

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

FERNANDA DANIELLE MELO

AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO E SUA RELAÇÃO COM O
PERÍODO DE MATURAÇÃO

LAGES, SC

2013

FERNANDA DANIELLE MELO

**AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO
QUEIJO ARTESANAL SERRANO E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO DE
MATURAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências
Agroveterinárias da Universidade do Estado de
Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Maria Ferraz.

Co-orientador: Profa. Dra. Eliana Knackfuss Vaz.

LAGES, SC

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Melo, Fernanda Danielle

Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com o período de maturação. / Fernanda Danielle Melo; orientadora: Sandra Maria Ferraz. – Lages, 2013.
46f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. *Salmonella* sp. 3. *Staphylococcus aureus*. 4. Coliformes totais. 5. *Escherichia coli*. I. Título.

CDD – 637.3

FERNANDA DANIELLE MELO

**AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO
QUEIJO ARTESANAL SERRANO E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO DE
MATURAÇÃO.**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Banca Examinadora

Orientadora: _____
Professora Dra. Sandra Maria Ferraz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Membro: _____
Professora Dra. Eliana Knackfuss Vaz
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC.

Membro: _____
Professora Dra. Andrea Troller Pinto
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

Lages, 22 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as oportunidades em minha vida.

A minha família meus pais Maria e João Melo e meus irmãos Renata e Anderson Melo pelo amor, incentivo e apoio em todos os momentos.

A prof^a. Sandra Maria Ferraz pela orientação, confiança e amizade durante o mestrado.

A prof^a Eliana K. Vaz pela atenção e amizade e ao prof. André Thaler pelo apoio e dedicação fundamentais ao trabalho.

Aos meus colegas de mestrado Alais Dall Agnol, Márcio V. Ramella, Dayane Dambrós, Claudia Pies, Franciane Batista, Tatiane S. Martins, Sheyla M. Rodakiewicz e Camila Y. Lenocho por toda colaboração ao trabalho.

A todos os integrantes do laboratório CEDIMA em especial ao prof. Ubirajara, Fabiana Forell, Marcella N. Pereira, Sandro Jorge, Caroline Martini, Sara Zarth, Paula Wildelmann, Gabriele Ramos e Stéfano Caon por toda a ajuda imprescindível para realização do projeto.

A Caroline Pissetti por todo auxílio e paciência que teve comigo e a Karine A. Dalmina sempre disposta a ajudar independente do dia ou hora.

Ao prof. Gilberto M. Ide pela confiança em mim e a toda equipe da EPAGRI pelo auxílio nas coletas.

Enfim, a todos os meus amigos sempre presentes em especial a Zenita Eineck, Marilene Velho, Viviane F. Velho e Lúcia H. Baggio por todo carinho e incentivo dedicados a mim.

RESUMO

MELO, Fernanda Danielle. **Avaliação da Inocuidade e Qualidade Microbiológica do Queijo Artesanal Serrano e sua Relação com o Período de Maturação.** 2013. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2013.

O queijo artesanal serrano de Santa Catarina é um produto típico produzido em pequenas propriedades rurais na Serrana Catarinense. Sua principal característica é ser fabricado a partir do leite cru, sem sofrer nenhum tratamento térmico que elimine os microrganismos patogênicos que podem estar presente. Este fato traz grandes implicações, principalmente, para saúde pública pelo risco desse produto causar doenças transmitidas por alimentos. A legislação vigente permite que queijos artesanais elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias, porém, declara a necessidade de estudos técnico-científicos a fim de comprovarem a melhor época de maturação, para que se possa garantir a qualidade e a inocuidade do produto. O presente estudo teve por objetivo realizar o isolamento e a identificação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e o isolamento e quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes totais e relacionar o tempo de maturação com a contaminação dos queijos artesanais, verificando assim, a melhor época de maturação para comercializar um produto que seja seguro ao consumidor. O experimento foi conduzido utilizando 108 amostras de queijo artesanais serranos provenientes de várias cidades da Região Serrana de SC, com períodos de maturação entre 14, 28, 42 e 63 dias. No Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal - CEDIMA foram realizadas as seguintes análises: pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o método USDA/2009 e isolamento de *Salmonella* sp. segundo a metodologia ISO 6579/2007. As bactérias identificadas como *Listeria monocytogenes* foram enviadas para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz. A contagem de *Staphylococcus aureus*, Coliformes Totais e *Escherichia coli* foi realizada em placas de petrifilm™. A qualidade higiênico-sanitária dos queijos analisados foi insatisfatória, pois a presença de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes totais encontrou-se acima dos valores permitidos pela legislação, indicando deficiência nos procedimentos de higiene durante a fabricação do produto. A *Salmonella* sp. não detectada em nenhuma das amostras, porém, a presença de *Listeria monocytogenes* torna o queijo impróprio para o consumo humano, uma vez que oferece risco potencial a saúde do consumidor. O período até 60 dias maturação não influenciou estatisticamente no isolamento dos microrganismos analisados.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp.. *Staphylococcus aureus*. Coliformes Totais. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

MELO, Fernanda Danielle. **Assessment of Microbiological Safety and Quality of handmade Cheese Serrano and its Relation to the Ripening Period.** 2013. 46 f. Dissertation (MSc in Animal Science) - University of the State of Santa Catarina. Postgraduate Program in Animal Science, Lages, 2013.

The handmade serrano cheese of Santa Catarina is a typical product made on small farms in the Serrana Region Catarinense. Its main feature is to be manufactured from raw milk without suffering any heat treatment in order to eliminate pathogenic microorganisms that may be present. This fact has major implications, especially for the public health risk that product cause foodborne illness. Current law allows handmade cheeses from raw milk to be aged for a period less than 60 days, however, but also declares the need for technical-scientific studies to prove the best time of maturation, to ensure the quality and safety of the product. The present study aimed to realize the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. and isolating and quantifying *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and total coliforms and relate the maturation time with contamination of handmade cheeses, thus verifying the best time of maturation to make a product that is safe for consumers. The experiment was conducted using 108 samples of handmade serranos cheese from various cities in the mountainous region of SC, with maturity periods of between 14, 28, 42 and 63 days. In Animal Microbiological Diagnostic Center - CEDIMA were performed the following analyzes: isolation of *Listeria monocytogenes* using the method USDA/2009 and of *Salmonella* sp. methodology according to ISO 6579/2007. The bacteria identified as *Listeria monocytogenes* were sent for serotyping the Instituto Oswaldo Cruz Foundation. The enumeration of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and Total Coliform was performed on petrifilm™ plates. The sanitary quality of the cheeses analyzed was unsatisfactory, because the presence of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and total coliform was found above the levels permitted by law, indicating deficiency in hygiene procedures during manufacture of the product. *Salmonella* sp. not detected in any sample, but, the presence of *Listeria monocytogenes* makes cheese unfit for human consumption, as it offers potential risk to consumer health. The maturing period up to 60 days did not affect the isolation of the microorganisms statistically analyzed.

