et al.*, 2000). De acordo com os resultados de Gabutti *et al.* (2000), os coliformes fecais são os microrganismos mais sensíveis ao sal.

2.4.2 Estafilococos Coagula se Positiva

As bactérias do gênero *Staphylococcus* se apresentam na forma de células esféricas, de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro que aparecem em pares, cadeias curtas ou em cadeias irregulares na forma de cacho de uva. Estes microrganismos são Gram-positivos, anaeróbicos facultativos com maior crescimento em condições aeróbicas, catalase positiva e oxidase negativa, e não possuem motilidade. Geralmente crescem em 10 % de sal a 37° C e são os únicos microrganismos a crescerem em valores de atividade de água inferiores aos considerados como mínimos para bactérias não halofílicas (FDA, 1998; Holt *et al.*, 2000).

A espécie mais importante deste gênero, ligada aos alimentos, é a *S. aureus*, distinguida das demais espécies através dos testes de coagulase (coagulação do plasma sangüíneo) e termonuclease (estabilidade térmica da nuclease). Nenhum destes testes, entretanto, é absolutamente específico para o

S. aureus. O *S. hyicus* é freqüentemente coagulase positiva e pode ser facilmente confundido com o primeiro, no isolamento. A diferenciação entre ambos é realizada através de testes bioquímicos adicionais (ICMSF, 1998).

O *S. aureus* é muito resistente a temperaturas de congelamento, sobrevivendo em alimentos estocados até -20°C . Ele não resiste a temperaturas de pasteurização, porém é capaz de produzir toxinas altamente estáveis ao aquecimento (ICMSF, 1998). Tucan e Martin (1990) constataram que o efeito protetor do sal sobre *S. aureus* era maior a temperaturas mais baixas.

A ingestão de alimento contaminado com menos de $1,0\text{ }\mu\text{g}$ de toxina pode produzir sintomas de intoxicação estafilocócica. Esta quantidade de toxina é produzida pelo *S. aureus* em um meio com atividade de água igual ou superior a 0,86 e excede uma população de 10^5 UFC/g (FDA, 1998).

Os sintomas iniciais de uma intoxicação estafilocócica são rápidos (2-4 h após ingestão do alimento) e agudos na maioria dos casos. Eles dependem da suscetibilidade individual à toxina, das quantidades de alimento consumido e de toxina ingerida com o alimento, e do estado de saúde da vítima. Os sintomas mais comuns são náuseas, vômitos, dores abdominais e prostração, freqüentemente seguidos de diarreia. Nos casos mais severos, dores de cabeça, calafrios e queda de pressão arterial podem ser observados, sendo rara a ocorrência de febre. A recuperação é rápida, geralmente dentro de dois dias (ICMSF, 1998).

A primeira associação do estafilococos com intoxicação alimentar foi feita por Vaughan e Sternbergem que, em 1884, descreveram um surto causado pela ingestão de queijo contaminado, em Michigan (ICMSF, 1998). Além do leite e seus derivados, outros produtos como carnes, frangos, ovos e saladas contendo ovos, produtos de confeitaria e alimentos que sofrem considerável manuseio durante sua preparação, mantidos em temperatura ambiente, estão freqüentemente envolvidos em intoxicações estafilocócicas. (FDA, 1998).

A distribuição do *S. aureus* é ubíqua, sendo o microrganismo encontrado no ar, poeira, água e superfícies de ambientes e equipamentos. Os humanos

(cavidade nasal, cavidade orofaríngea, cabelo, pele e ferimentos) e os animais (principalmente o rebanho mastítico) constituem os reservatórios primários deste agente patogênico, motivo pelo qual os manipuladores de alimentos são a principal fonte de contaminação alimentar (ICMSF, 1998).

2.4.3 *Salmonella* spp

O gênero *Salmonella*, também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é extremamente heterogêneo, compreendendo quase 2000 sorotipos, dos quais somente poucos são patogênicos ao homem. Ele é composto por bactérias Gram-negativas, com forma de bastonete curto, geralmente móveis, intracelulares facultativas, anaeróbias facultativas, não esporuladas, que fermentam glicose, mas não lactose e sacarose, geralmente produzindo ácido, gás e H₂S. São oxidase negativa, catalase e lisina descaboxilase positivas, sendo que não hidrolisam a uréia. A temperatura considerada ótima para o crescimento destes microrganismos é de 37° C (FDA, 1998; Holt *et al.*, 2000; Kaufmann *et al.*, 2001).

Esta bactéria é comumente encontrada no trato intestinal de animais, especialmente em aves e suínos. As fontes ambientais deste microrganismo incluem a água, o solo, os insetos, as superfícies de cozinhas e indústrias, as fezes animais e as carnes, aves e frutos do mar crus. Outros alimentos associados à *Salmonella* são ovos, leite e seus derivados, coco, molhos, saladas, misturas para bolo, sobremesas recheadas com creme, gelatina em pó, manteiga de amendoim e chocolate (FDA, 1998; Holt *et al.*, 2000).

Com relação à patogenicidade em humanos, as espécies de *Salmonella* são divididas, de acordo com Kaufmann *et al.* (2001) em: causadoras de septicemia e produtoras da febre tifóide (*S. typhi* e espécies correlatas), causadoras de gastroenterites (a maioria das espécies de *Salmonella*, como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*) e causadoras de uma doença invasiva (*S. choleraesuis*).

O mecanismo de patogenicidade se desenvolve pela penetração e passagem da *Salmonella* do lúmen intestinal para dentro do epitélio que reveste a parede intestinal, onde ocorre inflamação. O tempo de incubação é de 6-48 horas, seguido pelo início dos sintomas agudos, como náusea, vômito, cãibra abdominal, diarreia, febre e dor de cabeça. Algumas consequências crônicas, como sintomas de artrite, podem persistir por 3-4 semanas após o início dos sintomas agudos (ICMSF, 1998).

A dose infectiva pode ser de poucas células (15-20), dependendo da idade, saúde do hospedeiro e da espécie envolvida. Todas as pessoas são suscetíveis a infecção causada por *Salmonella*, porém os sintomas podem ser mais severos em crianças, idosos e imunodeprimidos (Kaufmann *et al.*, 2001).

Embora a análise microbiológica de queijos industrializados raramente resulte no isolamento de *Salmonella*, este microrganismo pode crescer durante a fabricação e sobreviver em vários queijos por mais que 60 dias (ICMSF, 2000).

2.4.4 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é constituído por bactérias em forma de bastonetes Gram positivos, não produtores de esporos ou de cápsulas (Seelinger e Jones, 1986; Holt *et al.*, 2000). Estes microrganismos são anaeróbios facultativos, catalase positivo, oxidase negativo, não produtores de gás, móveis a 25°C e imóveis a 35°C (Farber e Peterkin, 1991). Não hidrolizam uréia, gelatina e caseína, mas hidrolizam a esculina e o hipurato de sódio (Seelinger e Jones, 1986). Proliferam a uma faixa de temperatura de -0,4 a 50°C (Farber e Peterkin, 1991) com crescimento ótimo entre 30-37°C (Seelinger e Jones, 1986), em uma faixa de pH variando de 5,5-9,8 (Brakcett, 1988) e toleram altas concentrações de cloreto de sódio (Farber e Peterkin, 1991).

O gênero *Listeria* está dividido em sete espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* (*L. murrayi*), *L. ivanovii* subsp. *ivanovii*

e *L. ivanovii* subsp *londoniensis*. A classificação antiga incluía *L. denitrificans*, que foi reclassificada como *Jonesia denitrificans*, considerava *L. grayi* e *L. murrayi* como espécies distintas e não subdividia a *L. ivanovii*. A *L. innocua* e a *L. grayi* são consideradas não patogênicas, enquanto *L. seeligeri*, *L. ivanovii* e *L. welshimeri* raramente causam infecções em humanos (ICMSF, 1998). Segundo Almeida *et al.* (1999), a *L. monocytogenes* é patogênica para o homem e para diversos animais, enquanto que a *L. ivanovii* é patogênica apenas para os animais.

A *Listeria monocytogenes* é comumente encontrada no ambiente, na superfície de solos, em vegetais apodrecidos, detritos, insetos, fertilizantes, silagem, nas fezes de ruminantes e do homem, em efluentes de abatedouros, na superfície das águas, inclusive rios (Brackett, 1988; ICMSF, 1998; Ryser e Marth, 1999).

Embora a *L. monocytogenes* tenha sido ocasionalmente encontrada em alimentos no passado, ela já foi determinada como patógeno causador de surtos alimentares. A primeira evidência de transmissão de *Listeria* por alimento foi descrita por Schlech *et al.* (1983) que relatou um surto de listeriose associado ao consumo de salada de repolho cru no Canadá, em 1981. O repolho havia sido contaminado com o uso de adubo a base de esterco de ovinos, infectado por *L. monocytogenes*.

Listerioses têm sido ligadas ao consumo de frutas e vegetais, frutos do mar (Baek *et al.*, 2000), produtos cárneos, frango (Kabuki, 1997), produtos lácteos (Brackett, 1988; Farber *et al.*, 1989; Destro *et al.*, 1991; McLauchlin, 1996; Saltijeral *et al.*, 1999; Rudolf e Scherer 2001), alimentos refrigerados, particularmente os derivados do leite e sobremesas (Farber e Peterkin, 1991), alimentos frescos e processados prontos para consumo (Loguercio *et al.*, 2001).

Este microrganismo sobrevive oito semanas em 20% de NaCl a 4°C, devido às suas características osmotolerante e criotolerante, constituindo uma ameaça à saúde pública e às indústrias alimentícias, onde a salga e a refrigeração são comumente empregadas na preservação de alimentos (Baek *et al.*, 2000). Linton

et al. (1996) observou a diminuição da influência do sal na resistência térmica de *L. monocytogenes* com o aumento da temperatura de 56 a 62° C e 50 a 60° C. Passos (2000) verificou que a adição de 1,5 % de sal a carne aumentou a resistência térmica da *L. monocytogenes* 1,7 vezes a 55° C e 1,5 vezes a 60° C. Da mesma forma, Passos e Kuaye (2002) verificaram que a adição de 1,5 % de sal em hambúrguer protegeu a célula bacteriana contra a destruição térmica.

Sob condições normais, qualquer pessoa pode ser infectada por *L. monocytogenes*, contudo, a maioria dos indivíduos são assintomáticos. A parcela da população infectada que desenvolverá doença e sofrerá risco de vida é constituída por mulheres grávidas, neonatos, bebês, idosos e indivíduos imunodeprimidos, como aidéticos, pacientes com leucemia ou outra neoplasia que requeira químico ou radioterapia, pacientes submetidos a tratamentos prolongados a base de corticóides ou drogas citotóxicas e indivíduos transplantados ou que necessitem de hemodiálise. Estes indivíduos poderão desenvolver septicemia, encefalite, meningite, aborto espontâneo e morte (Rocourt, 1996; Ireton e Cossart, 1997; Almeida *et al.*, 1999; Saltijeral *et al.*, 1999); ocasionalmente podem ocorrer também endocardite, peritonite e hepatite (Baek *et al.*, 2000).

MacLauchlin (1996) citou casos de listeriose ocorridos no Reino Unido e em diversos outros lugares do mundo. Em alguns destes casos, veterinários foram contaminados por contato direto com animais infectados e sofreram lesões cutâneas caracterizadas pela formação de granulomas e necrose local, ou por supuração no tecido infectado. Em outros casos, o microrganismo foi transmitido por alimentos, dentre os quais se encontravam queijos.

A dose necessária para que uma infecção causada por *L. monocytogenes* se manifeste ainda permanece obscura. Esta dose varia de indivíduo para indivíduo (Farber e Peterkin, 1991).

Após a ingestão do alimento contaminado, a *L. monocytogenes* é capaz de cruzar a barreira intestinal, multiplicar-se e difundir-se para outros órgãos, tais como o fígado e baço, onde forma granulomas (Ireton e Cossart, 1997).

2.5 OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS EM LEITE E SEUS DERIVADOS

Os produtos lácteos têm merecido destaque como veículo de transmissão de doenças alimentares comumente relacionadas a surtos. Contaminações por *S. aureus*, *Salmonella* spp e *L. monocytogenes* são encontradas nos leites cru e pasteurizado, e nos seus produtos derivados (De Buyser *et al.*, 2001).

Nos Estados Unidos, em 1985, ocorreu o maior surto de salmonelose já notificado. Este surto envolveu 16.000 casos confirmados em seis estados, decorrentes da ingestão de leite integral e desnatado de uma indústria de laticínios de Chicago. Modificações no pasteurizador para acelerar a passagem do leite cru resultaram em uma pasteurização inadequada (FDA, 1998).

Na França, foram relatados 69 surtos ocasionados por leite e seus derivados. O total de 48 % destes surtos foram veiculados por alimentos produzidos a partir de leite cru e, em 51 % dos casos, o tipo de leite não foi especificado. O *S. aureus* foi o agente etiológico mais freqüente associado com estes surtos, seguido pela *Salmonella* (De Buyser *et al.*, 2001).

Na Finlândia, Maijala *et al.* (2001) relataram um surto de listeriose relacionado ao consumo de manteiga contaminada que acometeu pacientes de 10 hospitais, a maioria dos casos ocorreram em pacientes do Hospital Central da Universidade de Helsinque.

No Brasil, Feniman *et al.* (2002) avaliaram 15 amostras de leite pasteurizado tipo “C”, de três marcas diferentes, comercializadas no município de Medianeira – PR. Apenas uma amostra apresentou níveis de coliformes termotolerantes a 45° C acima do limite estabelecido pela Resolução – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Nesta amostra também foi detectado a presença de *Salmonella*.

Raimundo *et al.* (2002) analisaram 4 amostras de ricotas comercializadas no município de Alfenas – MG e verificaram que 3 destas amostras estavam em desacordo com a Resolução – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância

Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001, quanto a coliformes totais e fecais (Brasil, 2001).

Lovett *et al.* (1987) encontraram uma incidência de *L. monocytogenes* em leite cru na faixa de 0-7 %. Fernández-Garayzábal *et al.* (1986) encontraram mais de 21 % das amostras de leite pasteurizado de uma indústria de laticínios de Madri contaminadas por *L. monocytogenes*. Vázquez-Salinas *et al.* (2001) encontraram em um total de 1300 amostras de leite cru (México), 23 % de amostras positivas para *Listeria* spp, sendo 13 % de *L. monocytogenes*.

Catão e Ceballos (2001) avaliaram a presença de *Listeria* spp, coliformes fecais e *E. coli* em leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, em Campina Grande – PB. Foi observado que 33 (73,3 %) das amostras de leite cru e 9 (30 %) das de leite pasteurizado estavam contaminadas com *Listeria* spp, sendo identificadas *L. monocytogenes* em 17 (51,5 %) amostras de leite cru e em 9 (100 %) de leite beneficiado (4 recém-pasteurizadas e 5 ensacadas). Todas as amostras de leite pasteurizado, analisadas no 1º período do estudo, estiveram fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação para coliformes fecais.