Keywords: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp.. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Total Coliform.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de isolamento e quantificação de Coliformes Totais e <i>Escherichia coli</i> de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.....	36
Tabela 2. Frequência de isolamento e quantificação de Coliformes Totais, <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> acima de 10 ³ UFC/25g de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.....	37
Tabela 3. Frequência de isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> sp., <i>Listeria</i> sp. e <i>Listeria monocytogenes</i> de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.	39
Tabela 4. Resultados médios dos parâmetros físico-químicos de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1.1 Maturação do Queijo Artesanal Serrano.....	13
2.2 Segurança Alimentar.....	14
2.2.1 Microrganismos indicadores	16
2.2.1.1 Coliformes totais.....	16
2.2.1.2 <i>Escherichia coli</i>	17
2.2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	18
2.2.3 <i>Salmonella</i> sp.	20
2.2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO DE MATURAÇÃO	31
RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	43
AGRADECIMENTOS	49
APÊNDICE	50

1 INTRODUÇÃO

A região serrana de Santa Catarina é reconhecida por possuir clima, vegetação, altitude, costumes e tradição peculiares, o que a diferencia das demais regiões do estado. Devido a essas heterogeneidades existem alguns produtos típicos demarcados pelas características da região. Dentre estes produtos, o queijo artesanal serrano é produzido tradicionalmente em muitas propriedades da região.

O queijo artesanal serrano é um produto típico, produzido com leite cru, obtido da ordenha de vacas de raças de corte ou mista, alimentadas principalmente com pastagem nativa, resultando em um leite com maior percentual de gordura, fatores estes, que o diferencia de outros queijos produzidos artesanalmente. Sua produção é de grande impacto econômico, por ser indispensável para a composição da renda de muitos produtores que tem nessa atividade sua principal fonte de sobrevivência.

Embora seja um produto muito difundido na região e altamente apreciado pelos consumidores, o queijo artesanal serrano é fabricado e comercializado as margens da legislação, tal fato explica a falta de informações sobre a qualidade e inocuidade do produto.

A principal característica do queijo artesanal serrano é ser produzido a partir do leite cru, sem sofrer nenhum tratamento térmico que elimine os microrganismos patogênicos que possam estar presentes. Sendo assim, a única forma de eliminação ou diminuição até níveis permitidos pela legislação destes agentes patogênicos é através do processo de maturação. A maturação consiste em processos físicos, químicos e microbiológicos que desfavorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas, porém durante esse processo devem-se obedecer as boas práticas de fabricação e o prazo mínimo de maturação necessário.

A legislação vigente permite que a maturação de queijos elaborados a partir de leite cru seja inferior a 60 dias. No entanto, destaca a necessidade de estudos técnico-científicos a fim de comprovarem a melhor época de maturação, para que se possa garantir a qualidade do produto.

Produtos artesanais podem conter microrganismos de origens diversas (ambiente, matéria-prima, manipulador), alguns de grande relevância para saúde pública pela capacidade de causar toxinfecções alimentares a exemplo, *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*. A presença de coliformes totais é um indicadores da qualidade microbiológica, sua presença em níveis elevados é utilizada para avaliar as condições higiênico-sanitárias ou de processamento de um alimento.

Devido a falta de informações sobre os parâmetros do queijo artesanal Serrano, a EPAGRI juntamente com Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV/ UDESC, desenvolveram um projeto para buscar uma indicação geográfica para o queijo artesanal Serrano, legalizar a sua comercialização, realizar a caracterização e descrição dos processos de fabricação e realização de análises laboratoriais (química, sensorial, física e microbiológica).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade através da contagem de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e Coliformes Totais e a inocuidade com o isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. do queijo artesanal Serrano com diferentes estágios de maturação. Fornecendo assim, informações precisas sobre a melhor época de maturação para garantir a comercialização de um produto seguro para o consumidor e servirá também de subsídio para a identificação e qualificação do queijo artesanal Serrano do estado de Santa Catarina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUEIJO ARTESANAL SERRANO

A Serra Catarinense é considerada a região mais alta e fria do sul do Brasil, por possuir, mais de 70% de sua área territorial acima de 900 metros altitude e algumas regiões que chegam atingir 1800 metros acima do nível do mar. A temperatura média anual varia de 13 a 16°C (CRUZ *et al.*, 2008; CÓRDOVA *et al.*, 2011).

A região serrana possui o maior rebanho bovino de corte do estado e tem na pecuária uma expressiva fonte de renda, a qual é praticada da forma tradicional (sistema de produção extensivo à base de campo nativo). É neste contexto que se insere a produção do queijo artesanal serrano, produto típico dos campos de altitude dos estados de Santa Catarina e do Rio Grande do Sul (AMBROSINI; FILIPPI, 2008; CRUZ *et al.*, 2008).

Fabricado desde a época do tropeirismo com uma receita passada de geração a geração há aproximadamente duzentos anos, o queijo serrano constitui um produto de grande importância econômica e social (CÓRDOVA *et al.*, 2009; KRONE; MENASCHE, 2010). A sua produção e comercialização estão presentes em todos os municípios da região serrana. Sendo que, a maioria dos pecuaristas familiares tem nessa atividade a principal fonte de renda, a qual assegura a manutenção da família (IDE; BENEDET, 2001; CÓRDOVA *et al.*, 2009).

O queijo artesanal serrano é fabricado com leite não pasteurizado de bovinos de diversas raças, bem como seus cruzamentos (desde animais mais especializados para produção de leite até raças de corte e mista), alimentados à base de pastagens naturais. O queijo é feito logo após a ordenha com a adição do coalho e acidificação de forma artesanal, separado do soro e maturado durante tempo variável. A produção ocorre na propriedade em uma sala geralmente anexa ao galpão ou a casa, utilizando mão de obra familiar (CÓRDOVA *et al.*, 2011).

É um produto marcado pela heterogeneidade dos processos de produção, pois não há padrão de técnicas de fabricação entre as propriedades produtoras, resultando na grande diversidade de composição, formato e peso dos queijos (ZAFFARI; MELLO; COSTA; 2007; KRONE; MENASCHE, 2010). A sua

comercialização acontece o ano inteiro, embora, ainda seja de forma ilegal (CORDOVA *et al.*, 2011).

A principal característica do queijo artesanal serrano é ser fabricado a partir do leite cru, sem passar por nenhum processo térmico que elimine os microrganismos patogênicos, os quais podem estar presentes no leite, ou contaminar o produto durante a sua fabricação (IDE; BENEDET, 2001). Assim, falhas no controle de boas práticas de fabricação podem resultar em um produto de má qualidade, constituindo um risco para saúde do consumidor (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

Dados sobre a qualidade microbiológica do queijo artesanal produzido na Serra Catarinense são escassos na literatura. No entanto, o queijo é altamente apreciado pelos consumidores, sendo um grande motivo de preocupação principalmente para saúde pública (IDE; BENEDET, 2001; AYUB; SOUZA, ROSA; 2003). Produtos artesanais podem conter microrganismos de origens diversas (animal, ambiente e homem), resultando em um produto de má qualidade pelo risco de causar intoxicações e toxinfecções nos consumidores (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

Na produção de queijos maturados pode-se utilizar leite cru, desde que, seja respeitado o período de maturação e utilizadas às boas práticas de fabricação, que incluem desde a utilização de um leite de alta qualidade até rígida higiene no local de produção (PERRY, 2004).

A legislação vigente permite que a maturação de queijos elaborados a partir de leite cru seja inferior a 60 dias, porém, enfatiza a necessidade de estudos técnico-científicos a fim de comprovarem a melhor época maturação para que se possa garantir a qualidade e a inocuidade do produto (BRASIL, 2011).

No entanto, na maioria das vezes por pressão dos próprios consumidores, os produtores acabam vendendo seus queijos com um tempo de maturação não adequado, esse comportamento representa um risco à saúde do consumidor (PERRY, 2004).

2.1.1 Maturação do Queijo Artesanal Serrano

A maturação consiste em uma série de processos complexos que alteram a composição físico-química e microbiológica do queijo e geram-se substâncias responsáveis por seu sabor e aroma, devido, à perda de umidade e aumento da proteólise e lipólise (MEYRAND *et al.*, 1998; MENDOZA; OYÓN, 2002; AYUBE; SOUZA; ROSA, 2003; PERRY, 2004).

Quando um queijo é fabricado a partir do leite cru todos os microrganismos presentes no leite passarão a coalhada. De todos os que existem no leite alguns se multiplicarão rapidamente desde o início da maturação (lactococos), outros se multiplicarão mais ativamente em etapas mais avançadas (lactobacilos), outros terão seu crescimento inibido ao longo do período, devido às condições presentes no queijo em processo de maturação não serem as mais adequadas a sua multiplicação e outros desaparecerão durante o período de maturação (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Os coliformes competem com as bactérias lácticas quando o pH é elevado, como no leite, e a temperatura é adequada. Por isso, apresentam um aumento durante os primeiros períodos, mas à medida que a acidez aumenta e a atividade de água (a_w) diminui, esses microrganismos começam a diminuir podendo até mesmo desaparecer aos três a quatro meses. A taxa de contaminação inicial do produto é diretamente proporcional ao valor máximo que os coliformes podem alcançar. Se a taxa for muito elevada, podem provocar o estufamento precoce do queijo devido ao gás produzido por esses microrganismos e se a taxa inicial for muito baixa, ficam apenas pequenos orifícios distribuídos pela massa (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

Acredita-se que as bactérias patogênicas tenham desenvolvimento semelhante aos coliformes, já que, também são muito sensíveis a acidez e a baixas a_w . Uma vez que, suas taxas são menores admite-se que ao longo do período de maturação, esses microrganismos terão desaparecido ou pelo menos, seu número será tão baixo que não chegarão a causar danos à saúde do consumidor (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Sendo assim, pode-se considerar a maturação, uma das principais formas de melhorar a qualidade microbiológica dos queijos produzidos a partir do leite cru (MEYRAND *et al.*, 1998; PERRY, 2004).

Ortolani *et al.* (2010) em seu estudo observaram que as bactérias ácidos lácticas oriundas de queijos fabricados a partir do leite cru, podem interferir significativamente na sobrevivência de patógenos nos alimentos, favorecendo assim, a qualidade microbiológica do produto. A proteção do alimento contra microrganismos patogênicos pelas bactérias ácido lácticas está associada principalmente a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, altas concentrações de sais e ambiente anaeróbio entre outros fatores (SCHILLINGER; LÜCKE, 1989; FORSYTHE, 2007).

Os ácidos orgânicos (láctico, acético e propiônico) interferem na força protomotiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana. A produção de peróxido de hidrogênio deve-se a ausência da enzima catalase nas bactérias ácido lácticas, esse composto pode causar oxidação da membrana citoplasmática bacteriana. A nisina (bacteriocina) tem amplo espectro inibitório contra bactérias Gram positivas (FORSYTHE, 2007).

A legislação anterior determinava que queijos produzidos a partir de leite cru deveriam maturar por um período de no mínimo 60 dias, porém atualmente, durante a produção destes queijos é permitido que seja utilizado um período de maturação inferior, desde que, seja obedecido um prazo mínimo o qual deve ser comprovado por estudos técnico-científicos, afim de garantir a qualidade e a inocuidade do produto (BRASIL, 2011).

2.2 SEGURANÇA ALIMENTAR

Há uma série de microrganismos patogênicos que frequentemente contaminam os alimentos, podendo representar um risco a saúde do consumidor, pela capacidade de causar intoxicações ou toxinfecções, através da ingestão de células viáveis ou de seus metabólitos tóxicos, respectivamente (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Os microrganismos patogênicos estão amplamente distribuídos no ambiente, assim sendo, as principais fontes de contaminação do alimento são: solo, água, plantas, utensílios, trato intestinal do homem e de animais, manipuladores de alimentos, ração animal, animais, ar e pó (FORSYTHE, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Portanto, é inevitável que produtos crus utilizados como ingredientes carreguem contaminação patogênica (FORSYTHE, 2007).

O leite é considerado um alimento completo para a dieta humana pela sua composição altamente nutritiva. De forma semelhante, constitui um meio de cultura adequado para o crescimento de diversos microrganismos (inclusive os patogênicos). Uma variedade de fatores como: manejo, alimentação e potencial genético do rebanho, obtenção e armazenagem, influenciam na qualidade do leite cru (MÜLLER, 2002; ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

O queijo é um importante derivado do leite, tanto pela sua grande aceitação por parte dos consumidores, como pelo seu valor nutritivo (ARAÚJO *et al.*, 2001). No entanto, é frequentemente considerado um veículo de patógenos de origem alimentar, principalmente, queijos frescos artesanais não maturados devidamente (FEITOSA *et al.*, 2003).

Fabricação de produtos artesanais, como o queijo serrano, necessita seguir as boas práticas de fabricação e a matéria prima (leite) deve ser oriunda de animais em condições sanitárias adequadas. Da mesma forma, as condições de processamento, armazenamento e comercialização, podem comprometer suas características sensoriais, bem como, tornar o produto impróprio para o consumo humano, pela contaminação por microrganismos indesejáveis (ARAÚJO *et al.*, 2001; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

Entre os patógenos que podem ser encontrados contaminando o leite e seus derivados, causando surtos ou casos de intoxicações ou toxinfecções estão a *Escherichia coli* que pertence ao grupo dos coliformes termotolerantes ou a 45°C, *Staphylococcus aureus* que pertence ao grupo dos Estafilococos coagulase positiva, *Salmonella sp.* e a *Listeria monocytogenes*. A fabricação de queijos com a utilização de leite cru deve receber cuidados especiais, principalmente quanto à procedência da matéria prima e ao processo de produção, para evitar danos à saúde do consumidor. Considerando a importância destes agentes para saúde pública, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da resolução – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, determina os limites máximos para estes microrganismos nos alimentos.