A principal razão para contaminação do leite cru pode ser a alimentação dos animais com silagem contaminada (Kozak *et al.*, 1996). Já a presença de *Listeria* spp e outros patógenos de baixa resistência térmica, em leite pasteurizado é decorrente de uma pasteurização inadequada ou contaminação pós-processamento (Baek *et al.*, 2000; Loguercio *et al.*, 2001). A ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru têm sido relatada em diferentes países, conforme observado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Incidência de *Listeria monocytogenes* em amostras de leite cru em vários países

Localização	Nº de mostras	Nº de amostras positivas (%)		Referência
		<i>Listeria monocytogenes</i>	Outras	
Alemanha	635	2 (0,3)	ND ^a	*
Brasil	220	21 (9,5)	ND	Moura <i>et al.</i> (1993)
Canadá	315	17 (5,4)	27 (8,5)	*
Coréia	45	2 (4,4)	ND	Baek <i>et al.</i> (2000)
Escócia	560	14 (2,5)	8 (1,5)	*
França	1409	85 (6,0)	ND	*
França	337	14 (4,2)	5 (1,5)	*
Grã Bretanha	350	13 (3,7)	ND	*
Holanda	137	6 (4,4)	ND	*
Hungria	50	2 (4,0)	ND	*
Irlanda	50	4 (8,0)	ND	*
Marrocos	30	3 (10,0)	ND	Marrakchi <i>et al.</i> (1993)
Nova Zelândia	71	0	18 (25,4)	*
Estados Unidos				
Califórnia	200	14 (7,0)	19 (9,5)	*
MA/Vermont	939	15 (1,6)	ND	*
Nebraska	200	8 (4,0)	10 (5,0)	*
Ohio/Kentucky	350	13 (3,7)	36 (10,3)	*
Pensilvania	511	79 (3,1)	ND	*
Vermont	450	17 (3,8)	26 (5,8)	About-Eleinin <i>et al.</i> (2000)

^a– Não Determinada.* Kozak *et al.* (1996).

2.6 OCORRÊNCIA DE PATÓGENOS EM QUEIJOS

De Buyser *et al.* (2001) ao escrever uma revisão sobre a implicação do leite e seus derivados em doenças transmitidas por alimentos na França e em diferentes países industrializados, considerou a *Salmonella* spp, o *S. aureus*, a *L. monocytogenes* e a *E. coli* como as quatro bactérias mais perigosas para segurança alimentar em queijos. Na Tabela 2.2, são observados os casos de doenças transmitidas por alimentos provocadas por estes patógenos em vários países, envolvendo queijos produzidos a partir de leite cru, pasteurizado e não especificado.

Tabela 2.2 – Ocorrências de contaminação em humanos transmitida por queijos e seus respectivos patógenos causadores.

Ano	Nº de casos	Tipo de queijo (País)	Tipo de leite	Patógeno
1984	27	Artesanal de leite de ovelha (Escócia)	Cru	<i>S. aureus</i>
1988	155	Stilton (Inglaterra)	PI	<i>S. aureus</i>
1994	7	NE (Brasil)	NE	<i>S. aureus</i>
1981	>100	Mozzarella (Itália)	NE	<i>Salmonella</i>
1984	>1700	Cheddar	PI	<i>Salmonella</i>
1989	42	macio (Inglaterra)	PI	<i>Salmonella</i>
1995	25	Mont d' Or (França)	Cru	<i>Salmonella</i>
1985	142	macio estilo Mexicano (EUA)	Pasteurizado	<i>L. monocytogenes</i>
1989	2	Camembert (Luxemburgo)	NE	<i>L. monocytogenes</i>
1997	14	Pont-L'évêquê (França)	Cru	<i>L. monocytogenes</i>
1983	69	Brie (Holanda)	Pasteurizado	<i>E. coli</i>
1994	22	Artesanal (Escócia)	Cru	<i>E. coli</i>

PI – Pasteurização Inadequada
NE – Não Especificado

Fonte: Modificada de De Buyser *et al.* (2001)

No Brasil, Mandil *et al.* (1982) constataram que 67 % das amostras de queijos Minas Frescal do município de Belo Horizonte – MG, estavam contaminadas com *S. aureus* em níveis variando entre 10 a 10⁶ UFC/g. Sabioni e

Maia (1998) constataram contagens elevadas de *S. aureus* ($> 10^6$ UFC/g) em 70 % das amostras analisadas de queijo Minas Frescal de fabricação artesanal. Hoffmann *et al.* (2002) verificaram que 100 % e 80 % das 10 amostras do mesmo queijo, vendido em feiras livres na região de São José do Rio Preto – SP, apresentavam contagem de *S. aureus* acima de 10^4 UFC/g e *Salmonella*, respectivamente. Estas amostras estavam também contaminadas por *E. coli*.

Peresi *et al.* (2001) analisaram 30 amostras de queijo minas Frescal artesanal comercializadas em feiras livres de São José do Rio Preto e 30 amostras industrializadas, coletadas em supermercados. Os resultados microbiológicos revelaram 23,3 % das amostras industrializadas e 76,6 % das amostras artesanais em desacordo com os padrões previstos na legislação. Foi observado em 43 % das amostras artesanais um número elevado ($> 2,4 \times 10^3$ /g) de coliformes fecais. O estafilococos coagulase positiva foi encontrado em 60 % das amostras artesanais e em apenas uma amostra industrial (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. Em 6,7 % das amostras artesanais detectou-se *Salmonella*.

Almeida Filho *et al.* (2002) determinaram o perfil microbiológico de 30 amostras de queijo Minas Frescal, 15 de produção artesanal e 15 inspecionadas. Do total de amostras analisadas, 4 (13,3 %) estavam acima do limite máximo para coliformes fecais exigido pela Portaria nº 01 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL, de 28 de janeiro de 1987 (Brasil, 1987).

O Programa de Análise fiscal – Programa Paulista 2002 – instituído pelo Centro de Vigilância Sanitária em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz, analisou 123 amostras de queijo Minas Frescal, das quais, 35 (28,5 %) não estavam em conformidade com os padrões microbiológicos para coliformes totais, coliformes fecais e *S. aureus*. Conforme este programa, o queijo Minas Frescal foi inserido na categoria de produtos que apresentam maiores riscos de causarem doenças transmitidas por alimentos (São Paulo, 2003).

Estudando a qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado na Paraíba à temperatura ambiente ou sob refrigeração, Leite Jr. *et al.* (2000) encontraram 9,7 % das 31 amostras suspeitas para *S. aureus* com resultado positivo para coagulase. Coliformes totais e fecais tiveram valores médios superiores a 10^3 NMP/g. Florentino e Martins (1999) detectaram uma média de $7,8 \times 10^5$ UFC/g de *S. aureus* e presença de *Salmonella* em 30 % das amostras do mesmo queijo produzido no mesmo estado. Das colônias isoladas de *S. aureus*, 75 % apresentaram coagulase positiva. Sena *et al.* (1999) também detectaram a presença de *Salmonella* em 8,4 % das amostras deste queijo, analisadas em Recife.

Varnam e Sutherland (1994) citaram surtos de salmonelose envolvendo o queijo Vacherin Mont'Or, um queijo macio, e doenças transmitidas por alimentos causadas pelo queijo Brie contaminado por *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. botulinum*. Vários surtos de salmonelose, ligados ao consumo de queijos contaminados, têm sido atribuídos ao controle deficiente durante o processamento do queijo ou ao uso de leite contaminado (ICMSF, 2000).

De Luca *et al.* (1997) detectaram *S. aureus* em 22 das 135 (16,3 %) amostras de queijos analisados na região de Bologna: 8,3 % em queijos macios, 17,6 % em queijos Blue, 18,9 % em queijos semi-duros e 25 % em queijo tipo Mozzarella.

Incidentes envolvendo produtos lácteos levaram o Food and Drug Administration – FDA a implementar uma série de programas de prevenção à *Listeria*. Como resultado destes programas, este patógeno foi descoberto em muitas variedades de queijos produzidos e importados nos Estados Unidos (Kozak *et al.*, 1996).

Queijos tipo mexicano contaminados por *L. monocytogenes* foram responsáveis por um surto de listeriose em 1985 na Califórnia. Os equipamentos e o ambiente de produção destes queijos estavam altamente contaminados por *L. monocytogenes* (ICMSF, 2000). Já em 2000-2001, um surto nos EUA foi

associado ao consumo do mesmo tipo de queijo, porém de fabricação caseira, onde se utilizou leite contaminado; 121 pessoas foram acometidas, com 11 mortos, 5 abortos, 3 partos prematuros, 2 recém-nascidos infectados e um adulto com meningite (USDA, 2001).

Farber *et al.* (1987) analisaram 374 amostras de queijos dos macios e semi duros, oriundas de 14 países, para verificar a presença de *Listeria* spp. Somente 3 das 104 amostras francesas apresentaram contaminação. Quanto às demais, nenhuma apresentou resultado positivo.

Pini e Gilbert (1988) avaliaram a ocorrência de *Listeria* em 222 amostras de queijos macios do Reino Unido e outros países europeus, encontrando contaminação por *L. monocytogenes* e *L. innocua* de acordo com a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Ocorrência de *Listeria* spp em queijos macios.

País de Origem	Amostras Examinadas	Amostras Positivas (%)	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>
França	85	12 (14)	9 (11)
Reino Unido	45	2 (4)	2 (4)
Itália	44	7 (16)	7 (16)
Chipre	20	2 (10)	0
Alemanha	17	0	0
Dinamarca	06	0	1 (17)
Líbano	05	0	0
Total	222	23 (10)	19 (9)

Fonte: Pini e Gilbert (1988)

Ryser e Marth (1999) citaram uma maior incidência de *L. monocytogenes* em queijos macios e curados com fungos, do que em queijos duros. Estes queijos foram provenientes da França, Itália, Dinamarca, Chipre, Espanha, Suíça e Oeste

da Alemanha. Os queijos curados com fungos têm pH elevado devido ao metabolismo do lactato pelos fungos, que aliado ao alto conteúdo de umidade, os torna extremamente suscetíveis a contaminações na superfície durante o processo de cura.

Rudolf e Scherer (2001) examinaram 329 amostras de queijos dos tipos macios, semi-duros e duro, de diferentes países europeus. Doze de um total de 192 amostras do tipo macios (6,3 %), 7 de 92 amostras do tipo semi duros (7,6 %) e 2 de 45 amostras do tipo duro (4,4 %) continham *Listeria monocytogenes*. O microrganismo foi isolado em 13 (8 %) das 163 amostras preparadas com leite pasteurizado, e em 8 (4,8 %) das 166 amostras preparadas com leite cru.

Erkmen (2000) comparou a inativação da *L. monocytogenes* em queijo Feta produzido a partir de leite com e sem fermento láctico, e observou uma maior redução na taxa de crescimento do microrganismo nas amostras com fermento láctico. Ainda assim, a bactéria sobreviveu mais de 90 dias em ambos os casos, com as amostras mantidas a uma temperatura de 4 ° C.

Morgan *et al.* (2001) pesquisaram 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. O patógeno foi inoculado em concentrações de 10 a 10² UFC/ml. Houve diminuição na contagem de *L. monocytogenes* devido provavelmente ao efeito do baixo pH e à atividade do fermento láctico. Entretanto, as condições desfavoráveis não foram suficientes para induzir o completo desaparecimento do microrganismo. Na concentração de 10 UFC/ml, a bactéria foi encontrada na superfície do produto até 7 dias após a sua fabricação e, no seu interior até 42 dias depois da mesma data. Para a inoculação de 10² UFC/ml, os resultados para a *Listeria* foram positivos até 42 dias após a sua fabricação, tanto na superfície quanto no seu interior.

Farber *et al.* (1987) relataram uma inspeção feita no processamento, manuseio e estocagem de queijos em 30 plantas industriais para verificar a aplicação das boas práticas de fabricação (BPF) e sanitização. A estocagem do

leite e de outros ingredientes crus foi considerada abaixo do padrão em oito casos, onde a *Listeria*, se presente, pode multiplicar-se durante a estocagem devido ao controle inadequado de temperatura. Cinco plantas, todas em Ontário – Canadá, necessitavam urgentemente de melhorias para a redução do risco de contaminação por *Listeria*.

Devido à severidade das infecções produzidas, vários países têm adotado uma política severa para controle de *L. monocytogenes*, concentrando a atenção das autoridades públicas e pesquisadores sobre este patógeno. No entanto, o seu controle é difícil devido principalmente à sua ampla distribuição, natureza psicrófila e tolerância a muitos agentes preservativos (Almeida *et al.*, 1999; Saltijeral *et al.*, 1999; Loguercio *et al.*, 2001).

O Food Safety and Inspection Service – FSIS do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2001) organizou uma lista com precauções que vão desde medidas utilizadas para evitar a contaminação e a recontaminação de alimentos até os alimentos que devem ser evitados por pessoas mais suscetíveis aos riscos causados por listeriose, como: gestantes, idosos, crianças e os imunocomprometidos. Dentre os alimentos a serem evitados por estas pessoas estão os queijos de massa macia como Feta, Brie, Camembert, queijos Blue-veined, queijos não pasteurizados, queijos estilo Mexicanos e queijos frescos como o queso Blanco, semelhante ao Minas Frescal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras

Foi utilizado neste trabalho um total de 93 amostras de queijo Minas Frescal, elaboradas a partir de diferentes processamentos: adição de cultura lática (fermento lático), acidificação direta com ácido lático e ultrafiltração (MMV). As amostras foram analisadas para determinação dos seguintes microrganismos: coliformes termotolerantes (45°C), estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*; conforme estabelece a legislação brasileira segundo a Resolução – RDC nº12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, de 2 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001). Para cada processamento, foram adquiridas amostras de diferentes marcas comerciais no varejo do município de Campinas – SP, no período de setembro de 2001 a setembro de 2002. Das amostras adquiridas, 92 possuíam registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e portavam numeração do Serviço de Inspeção Federal – SIF. Somente uma das amostras possuía numeração do Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo – SISP, por ser registrada na Secretaria da Agricultura deste estado. As amostras coletadas foram acondicionadas em caixa isotérmica, contendo gelo e transportadas para o Laboratório de Higiene da FEA – UNICAMP, onde foram analisadas.

3.1.2 Meios de cultura

3.1.2.a) Meios de Cultura para Determinação de Coliformes Termotolerantes (45° C):

- Solução de citrato de sódio a 2 % (Merck);
- Solução peptonada a 0,1 % (Peptona bacteriológica, Difco);

- Caldo Lauryl Sulfato Tryptose (Merck) - LST;
- Caldo Escherichia Coli (Merck) – EC.

3.1.2.b) Meios de Cultura para Contagem de Estafilococos Coagulase Positiva:

- Solução de citrato de sódio a 2 % (Merck);
- Solução peptonada a 0,1 % (Peptona bacteriológica, Difco);
- Ágar Baird-Parker (Difco) suplementado com 25 g/l de emulsão de gema de ovo e 0,1 g/l de telurito de potássio - BP;
- Ágar Brain Heart Infusion (Difco) – BHI ágar;
- Caldo Brain Heart Infusion (Difco) BHI caldo;
- Reagentes para coloração de Gram: cristal violeta, lugol e safranina;
- Solução de peróxido de hidrogênio a 3 %;
- Solução salina a 0,85 %;
- Plasma de coelho com EDTA (BBL™) para teste de coagulase.