2.2.1 Microrganismos indicadores

Os microrganismos indicadores vêm sendo cada vez mais utilizados, devido à dificuldade na detecção de alguns microrganismos patogênicos na rotina laboratorial para avaliação da segurança e higiene da água e de alimentos. São um grupo de microrganismos que quando presentes no alimento fornecem informações sobre: a ocorrência de contaminação fecal, a presença de possíveis patógenos ou a deterioração do alimento e indicam as condições sanitárias inadequadas durante o processo de fabricação ou armazenamento (FORSYTHE, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Dentre os indicadores estão os coliformes totais, coliformes termotolerantes, bactérias aeróbias mesófilas, psicotróficas, estafilococos, entre outros (FORSYTHE, 2007; FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAMES, 2008).

2.2.1.1 Coliformes totais

O grupo coliforme compreende bactérias entéricas e ambientais, por isso são denominadas coliformes totais. As bactérias deste grupo pertencem aos gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. Todos exibem desenvolvimento ótimo a 35°C, são bacilos Gram-negativos, aeróbios, capazes de fermentar a lactose, com produção de gás em 24 a 48 horas a 35°C. São encontrados no intestino de animais e do homem e nas fezes que contaminam o solo e água (OLIVEIRA, 2000; SILVA *et al.*, 2010).

Microrganismos indicadores são utilizados para avaliar as condições higiênico-sanitárias ou de processamento de um alimento (GAVA, SILVA, FRIAS, 2008). Devido ao fato, de apenas a *Escherichia coli* ter como habitat primário o trato intestinal do homem e animais, a presença de coliformes totais não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.2.1.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* está incluída nos grupos dos coliformes termotolerantes. São capazes de fermentar a lactose, com formação de gás em 48h a 44 – 45,5°C (JAMES, 2008; SILVA *et al.*, 2010). É uma bactéria que possui várias linhagens, algumas são encontradas colonizando o trato intestinal do homem e de animais de sangue quente e outras podem provocar doenças graves. Muitas linhagens de *E. coli* são de baixa virulência mas podem causar infecções oportunistas em locais extra-intestinais, já as linhagens patogênicas podem provocar sérias manifestações clínicas e inclusive a morte (QUINN *et al.*, 2005).

Em trabalho realizado na região serrana de Santa Catarina com o objetivo de conhecer e contribuir para a qualidade de queijos artesanais, foram analisadas 20 amostras de queijos, sendo que 52% das amostras estavam contaminadas na faixa de $1,5 \times 10^3$ UFC/g e 48% na faixa de $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^5$ UFC/g de coliformes de origem fecal (IDE; BENEDET, 2001). Em trabalho semelhante, Zaffari, Mello e Costa (2007), analisaram 80 amostras para avaliar a qualidade microbiológica de queijos artesanais comercializados em estradas litorâneas no norte do Rio Grande do Sul, em seus resultados encontraram 84% das amostras com contagens de coliformes fecais acima do limite permitido pela legislação.

Ao investigar a qualidade do queijo de Minas artesanal do Serro, Minas Gerais, Brant, Fonseca e Silva (2007) constataram que, 80% e 60% das 40 amostras analisadas estavam em desacordo quanto ao número de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, respectivamente. Enquanto que Feitosa *et al.* (2003) encontraram em queijo Coalho e Manteiga, produzidos no estado do Rio Grande do Norte, a presença de coliformes fecais dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, indicando baixo nível de contaminação fecal.

Embora a contagem de coliformes totais não seja exigida pela legislação vigente, sua presença em níveis elevados indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto, uma vez que, estes microrganismos geralmente são contaminantes ambientais (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007). A presença de *E. coli* em alimentos indica condições inadequadas de higiene durante ou após a fabricação do produto e sugere a presença de enteropatógenos, por ser um indicador de contaminação fecal (SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.2.2 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Os estafilococos são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, catalase positiva, imóveis, oxidase-negativa e não formam esporos. Encontra-se amplamente distribuídos no mundo todo, como comensais da pele de animais e de humanos. Também são encontrados em membranas mucosas do trato respiratório superior e urogenital inferior e como transitórios no trato digestivo, sendo relativamente estáveis no meio ambiente (QUINN *et al.*, 2005).

O *Staphylococcus aureus* é a espécie de maior interesse (dentro do grupo dos estafilococos coagulase positiva) para a microbiologia de alimentos por provocar intoxicações de origem alimentar bastante frequente em nosso meio, principalmente nas épocas quentes do ano (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GAVA; SILVA; FRIAS, 2008). Apresentam crescimento na faixa de 7°C a 47,8°C, e suportam variação de pH entre 4 a 9,8. São tolerantes a concentrações de 10% a 20% de NaCl e a nitratos, o que torna alimentos curados veículos potenciais para o crescimento desta bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A doença transmitida por *S. aureus* é uma intoxicação, provocada pela ingestão de toxinas pré-formadas no alimento, quando ocorre a multiplicação das células. As toxinas são proteínas de baixo peso molecular, resistentes à cocção e as enzimas proteolíticas. A ingestão de uma dose menor que 1 µg pode gerar os sintomas de intoxicação e essa quantidade é atingida quando a população de *S. aureus* obtém valores entre 10⁵ a 10⁶ UFC/g de alimento (SANT'ANA; AZEREDO, 2005; SILVA *et al.*, 2010).

Vários alimentos já foram incriminados em surtos, incluindo os produtos lácteos e derivados (principalmente queijos). Alimentos muito manipulados durante a fabricação, ou os que permanecem a temperatura ambiente depois da preparação são os de maior risco de provocarem intoxicação estafilocócica (SILVA *et al.*, 2010).

Os portadores nasais e os manipuladores de alimentos, com mãos e braços que apresentam feridas infectadas com *S. aureus* são importantes fontes de contaminação do alimento. Para prevenir a intoxicação estafilocócica é necessário evitar a contaminação do alimento e ou mantê-lo a baixas temperaturas (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Feitosa e colaboradores (2003) encontraram a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) em 72% das amostras de queijo de coalho e 84,7% das amostras de queijo manteiga, produzidos no estado do Rio Grande do Norte, com contagens variando de 7×10^4 a $1,3 \times 10^8$ UFC/g e $2,4 \times 10^2$ a $8,6 \times 10^6$ UFC/g respectivamente.

Em trabalho realizado no estado do Rio de Janeiro, com objetivo de avaliar a presença de *S. aureus* entre outros patógenos, foram coletadas 45 amostras de queijos de três diferentes marcas e destas amostras o *S. aureus* foi encontrado em 77% delas (ARAÚJO *et al.*, 2002). Valores semelhantes foram encontrados por Brant, Fonseca e Silva (2007) e Ferreira *et al.* (2010), que em seus trabalhos encontraram 82, 5% das amostras com contagem de SCP acima de 10^3 UFC/g e 78% das amostras com contagem de *S. aureus* acima do permitido pela legislação, respectivamente.