3.1.2.c) Meios de Cultura para Detecção de *Salmonella*

- Água Peptonada Tamponada (Merck) - BPW;
- Caldo Tetrathionate (Difco), suplementado com 10 mg/l de solução verde brilhante e 20 ml/l de solução de iodo - TT;
- Caldo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid) - RV;
- Ágar Hektoen enteric (Oxoid) - HE;
- Ágar Xylose Lysine Desoxycholate (Difco) - XLD;
- Ágar Bismuto Sulfito (Difco) - BS;
- Ágar Lisina e Ferro (Difco) - LIA;
- Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (Difco) - TSI;
- Caldo Urease (BBL);
- Kit rápido para identificação de enterobactérias (BBL Crystal™ RS/E - Rapid Stool/ Enteric ID kit).

3.1.2.d) Meios de Cultura para Detecção de *Listeria monocytogenes*:

- Caldo de Enriquecimento para *Listeria* (Oxoid – formulação UVM), suplementado com 20 mg/l de ácido nalidíxico (Sigma) e 12 mg/l de acriflavina (Inlab) – LEB;
- Caldo Fraser Modificado (Caldo de Enriquecimento para *Listeria* da Oxoid - formulação UVM), suplementado com 3 g/l de cloreto de lítio (Merck), 20 mg/l de ácido nalidíxico (Sigma), 25 mg/l de acriflavina (Inlab) e 0,5 g/l de citrato férrico amoniacal (Sigma) – MFB;
- Ágar Cloreto de Lítio Feniletanol Moxalactam (Difco), suplementado com 20 mg/l de moxalactam (Sigma) – LPM;
- Ágar Oxford Modificado (Ágar Oxford da Oxoid), suplementado com 10 mg/l de colistina (Sigma) e 20 mg/l de moxalactam (Sigma) – MOX;
- Ágar Triptona de Soja (Oxoid), suplementado com 6 mg/l de extrato de levedura (Biobrás) - TSAYE;
- Meio SIM (Biobrás);
- Caldo Base de Púrpura Bromocresol, acrescido de manitol e ramnose (Difco) e xilose (Merck);
- Ágar Triptona de Soja (Oxoid), com 7 % de sangue desfibrinado de cavalo (Biotério Boa Vista);
- Solução de peróxido de hidrogênio a 3 %, para teste da catalase;
- Solução salina fisiológica (Merck), 0,85 %;
- Reagentes para coloração de Gram: cristal violeta, lugol e safranina.

3.2 EQUIPAMENTOS

- Agitador de tubos (Phoenix, modelo AP 56);
- Balança analítica (Mettler Toledo, modelo AB 204);
- Balança analítica (Mettler, modelo AE 200);
- Balança semi-analítica (Sartorius, modelo U3600);
- Balança semi-analítica (Micronal, modelo B400);
- Banho com aquecimento (Fanem, patente 32683);

- Banho com aquecimento (Fanem, modelo 100);
- Banho com aquecimento e agitação (Cole Parmer, modelo Polystat);
- Capela de fluxo laminar vertical (Veco, modelo VLFS-12);
- Capela de fluxo laminar vertical (Canadian Cabinets, modelo V4-MW-97-T);
- Contador de colônias (Phoenix, modelo CP600);
- Estufa incubadora para BOD (Fanem, modelo 347 CD);
- Estufa incubadora para BOD (Fanem, modelo 347 CD);
- Estufa incubadora para BOD (Marconi, modelo MA 415);
- Estufa de secagem (Fanem, modelo 315 SE);
- Aparelho para medir atividade de água (Aqualab, Decagon, modelo CX – 2), com banho (Brookfield, modelo TC 500);
- Homogeneizador de pistões – *Stomacher* – (Seaward Medical, modelo Lab Blender 400);
- Microscópio estereoscópico (Carl Zeiss, modelo 4752), com iluminador, (Scott, modelo KL 1500);
- Microscópio biológico triocular (Carl Zeiss, modelo Jenaval);
- Potenciômetro (Micronal, modelo B 374);
- Densimat (Biomérieux, modelo 4120);
- Outros equipamentos de uso comum em laboratório de microbiologia.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Amostragem

O procedimento de amostragem foi iniciado com a anotação dos dados referentes à procedência, marca, número do SIF ou SISP, ingredientes (que define se o processamento utiliza fermento láctico ou ácido láctico), a data de fabricação e o prazo (data) de validade dos queijos avaliados. As amostras de queijo Minas Frescal foram retiradas de sua embalagem, após prévia desinfecção com álcool 70 %, sob condições assépticas, na capela de fluxo laminar. Cada uma das amostras foi dividida em oito porções, sendo quatro delas retiradas de forma

alternada para posterior realização das determinações físico-químicas. As quatro porções restantes de cada queijo foram subdivididas aleatoriamente a fim de se obter 25 g da amostra, pesadas em balança semi analítica, para serem homogeneizadas em um homogeneizador de pistões com os diluentes específicos para cada microrganismo investigado. Na avaliação de coliformes termotolerantes e estafilococos foi utilizado o mesmo diluente: 225 ml de solução de citrato de sódio a 2 % para 25 g das amostras, que após serem homogeneizadas foram diluídas em série, em solução peptonada a 0,1 %.

3.3.2 Análises Microbiológicas

3.3.2.a) Determinação de Coliformes Termotolerantes (45°C):

A contagem deste microrganismo foi realizada através da técnica do Número Mais Provável – NMP – de três tubos da Food and Drug Administration (Hitchins *et al.*, 1998) inoculando-se as diluições da amostra em caldo LST. As culturas dos tubos com resultado presuntivo positivo no caldo LST (contendo gás), após 24 e 48 h de incubação a 35°C, foram transferidas para o caldo EC e incubados a 45°C para a confirmação da presença de coliformes termotolerantes.

3.3.2.b) Determinação de Estafilococos Coagulase Positiva:

A contagem e identificação do estafilococos foi realizada conforme a metodologia recomendada pelo Food and Drug Administration (Bennett e Lancette, 1998). As diluições da amostra foram semeadas na superfície de ágar BP e as placas foram incubadas a 35°C por 48 h. Posteriormente, procedeu-se uma contagem presuntiva das Unidades Formadoras de Colônias – UFC. As colônias típicas de *S. aureus* são circulares, com bordas perfeitas, pequenas (máximo 1,5 mm de diâmetro), pretas brilhantes, convexas, rodeadas por uma zona opaca e freqüentemente com halo claro que estende-se além da zona opaca. Cinco colônias suspeitas foram selecionadas e transferidas para caldo e ágar BHI,

e incubados a 35°C por 24 h para confirmação, através da caracterização morfológica por coloração Gram e dos testes bioquímicos de catalase e coagulase.

3.3.2.c) Detecção de *Salmonella*:

Cada unidade de 25 g de amostra foi homogeneizada com 225 ml de BPW em “*Stomacher*”, e incubada a 35°C/24 h. As etapas seguintes foram realizadas seguindo a metodologia do Food and Drug Administration (Andrews e Hammack, 1998). Porções de 0,1 e 1,0 ml de BPW foram transferidos para 10 ml de caldo RV e 10 ml de caldo TT, respectivamente. O caldo RV foi incubado a 42°C e o TT a 43°C. Após a incubação, ambos os caldos seletivos foram semeados em ágar HE, ágar BS e ágar XLD. Estas placas foram incubadas a 35 °C/ 24 h. Duas ou mais colônias típicas foram isoladas de cada placa de ágar HE (colônias verde azuladas, com ou sem centro negro), de BS (colônias pretas, cinzas ou marrons) e de XLD (colônias róseo escuro, com ou sem centro preto), sendo transferidas para o TSI e LIA, os quais foram incubados a 35 °C/ 24 h. As reações características de *Salmonella* no TSI, LIA e caldo uréia indicaram as culturas suspeitas que foram mantidas em ágar BHI até a realização da sua identificação com o auxílio do kit de identificação rápido BBL Crystal™ RS/E – Rapid Stool / Enteric ID System – para bactérias aeróbias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae*.

3.3.2.d) Detecção de *Listeria*:

A determinação deste microrganismo foi realizada de acordo com o método preconizado por Pagotto *et al.* (2001). Cada unidade de 25 g de amostra foi homogeneizada com 225 ml de caldo LEB em “*Stomacher*” e incubada a 30°C. Após 24 h e 48 h de incubação, 0,1 ml do caldo LEB foi inoculado em 10 ml de caldo MFB, que, por sua vez, foi incubado a 35°C/ 24 - 48 h. O caldo LEB após a incubação de 48 h e, tanto os tubos positivos de MFB (coloração escura) quanto os tubos negativos (sem escurecimento), foram semeados por estrias em placas

contendo ágar LPM e MOX. As placas de LPM e MOX foram incubadas a 30°C e a 35°C durante 48 h, respectivamente. Cinco colônias típicas de cada placa de LPM (colônias azul esverdeado sob luz transmitida) e de MOX (colônias pretas com halo escuro) foram purificadas e mantidas em TSAYE até sua identificação. A identificação foi realizada através de caracterização morfológica pela coloração de Gram, e bioquímica pelos testes de produção da catalase, β -hemólise em ágar sangue de cavalo, motilidade a 25° C em meio SIM e produção de ácido a partir da utilização da ramnose, manitol e xilose.

3.3.3 Análises Físico Químicas

As porções retiradas das amostras do queijo Minas Frescal, de forma alternada, foram trituradas em almofariz e submetidas às análises de atividade de água, pH, acidez titulável e extrato seco total, no mesmo dia em que foram iniciadas as análises microbiológicas. As primeiras nove amostras de cada processamento foram avaliadas em duplicata, sendo que as demais foram avaliadas em triplicata.

3.3.3.a) Determinação do pH:

O pH foi determinado empregando-se potenciômetro devidamente calibrado com as soluções padrão de pH 7,0 e 4,0.

3.3.3.b) Determinação da Acidez Titulável:

A acidez foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N seguindo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists – AOAC – adaptada por Yun e Barbano (1995).

3.3.3.c) Determinação da Atividade de água – Aa:

A atividade de água foi determinada através do aparelho Aqualab, que foi previamente calibrado com sais saturados de K₂SO₄ ou NaCl.

3.3.3.d) Determinação do Teor de Umidade – Extrato Seco total

A determinação do extrato seco total foi realizada pelo método gravimétrico em estufa a 105°C por 16 h até peso constante, de acordo com o procedimento descrito na seção 33.2.09 da AOAC (1997).

3.3.4 Análise Estatística

Os resultados das análises físico-químicas receberam tratamento estatístico através do teste T (Student) para a determinação dos intervalos de confiança para as médias, com nível de confiança de 95 %. O mesmo teste foi também utilizado para a comparação das médias (teste de hipóteses) entre os processamentos analisados, com nível de significância de 5 %.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS

Das 93 amostras de queijo Minas Frescal analisadas, 31 correspondiam ao processamento com acidificação direta (AD), 31 com cultura láctica – fermento láctico – (CL) e 31 com ultrafiltração – MMV – (UF), segundo os dizeres da rotulagem.

A Tabela 4.1 apresenta o número de amostras avaliadas para cada processamento, com as respectivas quantidades de marcas encontradas e os prazos de validade. Não obstante o cuidado de envolver o maior número de marcas possível para cada processamento, foi observada no comércio varejista de Campinas, dentre os estabelecimentos aonde as amostras foram coletadas, uma maior variedade de marcas disponíveis para os queijos Minas Frescal CL, enquanto os queijos UF apresentaram a menor variedade.

Tabela 4.1 – Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por três diferentes processamentos.

Processamento	Nº. de Amostras	Nº. de Marcas	Prazo de Validade (dias)		
			mínimo	máximo	média
AD	31	10	15	63	33
CL	31	14	17	61	25
UF	31	5	25	45	33

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

4.1.1 Prazo de Validade das Amostras

Os prazos de validade das amostras apresentaram uma faixa de variação bastante ampla (Tabela 4.1), refletindo o fato destes prazos serem determinados pelas indústrias produtoras, segundo critérios baseados nas alterações das

características físico-químicas dos queijos, uma vez que não há um prazo de validade padrão definido pela legislação brasileira.

Observando os prazos de cada amostra individualmente, foi verificado que as amostras AD (Figura 4.1) e UF (Figura 4.3) possuíam validade média em torno de 33 dias, enquanto as amostras CL (Figura 4.2) apresentaram validade média de 25 dias. Na maioria dos casos, os prazos de validade observados estavam acima da durabilidade média reportada na literatura. Furtado e Lourenço Neto (1994) atribuíram ao queijo Minas Frescal uma durabilidade média de 10 dias devido seu alto teor de umidade e conseqüente alta perecibilidade. Dornellas (1997) concluiu em seu trabalho que o limite de vida útil aceitável para o queijo CL seria de 16 dias.

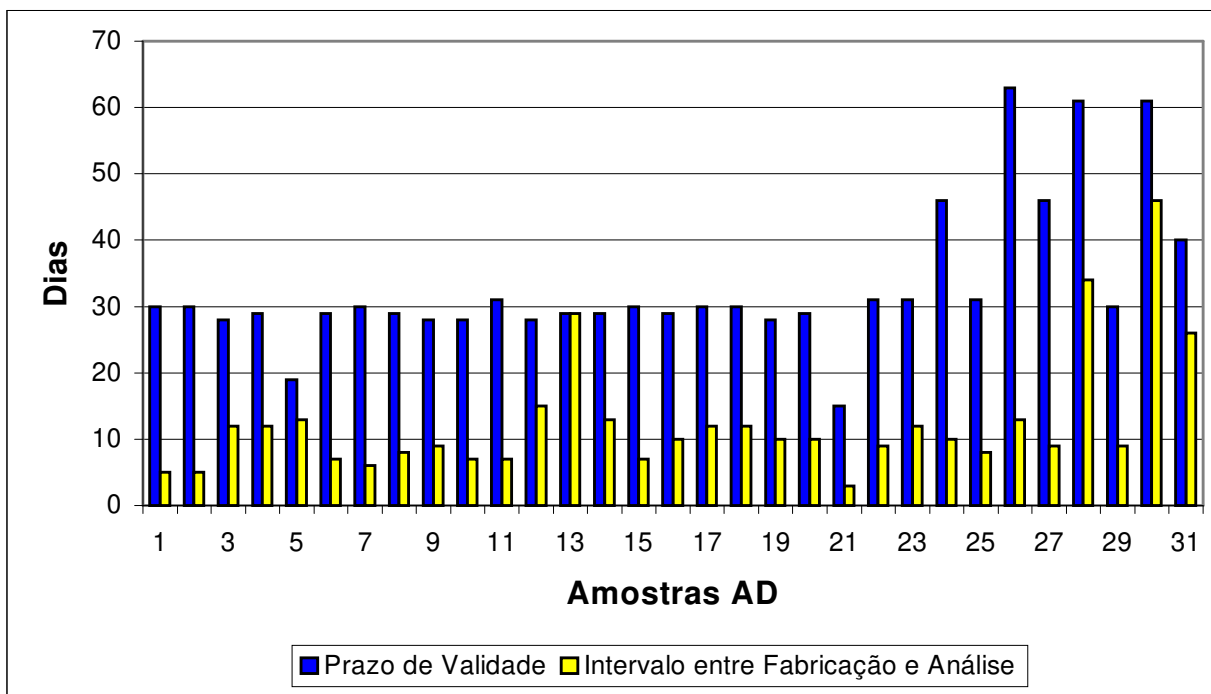


Figura 4.1 – Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas por acidificação direta (AD).