Rosengren *et al.* (2010) em pesquisa realizada com amostras de queijos na Suécia, encontraram 69% das amostras produzidas com leite cru e 6% das amostras fabricadas com leite pasteurizado contaminadas por SCP. Senger e Bizani (2011) avaliaram 60 amostras de queijo Minas Frescal (30 produzidos artesanalmente e 30 produzidos industrialmente) comercializado na cidade de Canoas, RS, 40% e 23,3% das amostras do queijo artesanal e industrial respectivamente, apresentaram-se contaminadas com valores de *S. aureus* acima do permitidos pela legislação. Semelhante a este estudo Salotti *et al.* (2006) encontraram 20% e 10% das amostra de queijos Minas Frescal, de origem artesanal e industrial respectivamente, comercializados no município de Jaboticabal, SP, com contagens de SCP acima do permitido pela legislação.

Por outro lado, Ortolani *et al.* (2010) encontraram baixos níveis de SCP em queijos produzidos por produtores rurais e comercializados em Viçosa, MG. Em estudo realizado nos EUA Brooks *et al.* (2012) avaliaram 41 amostras de queijos produzidos com leite cru e encontraram 7,3% (3) das amostras contaminadas por *S. aureus*, sendo que apenas uma amostra apresentava valor acima de 10^3 UFC/g.

A presença de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g (valor estabelecido como máximo para Estafilococos coagulase positiva pela legislação vigente) em queijos torna o produto impróprio para o consumo humano, por estar fora dos padrões sanitários. Práticas de higiene devem ser tomadas, afim de, prevenir a contaminação do produto. Sendo assim, cabe aos órgãos fiscalizadores executar a fiscalização nas

unidades produtoras, bem como, dar orientação e treinamento aos produtores sobre as boas práticas de fabricação (SENGER; BIZANI, 2011).

2.2.3 *Salmonella* sp.

As salmonelas são bacilos Gram negativos, não formam esporos, são móveis (com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum), anaeróbios facultativos, fermentam D-glicose e outros carboidratos com produção de gás e ácido. Geralmente não fermentam a lactose, indol e oxidase negativa e produtoras de gás sulfídrico. São resistentes a dessecação e congelamento, crescem entre sete a 45°C, com temperatura ótima de 37°C e suportam variação de pH entre 4,0 a 9,0, sendo que o pH ótimo fica próximo de sete (OLIVEIRA, 2000; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A nomenclatura proposta por *Kauffman e White* abriga a espécie de importância em medicina veterinária (salmonelas mais frequentes associadas à infecção humana) a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As salmonelas encontram-se amplamente distribuídas no ambiente, sendo seu principal habitat o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente, principalmente aves. Podem ser isoladas de carnes cruas, leite e derivados. As principais fontes são a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas (SILVA *et al.*, 2010). Porém, a contaminação inicial ocorre através das fezes (QUINN *et al.*, 2005).

Salmonella sp. é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em casos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil. Vários alimentos já foram incriminados em surtos de salmonelose incluindo o leite e seus derivados (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A presença de *Salmonella* sp. no alimento ocorre por manipulação inadequada ou contaminação cruzada (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA *et al.*, 2010).

A salmonelose ocorre geralmente através do consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* sp., e caracterizam-se por sintomas que incluem vômito, diarreia, febre e dores abdominais (GAVA; SILVA; FRIAS, 2008; SILVA *et al.*, 2010). Os sintomas aparecem de 12 a 36 horas após o contato com o microrganismo (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O homem e os animais podem se infectar sem apresentar sintomas, tornando-se portadores assintomáticos e assim,

excretam esporadicamente *Salmonella* sp., contaminando o ambiente e outros animais (UZZAU *et al.*, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A legislação brasileira estabelece ausência de *Salmonella* sp. em amostras mínimas de 25g de queijos e demais alimentos (BRASIL, 2001).

Feitosa *et al.* (2003), em seu trabalho realizado com amostras de queijos produzidas no estado do Rio Grande do Norte, detectaram a presença de *Salmonella* sp. em 9% das amostras de queijos de coalho e em 15% das amostras de queijo manteiga. Em trabalho semelhante Duarte *et al.* (2005) analisando a presença de patógenos em 127 amostras de queijo coalho, produzidos e comercializados no estado de Pernambuco, encontraram *Salmonella* sp. em 5,5% das amostras analisadas.

Salotti *et al.* (2006), Brant, Fonseca e Silva (2007), Santos-Koelln *et al.* (2009), Dalla Santa *et al.* (2010) e Ortolani *et al.* (2010) em relação a *Salmonella* sp. todas as amostras de queijos analisadas em seus estudos, encontraram-se dentro dos padrões exigidos pela legislação brasileira (ausência em 25 gramas do produto).

Resultados semelhantes foram encontrados por Brooks *et al.* (2012) que analisaram nos EUA 41 amostras de queijos produzidos com leite cru e em nenhuma delas foi detectada a presença de *Salmonella* sp. e por Menéndez *et al.* (2001) que, igualmente, não detectaram a presença deste microrganismo em 24 amostras de queijos produzidos com leite cru e comercializados em Galícia, Espanha. Enquanto, Santana *et al.* (2008) em seu trabalho encontraram 16 (26,7%) das amostras analisadas, positivas para *Salmonella* sp..

A presença de *Salmonella* sp. no alimento, pode ocorrer pela manipulação inadequada ou contaminação cruzada, tornando-o impróprio para o consumo humano, pelo risco a saúde do consumidor (UZZAU *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2010).

2.2.4 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é composto por cinco espécies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, e *L. welshimeri*. A *Listeria monocytogenes* é a espécie de maior importância em saúde pública por provocar infecções alimentares, sendo patogênica para o homem e podendo ser veiculada pelos alimentos. É um bacilo Gram-positivo pleomórfico sua temperatura ideal de crescimento é 37°C, mas

é capaz de crescer em baixas temperaturas. Essa bactéria é extremamente ubiqüitária podendo ser encontrada no solo, na água, nos alimentos e como membro da microbiota normal do homem e dos animais (BORGES *et al.*, 2009).

Importantes características da *L. monocytogenes* são suas habilidades em crescer em temperaturas que variam entre 0,4 até 45°C e em pH com variações de 5.0 até 9.0, a particularidade de crescer a baixas temperaturas propicia à bactéria a capacidade de multiplicar-se em alimentos mantidos a temperatura de refrigeração (CZUPRYNSKI, 2004; FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Listeriose é a doença causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. Pode causar encefalite, septicemia e aborto em bovinos, ovinos, caprinos e humanos. Os sinais em humanos podem ser precedidos por sintomas semelhantes à gripe, podendo progredir para alterações mais graves como sintomas gastrointestinais, septicemia, meningite, encefalite, infecção cervical, aborto, endocardite, lesões granulomatosas no fígado e outros órgãos, abscessos internos ou externos, lesão cutânea papular e até a morte (SILVA *et al.*, 2010). Gestantes, recém-nascidos, idosos, pacientes submetidos à hemodiálise, terapias prolongadas com corticosteróides e imunodeprimidos são a população suscetível (BRANCO *et al.*, 2003; BORGES *et al.*, 2009).