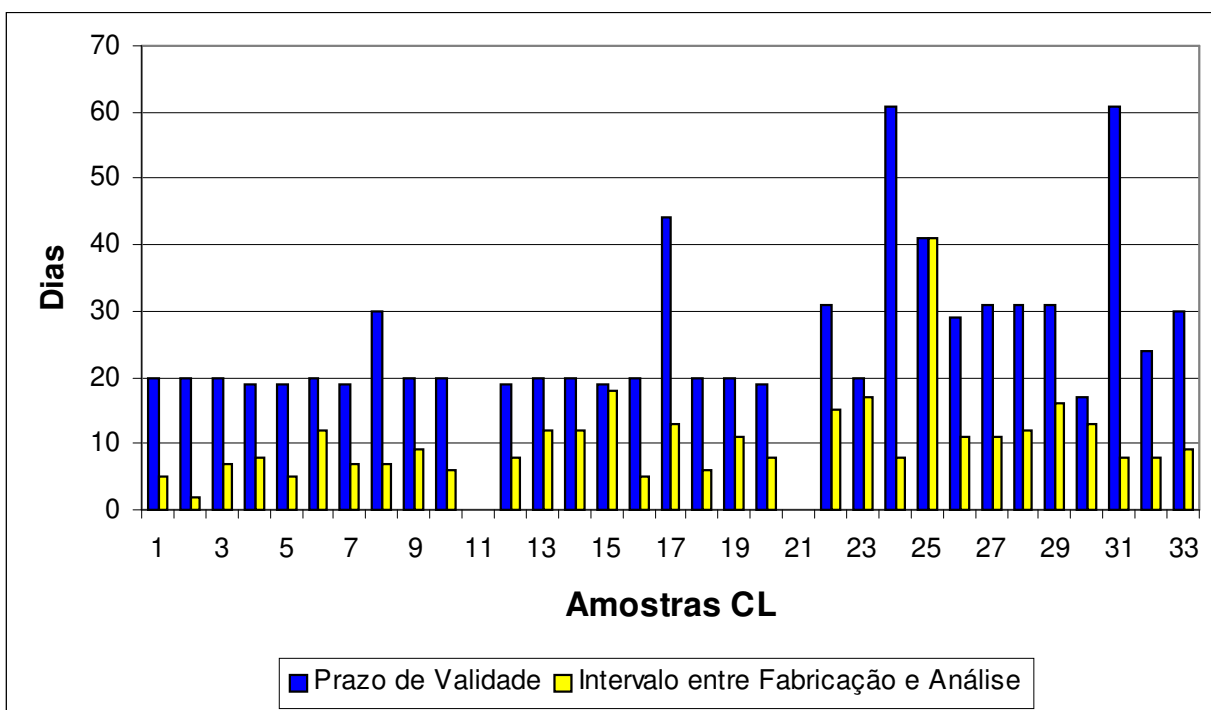


Figura 4.2 – Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas com adição de cultura láctica (CL).

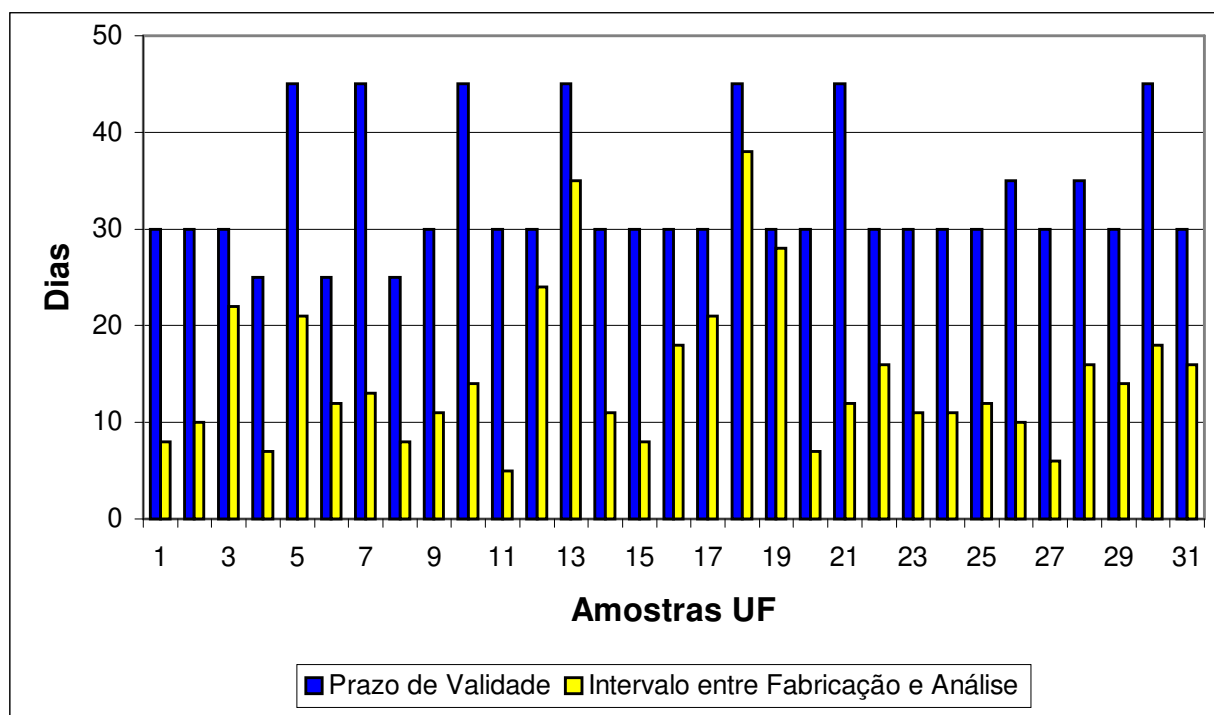


Figura 4.3 – Representação gráfica do prazo de validade e intervalo de tempo entre a fabricação e análise das amostras produzidas por ultrafiltração (UF).

A vida de prateleira do queijo Minas Frescal é definida pelas alterações microbiológicas e físico-químicas que este sofre durante sua estocagem sob refrigeração. O queijo Minas Frescal AD mantém a firmeza por maior tempo, com sabor menos ácido e maior retenção do soro, o que resulta em maior prazo de validade. Já, o queijo Minas Frescal tradicional (CL) possui bactérias ácido lácticas que continuam a produzir ácido lático pela metabolização da lactose, aumentando a acidez, o que aumenta a dessoragem, formando uma crosta amarelada e mais mole com o passar do tempo. Estas características acabam por reduzir a vida de prateleira deste queijo.

Naldini (2002) comparou as características visuais dos queijos AD e CL após 15 dias de armazenamento sob refrigeração a 5° C e observou que este último apresentava a sua forma física toda alterada, com um misto de massa disforme e soro, enquanto o primeiro mantinha sua estrutura física sem grandes modificações na textura.

As amostras de queijo Minas Frescal UF, apesar de possuírem maior conteúdo de umidade, apresentaram validade média (33 dias) igual às das amostras AD e superior à validade média das CL (25 dias). Por ser realizado em sistema fechado, com coagulação diretamente na embalagem de comercialização, os riscos de contaminação associados à manipulação são reduzidos no processamento UF, garantindo higiene suplementar ao produto.

Ao comparar as alterações físico-químicas e vida de prateleira do queijo Minas Frescal tradicional (CL) e o queijo UF produzido pelo método MMV, com 1, 7 e 14 dias de fabricação, Van Dender *et al.* (1998) afirmaram que este último manteve características próprias de sabor e textura até 14 dias sob refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), apresentando menor acidificação e menor taxa de proteólise em relação ao queijo tradicional.

No presente trabalho, os intervalos médios entre a fabricação e a análise das amostras AD, CL e UF foram de 13, 10 e 15 dias, respectivamente. De maneira geral, os intervalos estiveram dentro do limite de vida útil indicado na literatura para os três processamentos.

A Resolução 16 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNPA, de 24 de abril de 1978 (Brasil, 1978), considera o queijo Minas Frescal (produto perecível) como apto para o consumo no prazo de alguns dias a várias semanas, se este for conservado em temperatura de refrigeração ao redor de 4°C e não superior a 6°C . A temperatura de manutenção deste produto pode aumentar ou diminuir seu prazo de validade.

4.1.2 Porte das Indústrias de Laticínios

As informações sobre o porte das indústrias produtoras dos queijos analisados foram obtidas por contato pessoal, junto ao Serviço de Inspeção de Produtos de Origem Animal – SIPA – dos estados de São Paulo e Goiás, às Representações Regionais da Delegacia Federal de Agricultura do Estado de Minas Gerais ou diretamente com as indústrias produtoras.

As indústrias foram classificadas pelas fontes citadas como sendo de pequeno, médio e grande porte. A classificação foi realizada segundo o volume de leite recebido diariamente pela indústria, segundo os critérios indicados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Critério de classificação para o porte das indústrias de laticínios.

Porte da Indústria	Volume de leite recebido
	(litro/dia)
Pequeno	até 10.000
Médio	de 10.000 até 100.000
Grande	acima de 100.000

Com base nesta classificação, as amostras de cada processamento foram divididas de acordo com o porte de suas respectivas indústrias produtoras, conforme mostrado na Tabela 4.3. Foi observado que a metade das amostras AD vieram de indústrias de médio porte, enquanto o restante ficou igualmente distribuído entre as demais classes. As amostras CL foram igualmente divididas entre as indústrias das três classes, enquanto as amostras UF pertenceram em sua maioria às indústrias de grande porte, não apresentando nenhuma indústria de pequeno porte. O resumo das informações obtidas sobre o porte das indústrias de laticínios, produtoras de queijo Minas Frescal, é encontrado na Tabela A.4 do Apêndice A.

Tabela 4.3 – Distribuição das amostras de queijo Minas Frescal coletadas, em relação ao porte de suas indústrias produtoras.

Processamento	Nº de amostras (marca)			
	Porte da Indústria			
	Pequeno	Médio	Grande	Total
AD	8 (4)	16 (4)	7 (2)	31 (10)
CL	10 (6)	10 (4)	10 (3)	30 (13) ^a
UF	-	9 (1)	22 (4)	31 (5)

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a Não foi obtida informação sobre uma empresa.

4.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados das análises físico-químicas de atividade de água, pH, acidez titulável e umidade para as amostras analisadas são apresentados na Tabela 4.4. Em geral, os desvios padrões observados foram consideravelmente inferiores às respectivas médias, indicando um pequeno espalhamento dos valores amostrais em torno destas. A única exceção ficou por conta da acidez titulável que apresentou desvios da mesma ordem de grandeza das médias, revelando uma grande dispersão dos resultados em relação ao número de amostras adotado. O número de amostras de cada processamento (31) se mostrou, portanto, adequado ao tipo de avaliação realizada neste trabalho.

Tabela 4.4 – Características físico-químicas das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por diferentes processamentos.

Processamento	Aa	pH	Acidez Titulável	Umidade
			° D	%
AD	0,986 (0,008) ^a	5,75 (0,46)	42,60 (22,77)	61,92 (5,91)
CL	0,986 (0,005)	5,87 (0,41)	39,39 (22,14)	57,33 (3,79)
UF	0,986 (0,003)	6,47 (0,07)	16,28 (3,52)	67,24 (2,77)

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a Média aritmética (Desvio Padrão)

4.2.1 Determinação do pH e Acidez Titulável

A comparação dos valores médios de pH entre os diferentes processamentos, tomados dois a dois, não mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras CL (5,87) e AD (5,75) para o teste de hipóteses (Tabela 4.5), ao contrário do esperado.

Levando em conta que o fermento normalmente utilizado na produção dos queijos CL (fermento mesofílico) produz ácido láctico continuamente a partir da sua adição ao leite, o pH destes queijos deve diminuir progressivamente com o passar do tempo. O valor verificado (5,87) para um intervalo médio de 10 dias entre a

data de fabricação e a análise das amostras, entretanto, ficou acima dos indicados na literatura.

Naldini (2002) obteve pH de 4,74 e 5,57 para os queijos CL e AD, respectivamente, após 12 dias de armazenamento a 5° C. Avaliando o efeito dos tipos de coagulante e de acidificante no rendimento, proteólise e “*shelf life*” dos queijos CL com coalho bovino e AD com coagulante microbiano, Dornellas (1997) obteve pH menor para os primeiros. Furtado *et al.* (1980b) obteve um pH de 4,87, 5,45 e 5,52 para os queijos tradicional (CL), com ácido (AD) e sem fermento, respectivamente, no 6.º dia após a produção.

O resultados obtidos neste trabalho para o processamento CL sugerem a possibilidade de que as indústrias estejam utilizando uma quantidade menor de fermento.

Com relação aos demais processamentos, os valores de pH estiveram em concordância com a literatura. As diferenças encontradas entre as amostras UF e as demais foram consideradas significativas ($p < 0,05$) (Tabela 4.5). As amostras UF apresentaram o maior valor médio de pH (6,47) dentre as amostras analisadas, o que pode ser explicado pelo aumento da capacidade tamponante das amostras UF, devido à incorporação das proteínas do soro concentradas junto com as demais proteínas do leite.

Tabela 4.5 – Determinação de significância na comparação dos valores médios de pH (teste t) para os três diferentes processamentos.

Comparação	c	t	Significância
AD – CL	2,0	-0,836	NS
AD – UF	2,0	-8,616	S
CL – UF	2,0	-8,552	S

AD - acidificação direta; CL - com adição de cultura láctica e UF - ultrafiltração.

c - valor crítico para o teste de hipóteses.

t - valor para a distribuição t.

S - significativo NS - não significativo.

Semelhante ao ocorrido com o pH, a comparação das médias para a acidez titulável (Tabela 4.6) não mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as

amostras CL (39,39) e AD (42,60). Novamente, as amostras UF (16,28) apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) com relação às demais. Os maiores desvios encontrados para a acidez titulável, contudo, não possibilitam, por si só, uma análise mais segura dos resultados obtidos.

Tabela 4.6 – Determinação de significância na comparação dos valores médios de acidez titulável (teste t) para os três diferentes processamentos.

Comparação	c	t	Significância
AD – CL	1,98	0,312	NS
AD – UF	1,98	6,151	S
CL – UF	1,98	5,867	S

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

c – valor crítico para o teste de hipóteses.

t – valor para a distribuição t.

S – significativo NS – não significativo.

4.2.2 Determinação da Atividade de Água

O valor médio obtido para a atividade de água (0,986) foi o mesmo para os três processamentos (Tabela 4.4), praticamente não havendo dispersão dos resultados amostrais em torno dele. Este resultado está em boa concordância com o valor (0,981) relatado por Naldini (2002) para a atividade de água de queijos Minas Frescal convencionais (CL) e AD, após 6 e 12 dias de armazenamento a 5° C, e após 12 dias a 10° C.

4.2.3 Determinação do Teor de Umidade – Extrato Seco Total

Os teores de umidade observados para os três processamentos (Tabela 4.4) conferem ao queijo Minas Frescal a classificação de “queijos de muito alta umidade”, com umidade acima de 55%, conforme a Portaria N°. 146 do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária – MAARA, de 07 de março de 1996 (Brasil, 1996). Os teores encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para a comparação das médias entre as amostras AD (61,92 %), CL (57,33 %) e UF (67,24 %) (Tabela 4.7).