L. monocytogenes tem sido isolada de diferentes alimentos tais como leite cru e pasteurizado, queijos, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha e refeições preparadas (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A transmissão está associada à ingestão do alimento contaminado. Queijos em processo de maturação podem constituir um meio para o crescimento de *Listeria* sp. e são causas frequentes de surtos (SILVA *et al.*, 2010).

Considerando a importância deste microrganismo em produtos lácteos, a legislação brasileira estabelece ausência desse patógeno em 25g de queijos com média, alta e muito alta umidade (BRASIL, 2001). Borges e colaboradores (2009) relatam que entre os produtos lácteos, queijos de média e alta umidade são os mais comumente contaminados por *L. monocitogenes*.

Ramos e Costa (2003) avaliaram 58 amostras de queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus, AM e encontraram em duas amostras a presença de *Listeria* sp. sendo uma *L. monocytogenes*. Em seu trabalho Feitosa *et al.* (2003) detectaram 9% das amostras de queijo de coalho e 15% das amostras de

queijo manteiga positivas para *Listeria* sp., porém, não foi detectada a presença de *L. monocytogenes*. Valores semelhantes foram encontrados por Branco *et al.* (2003) que ao analisarem 84 amostras de queijo de coalho industrializado e comercializado na cidade de Fortaleza, CE, observaram 16 (19%) das amostras positivas para *L. monocytogenes*, 5 (5,9%) positivas para *L. innocua* e 1 (1,2%) positivas para *L. grayi*.

Duarte *et al.* (2005) avaliaram 127 amostras de queijo de coalho produzidos e comercializados no estado de Pernambuco, das quais 9,5% apresentaram-se positivas para *Listeria* sp. e 5,5% para *L. monocytogenes*. Em seu trabalho Menéndez *et al.* (2001) detectou a presença de *L. monocytogenes* em duas amostras de queijos produzido a partir de leite cru em Galícia, Espanha.

No entanto, Iurlina e Fritz (2004), Salotti *et al.* (2006) e Brant, Fonseca e Silva (2007) não detectaram a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas em seus estudos. Ortolani *et al.* (2010), Rosengren *et al.* (2010) e Pinto *et al.* (2011), não encontraram nas amostras de queijo analisadas a presença de *L. monocytogenes*. O mesmo ocorreu com Brooks *et al.* (2012) em trabalho realizado nos EUA que encontraram ausência deste microrganismo em suas análises.

A ausência de *L. monocytogenes* pode ser determinada pela menor capacidade de competição dessa espécie em relação aos coliformes e aos *Staphylococcus* sp., e a ocorrência desses microrganismos em alimentos está na maioria das vezes, associada à contagens menores de outros contaminantes (BRANT *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMBROSINI, L. B.; FILIPPI, E. E. Sistema agroalimentar do queijo serrano: estratégia de Reprodução social dos pecuaristas familiares no sul do Brasil. In: IV CONGRESO INTERNACIONAL DE LA RED SIAL, 2008, Mar del Plata, Argentina. Disponível em: < <http://www.ufrgs.br/pgdr/arquivos/586.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.
- ARAÚJO, W. N.; SILVA, M. H.; MARTINEZ, T. C. N.; SILVEIRA, V. F.; BARROS, S. L. B.; SILVA, A. A. F. Isolamento e identificação de coliformes no queijo Minas comercializado na região metropolitana de Salvador/Bahia. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 37 – 42, 2001. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/605/339>>. Acesso em: 24 set. 2012.
- ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of Staphylococcus and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Washington DC, v. 92, p. 1172 – 1177, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01656.x/pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.
- AYUB, M. A. Z.; SOUZA, C. F. V. de.; ROSA, T. D. Change in the microbiological and physicochemical characteristics of serrano cheese during manufacture and reopening. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 260 – 266, 2003 / ISSN 1517 – 8382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a16.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.
- BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C. de.; ARCURI, E. F. A.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. **Listeria monocytogenes em leite e produtos lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009 / ISSN 1677-1915. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_119.pdf>. Acesso em: 04 out. 2012.
- BRANCO, M. A. de A. C.; FIGUEIREDO, E. A. T. de; BORGES, M. de F.; SILVA, M. C. D. da; DESTRO, M. T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 21, n. 2, p. 393 – 408, 2003 / ISSN: 19839774. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/alimentos/article/viewArticle/1173>>. Acesso em: 04 out. 2012.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro- MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.59, n.6, p. 1570 – 1574, 2007. Disponível em: <<http://www.vet.ufmg.br/editora/arquivo-brasileiro-de-medicina-veterinaria-e-zootecnia>>. Acesso em: 24 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Instrução Normativa Nº 57. Brasília, 16 de dezembro de 2011. Disponível em: < <http://sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2011/12/Instruc%CC%A7a%CC%83o-Normativa-n57.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução, RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 24 set. 2012.

BROOKS, J. C. MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, p. 154 – 158, 2012 / DOI 10.1016/j.bbr.2011.03.031. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012000792> >. Acesso em: 24 set. 2012.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **Projeto de Qualificação e Certificação do Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Altitude de Santa Catarina** – Relatório Final. Convênio Epagri/Mapa 00132/2007. Florianópolis, 2009.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2011.

CRUZ, F. T da; MENASCHE, R.; KRONE, E. E.; WAGNER, S. A. Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Cima da Serra: o *saber – fazer* tradicional desafiando a qualidade. In: IV CONGRESSO INTERNACIONAL DE LA RED SIAL, 2008, Mar del Plata, Argentina. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/pgdr/arquivos/664.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

CZUPRYNSKI, C. *Listeria*. In: GYLES, C. L. *et al. Pathogenesis of bacterial infections in animal*, 3 ed. Blackwell Publishing, 2004, p. 99 – 110.

DALLA SANTA, O. R.; PELOZATO, E. C.; SANTOS, dos M.; SILVA, T. V.; MIMURA, H. J.; ALVAREZ, D. C.; DALLA SANTA, H. S. Qualidade microbiológica de queijos colonial elaborados em pequenas propriedades rurais de Guarapuava, PR. **Ciência e Cultura**, Barretos, v. 25, n. 1, p. 39 – 44, 2010 / ISSN 1980 – 0029.

DUARTE, D. A. M; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M; M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297 – 302, 2005. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/arq/V72_3/duarte.PDF>. Acesso em: 04 out. 2012.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F. de. MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp., e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, p. 162 – 165, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v23s0/19490.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

FERREIRA, B. G. OLIVEIRA, A. C. S. de.; MARSON, J. M.; TERRA, A. P. S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “Minas Frescal” comercializados na região do Triângulo Mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 3, p. 575 – 589, 2010 / ISSN: 01000233. Disponível em: <<http://inseer.ibict.br/rbsp/index.php/rbsp/article/viewFile/57/56>>. Acesso em: 24 set. 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2007.

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

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B. da.; FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao Conhecimento do Queijo Colonial Produzido na Região Serrana de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351 – 1358, 2001. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/adm/upload/revista/25-6-2001_13.pdf>. Acesso em: 24 set. 2012.