As amostras UF apresentaram o maior teor de umidade dentre os três processamentos. Este resultado reflete a menor dessoragem proporcionada pela alta concentração de proteínas do soro que, por sua vez, possibilita uma maior capacidade de retenção de água. O alto conteúdo de umidade, aliado a um pH também elevado, favorece o desenvolvimento de bactérias deteriorantes em relação aos outros dois processamentos. Com isso, apesar do processamento UF conferir uma maior vida de prateleira ao queijo Minas Frescal, o mesmo deve ser consumido mais rapidamente após a abertura de sua embalagem.

Tabela 4.7 – Determinação de significância na comparação das médias de umidade (teste t) para os três diferentes processamentos.

Comparação	c	t	Significância
AD – CL	2,0	3,834	S
AD – UF	2,0	-4,538	S
CL – UF	2,0	-12,108	S

AD - acidificação direta; CL - com adição de cultura láctica e UF - ultrafiltração.

c – valor crítico para o teste de hipóteses.

t – valor para a distribuição *t*.

S – significativo NS – não significativo.

O maior teor de umidade observado para as amostras AD (61,92 %), em relação às CL (57,33%), implica em maior rendimento na produção destes queijos, sendo esta a provável razão pela qual muitas indústrias de laticínios têm adotado o processamento AD. Resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira *et*

al. (1998), nos quais 15 amostras (46,9 %) de queijo Minas Frescal avaliadas apresentaram teor de umidade superior a 60 %. Naldini (2002) observou um conteúdo de umidade muito próximo entre as amostras de queijo obtidas pelos processos AD (64,13 %) e CL (65,82 %).

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

4.3.1 Determinação de Coliformes Termotolerantes (45°C)

O resumo do número de amostras acima do Limite Máximo Estabelecido pela Legislação – LMEL – para coliformes termotolerantes (45° C) está contido na Tabela 4.8. Os resultados individuais para cada amostra são encontrados nas Tabela C.1, C.2 e C.3 do apêndice C.

Tabela 4.8 – Adequação das amostras de queijo Minas Frescal à Resolução RDC 12 - ANVISA quanto ao Número Mais Provável de coliformes termotolerantes (45°).

Processamento	Amostras acima do LMEL ^b	
	N ^a	%
AD	20 / 31	64,5
CL	9 / 31	29,0
UF	3 / 31	9,7
Total	32 / 93	34,4

AD - acidificação direta; CL - com adição de cultura láctica e UF - ultrafiltração.

^a Número de amostras acima do LMEL sobre o número de amostras analisadas.

^b Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução RDC nº 12 da ANVISA, de 02 de jan. de 2001).

O número de amostras AD acima do LMEL para coliformes termotolerantes (45° C) foi demasiadamente grande (64,5 %); o maior dentre as três tecnologias de fabricação do queijo. O mesmo foi observado com menor intensidade para as amostras CL, dentre as quais 29 % apresentaram NMP/g acima do LMEL. Embora a verificação de matéria-prima e procedimentos de fabricação das amostras de queijo Minas Frescal não tenham feito parte do trabalho, estes resultados revelaram que a quantidade de ácido láctico adicionada (AD) ou produzida (CL) nos queijos, aliada ao seu baixo poder antimicrobiano, provavelmente, não foi suficiente para evitar o desenvolvimento dos coliformes termotolerantes.

O menor grau de contaminação por coliformes termotolerantes (45° C) nas amostras CL pode estar relacionado à ação da cultura láctica que, por competição, inibiu o desenvolvimento destes microrganismos. Segundo Adams e Nicolaidis (1997), uma população de bactérias lácticas pode restringir o crescimento de outros microrganismos simplesmente pela ocupação do espaço físico e utilização dos nutrientes disponíveis.

O processamento UF apresentou somente 3 amostras (9,7 %) contendo coliformes termotolerantes (45° C) acima do LMEL, todas (UF8, UF15 e UF25) da mesma marca (Tabela A.3 do apêndice A). Isto indica que o problema de higiene estaria relacionado à unidade produtora e não ao tipo de processamento em particular.

Os resultados para coliformes termotolerantes (45° C) obtidos vêm de encontro aos encontrados por Dornellas (1997), Lourenço Neto (1998) e Campos (2000), que realizaram estudos com queijos produzidos com ácido láctico (AD), com cultura láctica (CL) e com uma combinação dos dois, sob condições de processamento controladas. Os queijos produzidos somente com ácido láctico foram aqueles que apresentaram o maior índice de contaminação por estes 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.

Pereira *et al.* (1999) avaliaram 20 amostras de queijos Minas Frescal, 100 de queijo Minas Padrão e 48 de queijo Canastra para coliformes termotolerantes (45° C). Os resultados mostraram que 90 % do queijo Minas Frescal, 52 % do Padrão e 81,2 % de Canastra apresentavam contagem de coliformes fecais superiores aos valores permitidos pela legislação (Portaria nº 01 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, de 28 de janeiro de 1987).

Ao correlacionar a ocorrência destes coliformes, acima do LMEL, com o porte das indústrias (Tabela 4.9), foi verificado que a contaminação das amostras AD ocorreu independente do porte da indústria, com maior incidência nas de médio porte (87,5 %). O mesmo ocorreu para as amostras CL que, apesar de uma maior incidência (50 %) nas indústrias de pequeno porte, apresentaram resultados similares para as de médio e grande porte (20 % ambas). As amostras UF acima do LMEL (13,6 %) foram produzidas por uma única indústria de grande porte.

Neste trabalho, independente do porte da indústria e tipo de processamento, 34,4 % do total de amostras apresentaram resultados acima do LMEL para coliformes termotolerantes (45° C), um índice elevado que revela as condições higiênico-sanitárias inadequadas nas quais estas amostras de queijo Minas Frescal foram produzidas.

Tabela 4.9 – Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras acima do LMEL para coliformes termotolerantes (45° C).

Processamento	Porte da Indústria					
	Pequeno		Médio		Grande	
	N ^a	%	N ^a	%	N ^a	%
AD	3 / 8	37,5	14 / 16	87,5	3 / 7	42,8
CL	5 / 10	50,0	2 / 10	20,0	2 / 10	20,0
UF	-	-	0 / 9	0	3/22	13,6

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a N° de amostras acima do LMEL (Limite Máximo Estabelecido por Legislação) sobre o n° de amostras analisadas para o referente porte do laticínio.

4.3.2 Determinação de Estafilococos Coagulase Positiva

O resumo do número de amostras de queijos Minas Frescal que apresentaram valores de contagem de Unidades Formadoras de Colônias – UFC de estafilococos coagulase positiva acima do LMEL é apresentado na Tabela 4.10. Os resultados individuais para cada amostra são encontrados nas Tabelas C.1, C.2 e C.3 do apêndice C.

Tabela 4.10 – Adequação das amostras de queijo Minas Frescal à Resolução RDC 12 quanto à contagem de estafilococos coagulase positiva.

Processamento	Amostras acima do LMEL ^b	
	N ^a	%
AD	3 / 31	9,7
CL	4 / 31	12,9
UF	0 / 31	0
Total	7 / 93	7,5

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a Número de amostras coagulase positivas sobre o número de amostras analisadas.

^b Limite Máximo Estabelecido pela Legislação (Resolução RDC nº 12 da ANVISA, de 02 de jan. de 2001).

Para estafilococos coagulase positiva, o processamento CL apresentou maior percentagem de amostras acima do LMEL (12,9 %) em relação às amostras AD (9,7 %), sugerindo que o efeito da cultura láctica sobre o estafilococos coagulase positiva, naquelas amostras, pode ter sido abaixo do esperado. A ICMSF (2000) afirma que uma baixa produção de ácido pelo fermento láctico pode permitir o crescimento de *S. aureus* em uma população suficientemente elevada para produzir enterotoxinas.

As três amostras AD acima do LMEL pertenciam a mesma marca, indicando um provável problema de manipulação, principal fonte de contaminação por *S. aureus*, nesta indústria. Já as amostras UF, produzidas em sistema fechado

e, portanto, sem manipulação, não apresentaram resultados positivos quanto à determinação de estafilococos coagulase positiva.

Os resultados citados na literatura dizem respeito principalmente aos queijos Minas artesanais. Loguercio e Aleixo (2001) avaliaram 30 amostras de queijo Minas Frescal artesanal, produzidos em Cuiabá – MT, onde 29 amostras (96,7 %) foram consideradas fora dos limites aceitáveis (Portaria 451 da Secretaria de Vigilância Sanitária de Alimentos – MS, de 19 de setembro de 1997). Sabioni e Maia (1998) encontraram contagens de *S. aureus* acima de 10^6 UFC/g em 21 (70 %) das amostras artesanais analisadas.

Apesar da proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos elaborados a partir de leite cru, a produção artesanal de queijo Minas Frescal em geral utiliza este tipo de leite como matéria-prima. Cerqueira *et al.* (1995) verificaram que 13 (43,33 %) das 30 amostras artesanais produzidas a partir de leite cru apresentavam *S. aureus* com contagem superior aos padrões estabelecidos pela Portaria nº 01 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, de 28 de janeiro de 1987 (Brasil, 1987). Almeida Filho e Nader Filho (2000) também encontraram metade das 80 amostras analisadas com contagem de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g.

Peresi *et al.* (2001) determinaram a contaminação por estafilococos coagulase positiva em uma (3,3 %) das 30 amostras de queijos Minas Frescal, industrializados e comercializados em São José do Rio Preto – SP. A contagem verificada na amostra contaminada se encontrava acima do limite estabelecido pela Portaria nº 451 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, de 19 de setembro de 1997 (Brasil, 1997a).

Neste trabalho, todas as amostras que apresentaram coagulase positiva também apresentaram contagem de UFC/g acima do LMEL. Acredita-se que seja necessária uma contagem entre 10^5 e 10^6 UFC de *S. aureus* por grama de alimento para que ocorra a produção de toxinas em níveis capazes de provocar

intoxicação (Leitão, 1988; FDA, 1998; ICMSF, 1998). Três amostras CL (9,7 %) e duas AD (6,5 %) apresentaram contagens nesta faixa.

A produção de enzimas coagulase e termonuclease (também denominada DNase) tem sido relacionada na literatura com as cepas enterotoxigênicas. É conhecida, entretanto, a existência de cepas DNase e coagulase negativas produtoras de enterotoxinas. O estabelecimento de limite pela legislação brasileira somente para estafilococos coagulase positiva subestima, portanto, a presença de cepas DNase e coagulase negativa enterotoxigênicas. Neste sentido, Sabioni e Maia (1998) relataram a ausência de atividade da enzima termonuclease em 21 amostras de queijo Minas Frescal positivas para *S. aureus* e Vernozy-Rozand *et al.* (1996) verificaram que 11 das 187 (5,9 %) espécies estafilococos coagulase negativa testadas eram enterotoxigênicas. A maioria destas cepas (5,3 %) foi isolada de queijos produzidos com leite de cabra cru.

Com relação ao porte das indústrias produtoras (Tabela 4.11), a incidência do número de amostras coagulase positiva acima do LMEL esteve concentrada nas indústrias de médio porte para o processamento AD, enquanto que para o CL, ocorreu independente do porte da indústria.

Tabela 4.11 – Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras com estafilococos coagulase positiva acima do LMEL.

Processamento	Porte da Indústria					
	Pequeno		Médio		Grande	
	N ^a	%	N ^a	%	N ^a	%
AD	0	0	3 / 16	18,8	0	0
CL	1 / 10	10	2 / 10	20	1 / 10	10,0
UF	-	-	0 / 9	0	0 / 22	0

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura lática e UF – ultrafiltração.

^a N° de amostras acima do LMEL (Limite Máximo Estabelecido por Legislação) sobre o n° de amostras analisadas para o referente porte do laticínio.

4.3.3 Detecção de *Salmonella*

Apesar da quantidade total de amostras (32) fora dos padrões legais para coliformes termotolerantes (45° C), indicadores da presença de bactérias enteropatogênicas, não foi isolada *Salmonella* em nenhuma das amostras analisadas.

Estes resultados concordam com os obtidos por Peresi *et al.* (2001), os quais encontraram 7 amostras (23,3 %) de queijo Minas frescal industrializado, contaminadas por coliformes fecais acima do limite estabelecido pelo padrão específico, não mostraram a presença de *Salmonella*. Ávila e Gallo (1996) também não detectaram a presença de *Salmonella* spp em queijos do mesmo tipo.

As dezesseis culturas isoladas no presente trabalho, a partir de 9 amostras AD, 6 CL e uma UF, apresentaram características suspeitas para o gênero *Salmonella*. A realização de testes bioquímicos, no entanto, levou à identificação da presença de outros microrganismos: *Serratia marcescens* (25 %), *Enterobacter sakasaki* (18,8 %), *Stenotrophomonas maltophilia* (15,5 %), *Escherichia coli* (6,2 %), *Citrobacter freundii* (6,2 %), *Hafnia* (6,2 %) e *Shewanella putrefaciens* (6,2 %).

A cultura positiva para *E. coli* foi obtida a partir da amostra UF que apresentou uma pequena quantidade de coliformes termotolerantes (45° C), 8,7 NMP/g, revelando não haver necessidade de uma contagem alta de coliformes termotolerantes para que ocorra a presença e desenvolvimento de *E. coli*.

O crescimento de vários microrganismos diferentes demonstra uma falha dos meios seletivos. Goo *et al.* (1973), Rambach (1990) e Ávila e Gallo (1996) concordam que um meio seletivo ideal para o isolamento de *Salmonella* spp deveria ser inibidor tanto de coliformes que fermentam a lactose rapidamente, quanto daquelas bactérias que não fermentam a lactose, como *Proteus* spp, *Pseudomonas* spp e algumas espécies de *Citrobacter*, que acabam confundindo o pesquisador no momento da seleção das colônias suspeitas.

4.3.4 Detecção de *Listeria*

O número total de amostras de queijo Minas Frescal positivas para o gênero *Listeria* e para *L. monocytogenes* é apresentado na Tabela 4.12. O resultado específico para cada amostra pode ser observado nas Tabelas C.1, C.2 e C.3 do apêndice C.

Tabela 4.12 – Ocorrência do gênero *Listeria*, *L. monocytogenes* e *L. innocua*, em amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por diferentes processamentos.

Processamentos	<i>Listeria</i> spp		<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>	
	N ^a	%	N ^b	%	N ^c	%
AD	7 / 31	22,6	3 / 7	42,9	4 / 7	57,1
CL	4 / 31	12,9	0	0	4 / 4	100,0
UF	0	0	0	0	0	0
Total	11 / 93	11,8	3 / 93	3,2	8 / 93	8,6

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a N°. de amostras positivas para *Listeria* / n°. de amostras analisadas para cada processamento.

^b N°. de amostras positivas para *L. monocytogenes* / n°. de amostras positivas para *Listeria*.

^c N°. de amostras positivas para *L. innocua* / n°. de amostras positivas para *Listeria*.

Do total de 93 amostras de queijo Minas Frescal, 11 (11,8 %) foram positivas para o gênero *Listeria*. Nas amostras do processamento AD, foi detectada *Listeria monocytogenes* em 3 das 7 amostras positivas para *Listeria* spp (42,9 %) sendo as demais positivas para *L. innocua* (57,1 %). Nas amostras do processamento CL, foi detectada somente *Listeria innocua* (12,9 %) e as amostras UF não apresentaram contaminação por *Listeria*.

Apesar da espécie *Listeria innocua* não ser patogênica para o homem, o seu crescimento nas amostras AD e CL demonstra a possibilidade de também ocorrer o crescimento de *L. monocytogenes* nestes produtos, representando um risco potencial para os consumidores.

Estes resultados corroboram com os encontrados por Destro *et al.* (1991), nos quais 2 das 20 (10 %) amostras analisadas de queijo Minas Frescal, industrializadas e comercializadas em Campinas, foram positivas para *L. monocytogenes* e 6 (30 %) para *L. innocua*. Eles estão também de acordo com a observação feita por Naldini (2002), de que os queijos Minas Frescal AD são mais susceptíveis ao crescimento de *L. monocytogenes* do que os queijos CL.

Outros resultados foram reportados na literatura por Cerqueira, *et al.* (1995), verificando a ocorrência de *Listeria* spp em 3 das 30 amostras de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente com leite cru, sendo 6,7 % identificadas como *L. innocua* e 3,33 % como *L. monocytogenes*. Pesquisando *Listeria* em amostras de leite em São Paulo, Moura *et al.* (1993) obtiveram 21 (9,5 %) das 220 amostras de leite cru positivas para *L. monocytogenes*. Nas 220 amostras de leite pasteurizado (tipo B e C) somente 2 amostras (0,9 %) foram positivas para *L. innocua*.

Silva *et al.* (1998) pesquisaram a incidência de *L. monocytogenes* em queijos Minas Frescal dos tipos artesanal e industrializado e em queijos curados (Gorgonzola, Brie e Roquefort). Das 103 amostras analisadas, 31 (30,1 %) apresentaram resultado positivo para *Listeria* spp. O queijo Minas Frescal artesanal apresentou maior freqüência de *L. monocytogenes*: 7 das 17 amostras (41,17 %) estavam contaminadas por este microrganismo. Três amostras (17,65 %) estavam contaminadas com *L. innocua*. As amostras industrializadas apresentaram menor incidência de *L. monocytogenes*, 1 de 33 (3,03 %). Os queijos curados mostraram prevalência de *L. innocua*, 7 das 53 amostras (13,21 %), seguido de 5,67 % de *L. monocytogenes*.

A presença de *Listeria* em queijos semelhantes ao Minas Frescal, produzidos em diferentes países, também foi reportada na literatura. Marrakchi *et al.* (1993) analisaram 22 amostras de um queijo fresco tradicional marroquino, denominado “jben”, dentre as quais foram encontradas 4 amostras, com pH entre 4,0 e 4,6, contaminadas por *Listeria*. Em uma destas amostras, foram isoladas *L.*

monocytogenes e *L. innocua*. Nenhum dos queijos frescais dos tipos semi industrial e curado examinados apresentaram *L. monocytogenes*.

Margolles *et al.* (1996) observaram uma incidência bastante elevada (41 %) de *L. monocytogenes* em queijos artesanais comercializados na Espanha, com baixo pH e níveis de umidade elevados, que favoreceram o desenvolvimento deste microrganismo.

Saltijeral *et al.* (1999) avaliaram a presença de *Listeria* em queijos mexicanos. Este patógeno foi encontrado em 65% das amostras de queijo fresco, denominado “Panela” (pH de 5,5 e 57 % de umidade). *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. grayi* foram encontradas em igual quantidade (15% para cada espécie) nas 40 amostras analisadas.

Com relação ao porte das indústrias (Tabela 4.13), *Listeria* spp foi encontrada nas amostras AD provenientes de indústrias de médio e grande porte, enquanto que nas amostras CL, este microrganismo foi detectado nas amostras pertencentes à indústrias das três classes. Para a *L. monocytogenes*, foram observadas praticamente as mesmas proporções nas amostras AD de indústrias de médio (2/5) e grande (1/2) porte. O maior índice de *Listeria* spp em amostras AD produzidas por indústrias de médio porte coincide com a contaminação das amostras AD de médio porte por coliformes termotolerantes (45° C) e estafilococos coagulase positiva.

Tabela 4.13 – Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijo Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras positivas para *Listeria*.

Processamento	Porte da Indústria					
	Pequeno		Médio		Grande	
	N ^a	%	N ^a	%	N ^a	%
AD	0	0	5 / 16	31,3	2 / 7	28,6
CL	2 / 10	20,0	1 / 10	20,0	1 / 10	10,0
UF	-	-	0 / 9	0	0 / 22	0

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a N = n° de amostras positivas para *Listeria* spp sobre n° de amostras analisadas para o referente porte do laticínio.

4.3.5 Adequação Geral aos Padrões Microbiológicos

A proporção das amostras fora dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC 12 da ANVISA, de 02 de janeiro de 2001 (Brasil, 2001), em relação ao total analisado para cada processamento pode ser observada na Tabela 4.14. Os resultados individuais para cada amostra são encontrados nas Tabelas C.1, C.2 e C.3 do apêndice C.

Dentre os três processamentos, o processamento AD apresentou o maior número de amostras – 22 em 31 (71 %) – em desacordo com a legislação. Em seguida veio o processamento CL, com 35,5 % (11 em 31) das amostras em desacordo com a legislação. Estes resultados reforçam a idéia de que o pH elevado dos queijos Minas Frescal produzidos pelos dois processamentos em questão, aliado ao alto conteúdo de umidade, principalmente nas amostras AD, podem ter contribuído para o desenvolvimento dos patógenos avaliados neste trabalho. O menor grau de contaminação nas amostras CL pode estar relacionado à ação da cultura láctica que, por competição, inibiu o desenvolvimento destes microrganismos.

O processamento UF, por ser realizado em sistema fechado sem manipulação pós-pasteurização, apresentou somente 3 amostras (9,7 %) em desacordo com o padrão microbiológico estipulado na legislação para coliformes termotolerantes (45° C).

Considerando o total de 93 amostras analisadas para os três processamentos, 38,7 % estiveram em desacordo com os padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira. Este resultado revela a necessidade de controle mais eficaz sobre as indústrias de laticínios produtoras de queijo Minas Frescal.

Tabela 4.14 – Amostras de queijo Minas Frescal produzidos por diferentes alternativas tecnológicas em desacordo com a legislação brasileira.

Processamento	Amostras acima do LMEL	
	N ^a	%
AD	22 / 31	71
CL	11 / 31	35,5
UF	3 / 31	9,7
Total	36 / 93	38,7

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a N° de amostras acima do LMEL sobre o n° de amostras analisadas.

^b Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução RDC n° 12 da ANVISA, de 02 de jan. de 2001).

Ao correlacionar o número total de amostras acima do LMEL com o porte das indústrias (Tabela 4.15), foi verificado que a contaminação das amostras AD ocorreu independentemente do porte da indústria. No entanto, todas as amostras AD provenientes de indústria de médio porte, analisadas neste trabalho, estavam em desacordo com a legislação. Para as amostras CL, apesar da maior incidência

verificada para as indústrias de pequeno porte, os resultados para as indústrias de médio e grande porte foram similares (30 % para ambas). As amostras UF (13,6 %) acima do LMEL foram produzidas por uma única indústria de grande porte.

Tabela 4.15 – Relação entre o porte das indústrias produtoras de queijos Minas Frescal elaborados por diferentes processamentos e as amostras em desacordo com os padrões microbiológicos da legislação brasileira.

Processamento	Porte da Indústria					
	Pequeno		Médio		Grande	
	N ^a	%	N ^a	%	N ^a	%
AD	3 / 8	37,5	16 / 16	100,0	3 / 7	42,9
CL	5 / 10	50,0	3 / 10	30,0	3 / 10	30,0
UF	-	-	0	0	3/22	13,6

AD – acidificação direta; CL – com adição de cultura láctica e UF – ultrafiltração.

^a N^o de amostras acima do LMEL (Limite Máximo Estabelecido pela Legislação) sobre n^o de amostras analisadas para o referente porte do laticínio.

5. CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi avaliada a qualidade microbiológica de 93 amostras de queijos Minas Frescal produzidos por três diferentes procedimentos tecnológicos: Acidificação Direta (AD), adição de Cultura Lática (CL) e Ultrafiltração (UF). Os resultados observados nas análises físico-químicas e microbiológicas permitiram chegar às seguintes conclusões:

- Os resultados físico-químicos revelaram uma descaracterização dos queijos Minas Frescal comercializados no varejo de Campinas, com teores de umidade e pH mais elevados, além da consistência gelatinosa observada nos queijos UF (MMV). Os altos teores de umidade reduzem o valor nutricional do produto e favorecem a multiplicação bacteriana decorrente da elevada atividade de água do produto. A proximidade entre os valores de pH dos queijos AD e CL sugerem a utilização de uma quantidade menor de fermento láctico nestes últimos;
- Os resultados microbiológicos obtidos neste trabalho confirmam os resultados de trabalhos anteriores afirmando que o processamento AD é o mais susceptível ao desenvolvimento microbiano.
- O processamento de queijo Minas Frescal utilizando a tecnologia de ultrafiltração pelo método MMV, por empregar sistemas fechados com reduzida participação de operações manuais, proporciona produtos com menores índices de contaminação microbiana;
- A ocorrência de coliformes termotolerantes (45° C) e estafilococos coagulase positiva acima do LMEL nos queijos Minas Frescal, juntamente com a presença de *L. monocytogenes* observada neste trabalho, revelam o risco potencial à saúde representado pelo consumo destes produtos, comercializados na região de Campinas, e as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias existentes na sua cadeia de produção e comercialização;

- A presença de *L. monocytogenes* em 3 das 7 amostras AD (42,9 %) positivas para o gênero *Listeria* reforça a necessidade de adoção, por parte das indústrias e das autoridades competentes, de medidas eficazes na prevenção da contaminação durante o processamento dos queijos, em especial, para aqueles produzidos por acidificação direta, desprovidos de barreira microbiológica capaz de reduzir o desenvolvimento deste patógeno;
- O porte das empresas produtoras de queijo Minas Frescal que utilizaram os processamentos AD e CL, não é um fator determinante do grau de risco da presença de perigos de natureza microbiológica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT-ELEININ, A-A. M.; RYSER, E. T.; DONNELLY, C.W. Incidence and seasonal variation of *Listeria* species in bulk tank goat's milk. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63,n. 9, p. 1860-1868, sep. 2000.

ADAMS, M. R.; NICOLAIDES, L. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control**, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 227-239,1997.

AGRIDATA. **Tecnologia de Fabricação do queijo Minas Frescal**. <http://agridata.mg.gov.br/pesquisas/tecnologia_queijo/patecfa_frescal.htm>. Acesso em novembro de 2002.

ALMEIDA, P. F. de; ALMEIDA, R. C. de C; RODRICK, G. E. *Listeria monocytogenes*: importância e distribuição nos alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n. 64, p. 19-23, set. 1999.

ALMEIDA FILHO, E. S. de; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Revista de Saúde Pública**, [on line], v. 34, n. 6, p.578-580 ,dez., 2000. Disponível na World Wide Web: <<http://www.scielo.br>>. ISSN 0103-9016.

ALMEIDA FILHO, E. S. de; LINDNER, A. L.; ALMEIDA, D. S. de; SIGARINI, C. O.; FERREIRA, M. B. Perfil microbiológico de queijo tipo Minas Frescal, de produção artesanal e inspecionada, comercializado no município de Cuiabá, MT. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 92/93, p.51-56, jan.-fev., 2002.

ANDREWS, W. H.; HAMMACK, T. S. **Salmonella** in: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual., 8^a ed., 1998. Cap. 5. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>. Acesso em: 05 set. 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – **Official Methods of analysis of AOAC International**, 16 ed., Gaithersburg. 1997. Cap. 33, v.2.

ÁVILA, C. R. de; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados no município de Piracicaba – SP. **Scientia Agricola**, [on line], v. 53, n. 1, p.159-163, jan.-abr., 1996. Disponível na World Wide Web: <<http://www.scielo.br>>. ISSN 0034-8910.

BAEK, S.-Y.; LIM, S. Y.; LEE, D. H.; MIN, K. H.; KIM, C. M. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 2, p. 186-189, feb. 2000.

BANWART, G. J. **Basic food microbiology**. 2 ed. New York: Chapman & Hall, 1989. 773p.

BEATON, N. C. Ultrafiltration and reverse osmosis in the dairy industry – an introduction to sanitary considerations. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 42, n. 7, p. 584-590, jul., 1979.

BENNETT, R. W. ; LANCETTE, G. A. ***Staphylococcus aureus*** In: UNITED STATES. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual., 8^a ed., 1998. Cap. 12. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>. Acesso em: 05 set. 2001.

BRACKETT, R. E. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 3, p. 163-164, apr. 1988.

BRASIL. Resolução nº 16, de 24 de abril de 1978. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos – CNNP, conceitua os produtos perecíveis e recomenda procedimento adequado de conservação. Ministério da Saúde. In: FOOD STAFF (Comp.). **Food Base**: legislação sobre alimentos. São Paulo: ABIA, 1999. CD-ROM. produzido por Vox Editora.

BRASIL. Portaria nº 01, de 28 de janeiro de 1987. Aprova padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Seção 1. Brasília, DF, p.2197-2200, 25 fev.1987.

BRASIL. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Brasília, 50p.

BRASIL. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico de princípios gerais para o estabelecimento de critérios microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância Sanitária de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 set. 1997a.

BRASIL. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997b. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. In: FOOD STAFF (Comp.). **Food Base**: legislação sobre alimentos. São Paulo: ABIA, 1999. CD-ROM. produzido por Vox Editora.

BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12-01rda.htm>. Acesso em 27 ago. 2001.

CAMPOS, J. E.; ORLANDO, J. C.; PAPE, G.; ROBERTELLI, R.; ALEXANDRE, G. N. Estudo da fabricação de queijos não curados usando ácido láctico em lugar de culturas lácticas selecionadas (fermentos lácticos). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, 158/9, p. 1-7, 1971.

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.** Campinas, 2000. 80p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp, coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 3, p.281-7, set.-dez., 2001.

CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; FONSECA, L. M.; SOUZA, M. R.; MESQUIARI, M.; RODRIGUES, R. Frequência de *Listeria* sp e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas produzido artesanalmente. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XIII., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p. 95-7.

DATAMARK CONSULTORES, Brazil Pack' 93. A indústria brasileira de embalagens incorporando o mercado brasileiro de produtos ao consumidor. Parte II. Os mercados de uso final. 8 ed. São Paulo: Datamark, 1993. p.73-219. Apud: VAN DENDER, A. G. F. **Contribuição ao estudo do uso da ultrafiltração de leite na fabricação de queijo Minas Frescal.** Campinas, 1995. 176p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

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 LUCA, G.; ZANETTI, F.; STAMPI, S. *Staphylococcus aureus* in dairy products in the Bologna area. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 267-270, apr., 1997.

DESTRO, M. T.; SERRANO, A. De M.; KABUKI, D. Y. Isolation of *Listeria* species from some brazilian meat and dairy products. **Food Control**, Oxford, v.2, n. 2, p. 110-112, apr. 1991.

DIAS, R. S.; SILVA, S. L.; SOUZA, J. M.; VIEIRA, M. B. C. M. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XIII., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p. 143-4.

DORNELLAS, J. R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise, e “shelf life” do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. 96p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

EL GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. Ultrafiltration and reverse osmosis in dairy technology: A review. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 54, n. 10, p. 801-809, oct., 1991.

ERKMEN, O. Inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* in Turkish white cheese during the ripening period. **Journal of Food Engineering**, New York, v. 46, n. 2, p. 127-131, nov. 2000.