IURLINA, M. O.; FRITZ, R. Microbiological quality of Port Salut Argentino cheese stored at two temperature treatments. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, v. 37, p. 739 – 748, 2004. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/microbiological-quality-of-port-salut-argentino-cheese-stored-at-two-4tl9tXOwcv>>. Acesso em: 04 out. 2012.

JAMES, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KRONE, E.E.; MENASCHE, R. Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS): práticas, saberes e modos de vida de pecuaristas familiares produtores do queijo serrano. **Ateliê Geográfico**, Goiânia, v. 4 n. 10, p. 61 – 85, 2010. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/atelie/article/view/9908/6769>>. Acesso em: 24 set. 2012.

MENDOZA, C.; OYÓN, R. Estudio comparativo de dos coberturas para queso llanero madurado. **Rev. Fac. Agron.**, Maracay, v. 28, p. 1 – 11, 2002. Disponível em: <<http://www.infolactea.com/descargas/biblioteca/401.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

MENÉNDEZ, S.; GODINEZ, R.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 151 – 158, 2001/ DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/microbiological-chemical-and-biochemical-characteristics-of-tetilla-WLBVBoHohQ>>. Acesso em: 04 out. 2012.

MEYRAND, A. BOUTRAND –LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GASPARD, C. E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G. LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, Washington DC, v. 85, p. 537 – 544, 1998/ DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.853531.x. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.853531.x/pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

MÜLLER, E. E. Qualidade do leite, células somáticas e prevenção da mastite. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NA REGIÃO SUL DO BRASIL, 2002, Maringá. **Anais do II Sul – Leite**. Maringá: UEM/CCA/DZO – NUPEL, 2002. p. 206 – 217. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/55/8/1901.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 set. 2012.

OLIVEIRA, S. J. de. **Microbiologia Veterinária: guia bacteriológico prático**. 2. ed. Canoas: ULBRA, 2000, 240 p.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A.; RODRÍGUEZ, M. I. C.; ÀLVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MINGUILLÓN, G. D. G. de F. HOZ PERALES, L. de la.; CORTECERO, M. D. S. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

ORTOLANI, M. B. T. YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 175 – 180, 2010 / DOI: 10.1089/fpd.2009.0390 Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2009.0390>>. Acesso em: 24 set. 2012.

PERRY, K. S. P. QUEIJOS: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293 – 300, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19276.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

PINTO, F. G. S.; SOUZA, M.; SALING, S. MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n. 2, p. 191 – 198, 2011. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/docs/arg/v78_2/pinto.pdf>. Acesso em: 04 out. 2012.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artemed, 2005.

RAMOS, S. DE N. M.; COSTA, C, A. da. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus – AM, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 33, n. 4, p. 613 – 618, 2003 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672003000400007>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672003000400007&script=sci_arttext>. Acesso em: 04 out. 2012.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 263 – 269, 2010 / doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005568>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n. 2, p.

171 – 175, 2006. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/arq/V73_2/salotti.PDF>. Acesso em: 24 set. 2012.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrefilm rsa® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 531 – 535, 2005 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000300023>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n3/27023.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M. MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, Á. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 60, n. 6, p. 1517 – 1522, 2008 / <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352008000600031>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0102-09352008000600031&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 04 out. 2012.

SANTOS-KOELLN, F. T. DOS; MATTANA, A.; HERMES, E. Avaliação microbiológica do queijo tipo mussarela e queijo colonial comercializado na região oeste do Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v. 03, n. 02, p. 66 – 74, 2009 / ISSN: 1981-3686. Disponível em: <<http://revistas.utfpr.edu.br/pg/index.php/rbta/article/view/484/351>>. Acesso em: 04 out. 2012.

SCHILLINGER, U; LÜCKE, F.K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington DC, v. 55, n. 8, p. 1901 – 1906, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC202976/pdf/aem00101-0055.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25 – 42, 2011 / ISSN 1981-8858. Disponível em: <<http://www.revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/259/251>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 352 – 359, 2006 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200018>. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30183.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2012.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 211.

UZZAU, S.; BROWN, D. J.; WALLIS, T.; RUBINO, S.; LEORI, G.; BERNARD, S.; CASADESÚS, J.; PLATT, D. J.; OLSEN, J. E. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiol. Infect.**, v. 125, p. 229 – 255, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2869595/pdf/11117946.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais Comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 003, p. 862 – 867, 2007/ ISSN 0103 – 8478. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22256/000607652.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 24 set. 2012.

AVALIAÇÃO DA INOCUIDADE E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO ARTESANAL SERRANO E SUA RELAÇÃO COM O PERÍODO DE MATURAÇÃO

*Evaluation of the safety and quality of microbiological artisan cheese serrano
and its relation to the period of maturity.*

RESUMO

O queijo artesanal serrano de Santa Catarina é um produto típico produzido em pequenas propriedades rurais na Serrana Catarinense. Sua principal característica é ser fabricado a partir do leite cru, sem sofrer nenhum tratamento térmico que elimine os microrganismos patogênicos que podem estar presente. Este fato traz grandes implicações, principalmente, para saúde pública pelo risco desse produto causar doenças transmitidas por alimentos. A legislação vigente permite que queijos artesanais elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 dias, porém, declara a necessidade de estudos técnico-científicos a fim de comprovarem a melhor época de maturação, para que se possa garantir a qualidade e a inocuidade do produto. O presente estudo teve por objetivo realizar o isolamento e a identificação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. e o isolamento e quantificação de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes totais e relacionar o tempo de maturação com a contaminação dos queijos artesanais, verificando assim, a melhor época de maturação para comercializar um produto que seja seguro ao consumidor. O experimento foi conduzido utilizando 108 amostras de queijo artesanais serranos provenientes de várias cidades da Região Serrana de SC, com períodos de maturação entre 14, 28, 42 e 63 dias. No Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal - CEDIMA foram realizadas as seguintes análises: pesquisa de *Listeria monocytogenes* segundo o método USDA/2009 e isolamento de *Salmonella* sp. segundo a metodologia ISO 6579/2007. As bactérias identificadas como *Listeria monocytogenes* foram enviadas para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz. A contagem de *Staphylococcus aureus*, Coliformes Totais e *Escherichia coli* foi realizada em placas de petrifilm™. A qualidade higiênico-sanitária dos queijos analisados foi insatisfatória, pois a presença de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e coliformes totais encontraram-se acima dos valores permitidos pela legislação, indicando deficiência nos procedimentos de higiene durante a fabricação do produto. A *Salmonella* sp. não detectada em nenhuma das amostras, porém, a presença de *Listeria monocytogenes* torna o queijo impróprio para o consumo humano, uma vez que oferece risco potencial a saúde do consumidor. O período de até 60 dias maturação não influenciou estatisticamente no isolamento dos microrganismos analisados.