FARBER, J. M.; JOHNSTON, M. A.; PURVIS, U.; LOIT, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n.2, p. 157-163, nov. 1987.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. M.; JOHNSTON, M. A. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 52, n. 7, p. 456-458, jul. 1989.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, sep. 1991.

FENIMAN, C. M.; PASINI, G.; MUCELIN, C. A. Avaliação microbiológica do leite tipo C comercializado no município de Medianeira – PR. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA. (ISBN: 85-8912301-4). CD-ROM.

FERNÁNDEZ GARAYZÁBAL, J. F.; DOMÍNGUEZ RODRÍGUEZ, L.; VÁSQUES BOLAND, J. A.; BLANCO CANCELO, J. L.; SUÁREZ FERNÁNDEZ, G. *Listeria monocytogenes* dans le lait pasteurisé. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, n. 2, p. 149-150, feb. 1986.

FLORENTINO, E. R.; MARTINS, R. S. Características microbiológicas do “queijo de coalho” produzido no estado da Paraíba. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 13, n.59, p. 43-48, jan./fev. 1999.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. Center for Food Safety & Applied Nutrition. Foodborn pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. The “**Bad Bug Book**”. 1998. Disponível em <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Acessado em ago., 2001.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Massachusetts: Kluwer Academic, 2000 . 587p.

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DE MINAS GERAIS – FAPEMIG, Tecnologia garante qualidade sem alterar sabor. **Revista Minas faz Ciência**, Belo Horizonte, n. 2, mar./mai., 2000. www.revista.fapemig.br/2/index.html. Acesso em 27 de nov. 2002.

FURTADO, M. M.; SOUZA, H. M. de; MUNK, A. V. 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. jan./ fev. 1980a.

FURTADO, M. M.; WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; MUNK, A. V.; SOUZA, H. M. de. Estudo conclusivo a respeito do queijo Minas Frescal por diferentes processos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 35, n. 208, p. 13-16. mar./ abr. 1980b.

FURTADO, M. M. **A arte e a Ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297p. (Publicação Globo Rural).

FURTADO, M. M.; LOURENÇO NETO, J. P. M. Queijo Minas Frescal. In: Tecnologia de Queijos. 1ª ed. p. 73-75, 1994. Apud: 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**. Campinas, 2000. 80p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

GABUTTI, A. H.; DONNO, A. de; BAGORDO, F.; MONTAGNA, M. T. Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as um effective indicator of human pollution. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 697-700, 2000.

GARTHRIGHT, W. E. **Most Probable Number from serial dilutions**. In: UNITED STATES. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual., 8^a ed., 1998. Appendix 2 (tabela 1 – 3 tubes each). Disponível em:

<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a2.html>. Acesso em: 05 set. 2001

GIESI, J. H. Sanitation: The key to food safety and public health. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 12, 74-80, 1991.

GOO, V. Y. L.; CHING, G. Q. L.; GOOCH, J. M. Comparison of Brilliant Green Agar and Hektoen Enteric Agar media in the isolation of *Salmonellae* from food products. **Applied Microbiology**, Washington, v. 26, n. 3, p.288-292, sept., 1973.

GREEN M. L.; SCOTT, K. J.; ANDERSON, M.; GRIFFIN, M. C. A.; GLOVER, F. A. Chemical characterization of milk concentrated by ultrafiltration. **Journal of Dairy Research**, London, v. 51, n. 2, p. 267-278, may 1984.

HITCHINS, A. D.; FENG, P.; WATIKINS, W. D.; RIPPEY, S. R.; CHANDLER, L. A. **Escherichia coli and Coliform Bacteria** In: UNITED STATES. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual., 8^a ed., 1998. Cap. 4. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4.html>. Acesso em: 05 set. 2001.

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.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's of Manual Determinative Bacteriology**. 9^a ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 787p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIOS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in food**: Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 513p. v. 5.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIOS FOR FOODS – ICMSF. **Microorganisms in food**: Microbiological ecology of food commodities. Gaithersburg: A Chapman & Hall Food Science Book, An Aspen Publication, p.549-558, 2000. v. 6.

IRETON, K.; COSSART, P. Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. **Annual Reviews Genetic**, v. 31, p. 113-138, 1997.

KABUKI, D. Y. **Contagem de *Listeria* spp pelo método do Número Mais Provável (NMP), avaliação de sua ocorrência em carnes de frango e eficiência de sanitizantes na redução da contaminação por *Listeria monocytogenes***. Campinas, 1997. 91p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**. [on line], v. 3, n. 14 e 15, p. 1177-1181, nov.-dec., 2001. <www.probe.br>. Acesso em 01 de dezembro de 2002.

KOSIKOWSKI, F. New cheese-making procedures utilizing ultrafiltration, **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 6, p. 71-77, jun. 1986.

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.

LEITÃO, M. F. F. Microbiologia de Alimentos. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (ed). **Tratado de Microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988, v. 2.

LEITE JÚNIOR, A. F. S.; FLORENTINO, E. R.; OLIVEIRA, E. B. D. de; TORRANO, A. D. M. Qualidade microbiológica do “queijo de coalho” comercializado à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande (PB), **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n. 73, p. 53-59, jun.2000.

LINTON, R. H.; CARTER, W. H.; PIERSON, M. D.; HACKENEY, C. R.; EIFERT, J. D. Use of modified Gompertz equation to predict the effects of temperature, pH and NaCl on the inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A heated in infant formula. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 1, p.16-23, Jan., 1996.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, [on line], v. 31, n. 6, p.1063-1067, 2001. Disponível na World Wide Web: <<http://www.scielo.br>>. ISSN 0103-8478.

LOGUERCIO, A. P.; SILVA, W. P. da; ALEIXO, J. A. G.; COSTA, M. M. da; VARGAS, A. C. D. *Listeria monocytogenes*: Um importante patógeno de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, jan./fev. 2001.

LOURENÇO NETO, J. P. M. O uso de culturas lácticas na fabricação de Minas Frescal como alternativa de melhoria de qualidade. **I Seminário Internacional de “Queijos Frescos”**. Atibaia, p. 59-75, 1998.

LOVETT, J. L.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence and pathogenicity. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 50, n. 3, p. 188-192, mar., 1987.

MAIJALA, R.; LYYTIKÄINEN, O.; JOHANSSON, T.; AUTIO, T.; AALTO, T.; HAAVISTO, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Exposure of *Listeria monocytogenes* within an epidemic caused by butter in Finland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-2, p.97-109, oct., 2001.

MANDIL, A.; MORAIS, V. A.; PEREIRA, M. L.; FAGUNDES, J. M. S.; CARMO, L. S.; CORREIA, M. G.; CASTRO, E. P.; GOMES, M. J. V. M. *Staphylococcus aureus* em queijo tipo "Minas". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 2, n. 2, p. 233-241, jul./dez. 1982.

MARGOLLES, A.; RODRIQUEZ A.; REYES-GAVILIÓN, C. G. DE LOS. Some chemical and bacteriological characteristics of regional cheeses for Asturias, Spain. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 59, n. 5, p.509-515., may., 1996.

MARRAKCHI, A. El; HAMAMA, A. OTHMANI, F. El. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 56, n. 3, p. 256-259, mar. 1993.

MAUBOIS, J. L.; MOCQUOT, G. Application of membrane ultrafiltration to preparation of various types of cheeses. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 58, n. 7, p. 1001-1007, jul. 1975.

MAUBOIS, J. L. New applications of membrane technology in the dairy industry, **The Australian Journal of Dairy Technology**, Victoria, v. 46, n. 2, p. 91-95, nov. 1991.

MCLAUCHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 187-193, aug./out. 1996. Special issue.

MORGAN, F.; BONIN, V.; MALLEREAU, M.-P.; PERRIN, G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, 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.

MOURA, S. M.; DESTRO, M. T.; FRANCO, B. D. G. M. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in São Paulo, Brazil, **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n.3, p. 229-236, aug. 1993.

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

OLIVEIRA, J. S. **Queijo**: Fundamentos Tecnológicos. São Paulo: Ícone/ UNICAMP, 1986, 146p.

OLIVEIRA, C. A. F. de; MORENO, J. F. G.; MESTIERI, L.; GERMANO, P. M. L. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas frescal e Mussarela produzidos em algumas fábricas de laticínios de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 12, n. 55, p. 31-35, mai.-jun., 1998.

PAGOTTO, F.; DALEY, E.; FARBER, J.; WARBURTON, D. **Health products and Food Branch. Isolation of *Listeria monocytogenes* from all food and environmental samples**. Government of Canada, january 2001. Disponível em: <http://www.hc-sc.ca/food-aliment>.. Acesso em 20 set. 2001.

PASSOS, M. H. C. R. **Influência da formulação e condições de aquecimento na injúria e destruição de *Listeria monocytogenes* em hambúrguer**. Campinas, 2000. 242p. Tese (Doutora em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

PASSOS, M. H. C. R.; KUAYE, A. Y. Influence of the formulation, cooking time and final internal temperature of beef hamburgers on the destruction of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Oxford, v. 13, n.1, jan., 2002.

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**, Belo Horizonte [on line], v. 51, n.5, 427-431., out., 1999. Disponível na World Wide Web: <<http://www.scielo.br>>.

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 antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 83, p.63-70, abr. 2001.

PINI, P. N.; GILBERT, R. J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 317-326, jun. 1988.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: problema emergente de saúde pública. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 10, n. 44, p.22-27, ago., 1996.

RAIMUNDO, I. de C.; VALLE, R. H. P.; ABREU, L. R.; FIORINI, E. Avaliação microbiológica de ricotas comercializadas no município de Alfenas – MG. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 18., 2002, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos – SBCTA. (ISBN: 85-8912301-4). CD-ROM.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp from *Proteus* spp and other enteric bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p.301-303, jan., 1990.

RENNER, E.; ABD EL-SALAM, M. H. **Application of ultrafiltration in the dairy industry**. London: Elsevier science publishers, 1991. 371p.

ROCOURT, J. Risk factors for listeriosis. **Food Control**, Oxford, v. 7, n. 4/5, p. 195-202, aug./out. 1996. Special issue.

ROSS, R. P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G. F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science & Technology**, New York, v. 11, n. 3, p.96-104, mar., 2000.

RUDOLF, M.; SCHERER, S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 63, n. 1/2, p. 91-98, jan. 2001.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis and food safety**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap. 5, 738p.

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.

SALTIJERAL, J. A.; ALVAREZ, V. B.; GARCIA, B. Presence of *Listeria monocytogenes* in Mexican cheeses. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v.19, n. 4, p. 241-247, dec. 1999.

SÃO PAULO. Comunicado Conjunto CVS / IAL nº 1/03 de 15 de janeiro de 2003. Tornam público os resultados do Programa de Análise Fiscal de Alimentos – Programa Paulista 2002, instituído pelo Centro de Vigilância Sanitária em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz. Secretaria do Estado da Saúde. **Diário Oficial**, Estado de São Paulo, 01 fev. 2003, seção 1. Suplemento.

SCHLECH, W. F.; LAVIGNE, P. M. BORTOLUSSI, R. A.; ALLEN, A. C. HALDANE, E. V.; WORT, A. J.; HIGHTOWER, A. W.; JOHNSON, S. E.; KING, S. H.; NICHOLLS, E. S.; BROOME, C. V. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 308, n. 4, p. 203-206, jan. 1983.

SEELINGER, H. P. R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. **Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Willians & Wilkins, p. 1235-1245, 1986. v. 2.

SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SANTOS, D. A.; LEOCARDIO FILHO, G.; DIAS, R. S. Salmonelas isoladas de “queijo tipo coalho”: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos. Recife (PE). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 13-17, 1999.

SILVA, M. C. C.; CASTRO, D. G. Ocorrência de surto de intoxicação alimentar causada por queijo tipo “Minas”. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, XIII., 1995, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1995. p. 145-7.

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.

TUCAN, E. U.; MARTIN, S. E. Combined effects of salts and temperature on the thermal destruction of *Staphylococcus aureus* MF-31. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 3, p.833-836, May-June, 1990.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE – USDA. **In action**. Disponível em http://www.fsis.usda.gov/os/topics/In_action.htm . Acessado em 1 ago., 2001.

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

VAN DENDER, A. G. F. **Contribuição ao estudo do uso da ultrafiltração de leite na fabricação de queijo Minas Frescal**. Campinas, 1995. 176p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

VAN DENDER, A. G. F, MASSAGUER-ROIG, S.; CAMPOS, S.D. da S. Alterações físico-químicas e vida de prateleira do queijo Minas Frescal tradicional e fabricado pelo método MMV. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 16., 1998, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: EPAMIG/ELCT, 1998. p. 67-83.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and milk products**. Technology, chemistry and microbiology. London: Chapman & Hall, 1994, cap. 7, v. 1, série: Food products series.

VÁZQUEZ-SALINAS, C.; RODAS-SUÁREZ, O.; QUIÑÓNEZ-RAMIREZ, E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. **Food Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 177-181, apr., 2001.

VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M; BRUM, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goat's milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p.271-280, jul., 1996.

VIEIRA, S. D. A.; GOUDEDRÂNCHE, H.; DUCRUET, P.; MAUBOIS, J. L. Parâmetros para 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, set./out. 1984.

VIOTTO, W.H. **Ultrafiltração de soro doce de queijo Minas Frescal. Efeito de pré-tratamentos do soro no desempenho da membrana e na composição e solubilidade do concentrado proteico de soro.** Campinas, 1993. 229p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP.

WOLFSCHOON-POMBO, A. F.; FURTADO, M. M.; MUNCK, A. V. Estudo da fabricação do queijo Minas Frescal com ácido láctico em substituição ao fermento láctico, **Anais** do V Congresso Nacional de Laticínios, EPAMIG/DTA/ILCT, p.160-182, 1978.

YUN, J. J.; BARBANO, D. M. **Department of Food Science, Cornell University** – september/91, Adaptação AOAC (1995), 15^a ed, metodologia 971.19.

APÊNDICE A

A.1. CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS COLETADAS.

Tabela A.1 Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas por Acidificação Direta

Amostra	Marca	IFA ^a	Prazo de Validade
		dias	dias
AD1	A	5	30
AD2	B	5	30
AD3	C	12	28
AD4	A	12	29
AD5	D	13	19
AD6	C	7	29
AD7	B	6	30
AD8	A	8	29
AD9	C	9	28
AD10	B	7	28
AD11	B	7	31
AD12	E	15	28
AD13	A	29	29
AD14	A	13	29
AD15	B	7	30
AD16	A	10	29
AD17	F	12	30
AD18	E	12	30
AD19	C	10	28
AD20	C	10	29
AD21	G	3	15
AD22	H	9	31
AD23	E	12	31
AD24	I	10	46
AD25	H	8	31
AD26	J	13	63
AD27	I	9	46
AD28	J	34	61
AD29	H	9	30
AD30	J	46	61
AD31	I	26	40

^a Intervalo entre Fabricação e Análise

Tabela A.2 Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas com Cultura Lática

Amostra	Marca	IFA ^a	Prazo de Validade
		dias	dias
CL1	L	5	20
CL2	M	2	20
CL3	N	7	20
CL4	M	8	19
CL5	M	5	19
CL6	N	12	20
CL7	M	7	19
CL8	K	7	30
CL9	N	9	20
CL10	N	6	20
CL12	M	8	19
CL13	N	12	20
CL14	L	12	20
CL15	M	18	19
CL16	O	5	20
CL17	Q	13	44
CL18	L	6	20
CL19	N	11	20
CL20	M	8	19
CL22	S	15	31
CL23	T	17	20
CL24	U	8	61
CL25	V	41	41
CL26	Q	11	29
CL27	X	11	31
CL28	Z	12	31
CL29	X	16	31
CL30	O	13	17
CL31	U	8	61
CL32	Y	8	24
CL33	W	9	30

^a Intervalo entre Fabricação e Análise

OBS: Os resultados das amostras CL11 e CL21 foram descartados por estas não se encontrarem dentro dos parâmetros estabelecidos para a pesquisa. A amostra CL11 apresentava em sua composição fermento láctico e ácido láctico ao mesmo tempo, e a amostra CL21 não apresentava numeração do SIF ou do SISP.

Tabela A.3 Caracterização das amostras de queijo Minas Frescal produzidas por Ultrafiltração.

Amostra	Marca	IFA ^a	Prazo de Validade
		dias	dias
UF1	AB	8	30
UF2	CD	10	30
UF3	AB	22	30
UF4	FG	7	25
UF5	HI	21	45
UF6	FG	12	25
UF7	HI	13	45
UF8	FG	8	25
UF9	AB	11	30
UF10	HI	14	45
UF11	FG	5	30
UF12	AB	24	30
UF13	HI	35	45
UF14	AB	11	30
UF15	FG	8	30
UF16	AB	18	30
UF17	AB	21	30
UF18	HI	38	45
UF19	JK	28	30
UF20	AB	7	30
UF21	HI	12	45
UF22	JK	16	30
UF23	JK	11	30
UF24	FG	11	30
UF25	FG	12	30
UF26	HI	10	35
UF27	AB	6	30
UF28	HI	16	35
UF29	AB	14	30
UF30	HI	18	45
UF31	JK	16	30

^a Intervalo entre Fabricação e Análise

Tabela A.4 Caracterização do porte das indústrias produtoras dos queijos Minas Frescal avaliados nesta pesquisa

Processamento	Código	Porte Indústria	Recebimento diário	Produção diária
			Leite	Minas Frescal
			(litro/dia)	(kg/dia)
AD	A	Grande	-	2.000
	B	Médio	16.800	800
	C	Médio	50-60.000	2.100
	D	Grande	250.000	-
	E	Médio	16.800	800
	F	Pequeno	5-6.000	270
	G	Pequeno	2.000	250
	H	Pequeno	7.400	1.120
	I	Pequeno	8.000	1.300
	J	Médio	30.000	2.000
CL	K	Pequeno	2.000	285
	L	Grande	-	1.600
	M	Médio	-	900
	N	Grande	-	1.600
	O	Pequeno	-	440
	Q	Pequeno	3.000	420
	S	Médio	30.000	2.500
	T	Médio	38.000	5.400
	U	Pequeno	2.000	345
	X	Pequeno	5-6.000	270
	Z	Pequeno	2.500	360
	Y	Médio	40.000	-
	W	Grande	300.000	-
UF	AB	Grande	-	7.100
	CD	Grande	500.000	-
	FG	Grande	-	1.600
	HI	Médio	50-70.000	-
	JK	Grande	-	1.600

APÊNDICE B

B.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Tabela B.1 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido por Acidificação Direta.

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
AD1	5,91	-	0,993	66,44
AD2	5,61	51,66	0,977	57,98
AD3	6,06	33,21	0,983	57,01
AD4	5,95	14,92	0,995	70,38
AD5	5,42	47,74	0,980	51,13
AD6	5,71	49,35	0,981	56,37
AD7	6,15	22,96	0,990	56,35
AD8	5,58	23,90	0,994	63,79
AD9	5,97	26,48	0,986	55,84
AD10	5,24	75,14	0,982	57,21
AD11	5,26	68,16	0,986	54,90
AD13	5,43	41,27	0,996	64,82
AD14	5,93	25,29	0,989	69,50
AD15	5,99	27,50	0,981	56,67
AD16	6,30	20,15	0,996	69,93
AD17	6,19	24,32	0,955	57,91
AD18	4,93	95,33	0,989	72,82
AD19	5,72	53,13	0,981	57,02
AD20	5,93	38,22	0,985	57,33
AD21	6,42	19,11	0,989	61,72
AD22	6,12	28,57	0,990	63,33
AD23	5,66	47,58	0,989	67,95
AD24	6,45	23,92	0,990	68,93

Tabela B.1 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido por Acidificação Direta (Continuação).

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
AD25	5,90	42,50	0,983	60,67
AD26	5,82	29,63	0,980	58,69
AD27	6,36	19,09	0,992	69,14
AD28	4,76	77,12	0,981	59,17
AD29	6,14	30,76	0,983	58,42
AD30	4,91	73,09	0,980	60,04
AD31	5,28	51,91	0,990	66,58
Média AD	5,75	42,60	0,986	61,92

Tabela B.2 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido com adição de Cultura Lática.

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
CL1	6,33	-	0,985	54,38
CL2	6,28	-	0,986	56,91
CL3	6,23	14,94	0,987	57,72
CL4	5,85	29,95	0,996	56,38
CL5	6,14	30,59	0,982	53,44
CL6	5,89	34,10	0,983	53,87
CL7	5,87	31,79	0,996	53,13
CL8	5,38	54,72	0,984	55,51
CL9	5,73	42,47	0,984	54,51
CL10	6,01	25,31	0,985	57,50
CL12	6,15	29,64	0,998	58,23
CL13	5,31	60,32	0,989	50,59
CL14	5,29	57,04	0,985	55,17
CL15	5,32	68,92	0,993	53,96
CL16	6,30	19,04	0,991	60,09

Tabela B.2 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido com adição de Cultura Lática. (Continuação).

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
CL17	6,06	27,62	0,991	63,60
CL18	5,84	33,88	0,985	58,38
CL19	5,56	54,01	0,991	53,62
CL20	6,33	22,23	0,985	56,33
CL22	5,07	100,64	0,977	59,02
CL23	5,95	31,78	0,979	60,21
CL24	6,23	26,56	0,988	54,82
CL25	4,94	95,52	0,980	57,61
CL26	5,49	57,25	0,985	56,80
CL27	5,32	71,14	0,981	57,67
CL28	6,24	16,89	0,990	68,40
CL29	6,18	19,59	0,978	66,29
CL30	5,69	42,18	0,987	58,58
CL31	5,96	33,42	0,980	54,66
CL32	6,01	28,07	0,978	57,63
CL33	6,12	23,33	0,985	54,44
Média CL	5,87	39,39	0,986	57,33

Tabela B.3 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido por Ultrafiltração.

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
UF1	6,70	-	0,985	66,49
UF2	6,54	-	0,987	65,19
UF3	6,56	9,56	0,984	64,33
UF4	6,54	11,65	0,984	70,08
UF5	6,50	22,11	0,987	68,81

Tabela B.3 – Valores médios para pH, acidez titulável, atividade de água (Aa) e umidade das amostras de queijo Minas Frescal produzido por Ultrafiltração. (Continuação).

Amostra	pH	Acidez Titulável (° D)	Aa	Umidade (%)
UF6	6,50	20,40	0,982	65,72
UF7	6,41	8,84	0,989	67,53
UF8	6,42	16,84	0,988	63,76
UF9	6,45	13,95	0,989	67,71
UF10	6,42	12,69	0,988	67,53
UF11	6,42	12,71	0,985	63,60
UF12	6,52	16,95	0,989	65,71
UF13	6,35	12,70	0,997	67,60
UF14	6,53	20,13	0,986	66,81
UF15	6,48	18,05	0,987	64,75
UF16	6,43	15,89	0,987	66,05
UF17	6,43	19,12	0,984	65,05
UF18	6,40	16,94	0,987	76,02
UF19	6,37	20,14	0,988	72,12
UF20	6,45	20,12	0,987	66,59
UF21	6,42	15,91	0,989	68,17
UF22	6,45	17,47	0,982	64,46
UF23	6,48	21,20	0,982	70,27
UF24	6,38	19,13	0,983	64,51
UF25	6,48	20,14	0,986	69,93
UF26	6,50	15,86	0,987	69,84
UF27	6,56	14,34	0,985	64,44
UF28	6,44	13,78	0,987	69,25
UF29	6,43	16,95	0,986	66,51
UF30	6,47	12,71	0,987	68,56
UF31	6,44	15,90	0,985	66,38
Média UF	6,47	16,28	0,986	67,24

APÊNDICE C

C.1. RESULTADOS DAS ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Tabela C.1 – Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal obtidos por processamento de Acidificação Direta.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva	Coliformes termotolerantes 45 ° C	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	(UFC/g)	(NMP/g)	(em 25 g)	(em 25 g)
AD1	<10 ²	240	Ausente	Ausente
AD2	<10 ²	4600	“	“
AD3	<10 ²	>11000	“	“
AD4	<10 ²	93	“	“
AD5	<10 ²	<3	“	“
AD6	3,0 x 10 ⁴	290	“	“
AD7	<10 ²	11000	“	“
AD8	<10 ²	>11000	“	<i>L. monocytogenes</i>
AD9	<10 ²	>11000	“	Ausente
AD10	<10 ²	>11000	“	“
AD11	<10 ²	>11000	“	“
AD12	<10 ²	2900	“	“
AD13	<10 ²	>11000	“	<i>L. innocua</i>
AD14	<10 ²	36	“	Ausente
AD15	<10 ²	>11000	“	<i>L. monocytogenes</i>
AD16	<10 ²	>11000	“	Ausente
AD17	<10 ²	>11000	“	“
AD18	<10 ²	>11000	“	“
AD19	2,14 x 10 ⁶	11000	“	<i>L. innocua</i>
AD20	1,61 x 10 ⁶	>11000	“	<i>L. innocua</i>
AD21	<10 ²	< 3	“	Ausente
AD22	<10 ²	230	“	“
AD23	<10 ²	>11000	“	<i>L. innocua</i>
LMEL^a	5x10²	5x10²	Ausência	Ausência de <i>L. m.</i>^b

^a Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução – RDC nº12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001).

^b *Listeria monocytogenes*

Tabela C.1 – Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal obtidos por processamento de Acidificação Direta. (Continuação).

Amostra	Estafilococos coagulase positiva	Coliformes termotolerantes 45 ° C	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	(UFC/g)	(NMP/g)	(em 25 g)	(em 25 g)
AD24	<10 ²	>11000	Ausente	Ausente
AD25	<10 ²	150	“	“
AD26	<10 ²	92	“	<i>L. monocytogenes</i>
AD27	<10 ²	230	“	Ausente
AD28	<10 ²	1500	“	“
AD29	<10 ²	>11000	“	“
AD30	<10 ²	4600	“	“
AD31	<10 ²	36	“	“
LMEL^a	5x10²	5x10²	Ausência	Ausência de <i>L. m.</i>^b

^a Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução – RDC nº12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001).

^b *Listeria monocytogenes*

Tabela C.2 – Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal obtidos por processamento com adição de Cultura Láctica.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva	Coliformes termotolerantes 45 ° C	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	(UFC/g)	(NMP/g)	(em 25 g)	(em 25 g)
CL1	<10 ²	93	Ausente	Ausente
CL2	6,8 x 10 ³	>11000	“	“
CL3	<10 ²	< 3	“	“
CL4	<10 ²	210+	“	“
CL5	<10 ²	1100	“	“
CL6	<10 ²	< 3	“	“
CL7	1,4 x 10 ⁶	210	“	“
CL8	6,7 x 10 ⁶	> 11000	“	“
CL9	-	< 3	“	<i>L. innocua</i>
CL10	8,6 x 10 ⁵	< 3	“	Ausente
LMEL^a	10³	5x10³	Ausência	Ausência de <i>L. m.</i>^b

^a Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução – RDC nº12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001).

^b *Listeria monocytogenes*

Tabela C.2 – Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal obtidos por processamento com adição de Cultura Lática. (Continuação)

Amostra	Estafilococos	Coliformes	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
	coagulase positiva	termotolerantes 45 ° C		
	(UFC/g)	(NMP/g)	(em 25 g)	(em 25 g)
CL12	<10 ²	210	Ausente	Ausente ^a
CL13	<10 ²	> 11000	“	“
CL14	<10 ²	> 11000	“	“
CL15	<10 ²	2100	“	“
CL16	<10 ²	< 3	“	“
CL17	<10 ²	9,2	“	“
CL18	<10 ²	< 3	“	“
CL19	<10 ²	37	“	“
CL20	<10 ²	>11000	“	“
CL22	<10 ²	3,6	“	“
CL23	<10 ²	< 3	“	“
CL24	<10 ²	>11000	“	<i>L. innocua</i>
CL25	<10 ²	4600	“	Ausente
CL26	<10 ²	11000	“	“
CL27	<10 ²	>11000	“	“
CL28	<10 ²	36	“	“
CL29	<10 ²	11000	“	“
CL30	<10 ²	< 3	“	“
CL31	<10 ²	2100	“	<i>L. innocua</i>
CL32	<10 ²	36	“	<i>L. innocua</i>
CL33	<10 ²	< 3	“	Ausente
LMEL^a	10³	5x10³	Ausência	Ausência de <i>L. m.</i>^b

^a Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução – RDC nº12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001).

^b *Listeria monocytogenes*

Tabela C.3 – Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal produzidos pelo processamento de Ultrafiltração.

Amostra	Estafilococos coagulase positiva	Coliformes termotolerantes 45 ° C	<i>Salmonella</i>	<i>L. monocytogenes</i>
	(UFC/g)	(NMP/g)*	(em 25 g)	(em 25 g)
UF1	<10 ²	<3	Ausente	Ausente
UF2	<10 ²	<3	“	“
UF3	<10 ²	<3	“	“
UF4	<10 ²	<3	“	“
UF5	<10 ²	<3	“	“
UF6	<10 ²	210	“	“
UF7	<10 ²	4	“	“
UF8	<10 ²	>1100	“	“
UF9	<10 ²	4	“	“
UF10	<10 ²	< 3	“	“
UF11	<10 ²	< 3	“	“
UF12	<10 ²	< 3	“	“
UF13	<10 ²	< 3	“	“
UF14	<10 ²	< 3	“	“
UF15	<10 ²	> 1100	“	“
UF16	<10 ²	< 3	“	“
UF17	<10 ²	< 3	“	“
UF18	<10 ²	< 3	“	“
UF19	<10 ²	8,7	“	“
UF20	<10 ²	< 3	“	“
UF21	<10 ²	< 3	“	“
UF22	<10 ²	< 3	“	“
UF23	<10 ²	< 3	“	“
UF24	<10 ²	< 3	“	“
UF25	<10 ²	> 1100	“	“
UF26	<10 ²	< 3	“	“
UF27	<10 ²	< 3	“	“
UF28	<10 ²	< 3	“	“
UF29	<10 ²	< 3	“	“
UF30	<10 ²	< 3	“	“
UF31	<10 ²	< 3	“	“
LMEL^a	5x10²	5x10²	Ausência	Ausência

^a Limite Máximo Estabelecido por Legislação (Resolução – RDC nº12 da ANVISA, de 2 de jan. de 2001).

* O NMP/g foi verificado conforme a tabela 1 (3 tubos cada) do apêndice do Bacteriological Analytical Manual Online (Garthright, 1998)