Palavras chave: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp.. *Staphylococcus aureus*. Coliformes Totais. *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The handmade serrano cheese of Santa Catarina is a typical product made on small farms in the Serrana Region Catarinense. Its main feature is to be manufactured from raw milk without suffering any heat treatment in order to eliminate pathogenic microorganisms that may be present. This fact has major implications, especially for the public health risk that product cause foodborne illness. Current law allows handmade cheeses from raw milk to be aged for a period less than 60 days, however, but also declares the need for technical-scientific studies to prove the best time of maturation, to ensure the quality and safety of the product. The present study aimed to realize the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. and isolating and quantifying *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and total coliforms and relate the maturation time with contamination of handmade cheeses, thus verifying the best time of maturation to make a product that is safe for consumers. The experiment was conducted using 108 samples of handmade serranos cheese from various cities in the mountainous region of SC, with maturity periods of between 14, 28, 42 and 63 days. In Animal Microbiological Diagnostic Center - CEDIMA were performed the following analyzes: isolation of *Listeria monocytogenes* using the method USDA/2009 and of *Salmonella* sp. methodology according to ISO 6579/2007. The bacteria identified as *Listeria monocytogenes* were sent for serotyping the Instituto Oswaldo Cruz Foundation. The enumeration of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and Total Coliform was performed on petrifilm™ plates. The sanitary quality of the cheeses analyzed was unsatisfactory, because the presence of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and total coliform was found above the levels permitted by law, indicating deficiency in hygiene procedures during manufacture of the product. *Salmonella* sp. not detected in any sample, but, the presence of *Listeria monocytogenes* makes cheese unfit for human consumption, as it offers potential risk to consumer health. The maturing period up to 60 days did not affect the isolation of the microorganisms statistically analyzed.

Keywords: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* sp.. *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli*. Total Coliform.

INTRODUÇÃO

O queijo artesanal serrano é um produto típico da região serrana de Santa Catarina fabricado desde a época do tropeirismo com uma receita passada de geração a geração, há aproximadamente duzentos anos (CÓRDOVA *et al.*, 2009). Apesar de sua produção e comercialização ocorrerem às margens da legislação e da escassez de dados sobre sua qualidade microbiológica, este queijo é um produto extremamente difundido na região e altamente apreciado pelos consumidores, sendo de grande importância na vida econômica de pequenos produtores, que tem nessa atividade, uma das principais, quando não a principal fonte de renda para o sustento da família (IDE; BENEDET, 2001). Isso demonstra não só a importância social, mas também a cultural, impingidas no processo de fabricação e comercialização do produto.

Por ser fabricado a partir do leite cru o queijo artesanal serrano pode conter microrganismos patogênicos que podem estar presentes no leite, ou contaminar o produto durante a sua fabricação (IDE; BENEDET, 2001). Além disso, falhas no controle de boas práticas de fabricação podem resultar em um produto de má qualidade pelo risco de causar intoxicações e toxinfecções nos consumidores, constituindo um problema para saúde pública (ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

Sendo assim, a única forma de eliminação ou diminuição até níveis permitidos pela legislação destes microrganismos patogênicos é através do processo de maturação, o qual consiste em uma série de processos físicos, químicos e microbiológicos que desfavorecem o desenvolvimento de bactérias patogênicas. A legislação vigente permite que a maturação de queijos elaborados a partir de leite cru seja inferior a 60 dias. No entanto, destaca a necessidade de estudos técnico-científicos a fim de comprovarem a melhor época de maturação, para que se possa garantir a qualidade do produto (BRASIL, 2011).

Analisando a importância do queijo artesanal serrano frente sua produção e consumo, bem como a escassez de informações principalmente sobre sua qualidade microbiológica, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica através da contagem de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e Coliformes Totais e a inocuidade com o isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. do queijo artesanal Serrano com diferentes estágios de maturação. Fornecendo assim, informações precisas sobre a melhor época de maturação para

garantir a comercialização de um produto seguro para o consumidor e servirá também de subsídio para a identificação e qualificação do queijo artesanal Serrano do estado de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 108 amostras de queijos artesanais serranos para pesquisa de *Listeria* sp., *Salmonella* sp., Coliformes Totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de unidades produtoras dos queijos, as quais, participam do programa de apoio aos queijos artesanais de Santa Catarina.

As coletas foram realizadas em diferentes períodos aos 14, 28, 42 e 63 dias de maturação dos queijos. Após 14 dias de fabricação os queijos foram coletados nas propriedades de origem e os demais queijos produzidos, eram datados para que ocorresse a maturação no local de produção até os prazos das demais coletas. Em seguida os queijos eram acondicionados em embalagens de papel craft e transportados dentro de caixas isotérmicas ao Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV) em Lages, onde foram realizadas as análises microbiológicas (apêndice A). Ao chegarem ao laboratório os queijos eram pesados e após era removido aproximadamente um cm de espessura da parte externa e, em seguida, eram retiradas assepticamente amostras de 25 e 10g da parte interna de cada queijo para as análises bacteriológicas.

Estas amostras foram adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) estéril e 90 mL de caldo *University of Vermont* (UVM), respectivamente, ambas homogeneizadas em *Stomacher* por dois minutos. As diluições eram realizadas em tubos contendo 9,0 mL de solução salina (0,85%) estéril, para contagem de Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Logo depois de homogeneizadas, as amostras foram submetidas aos protocolos de identificação e quantificação (SILVA *et al.*, 2010).

Para identificação e quantificação de Coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* utilizou-se o sistema *Petrifilm*TM (método oficial da *Association of Analytical Communities* – AOAC) nº 991.14 para coliformes totais e *E. coli* e nº 2003.07 para *S.*

aures (SILVA *et al.*, 2010). O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expressos em UFC/25g de acordo com a diluição.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi conduzida segundo Silva e colaboradores (2010) seguindo a *International Organization for Standardization* - ISO 6579 (2007). Os isolados com perfil bioquímico compatíveis com *Salmonella* sp. foram confirmados pela prova de aglutinação com soro polivalente somático. Após a confirmação bioquímica e sorológica as cepas sugestivas, seriam encaminhadas para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo Silva e colaboradores (2010) seguindo a *United States Department of Agriculture* - USDA (2009), os isolados identificados foram enviados para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

L. monocytogenes (ATCC 7644), *Salmonella* sp. (ATCC 8327), *S. aureus* (ATCC 29213) e *E. coli* (ATCC 25922) foram utilizadas como controle de todos os procedimentos.

Amostras de queijo foram encaminhadas para a realização de análises físico-químicas no Núcleo de Inspeção e Tecnologia de Alimentos (NUTA) do CAV/UEDESC, seguindo a Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006.

Os valores encontrados no presente estudo foram comparados com valores de referência do Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, padronizados pela RDC nº 12 (Brasil, 2011) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e analisados estatisticamente utilizando o teste do Qui-quadrado (X^2) do pacote estatístico SAS com significância ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantificação de Coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* em relação ao período de maturação estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Frequência de isolamento e quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli* de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.

Dias de Maturação	Contagem/ Total (%)	
	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>
14	14/27 (12,96%) ^b	19/27 (17,59%) ^a
28	21/27 (19,44%) ^a	15/27 (13,89%) ^a
42	17/27 (15,74%) ^{ab}	18/27 (16,67%) ^a
63	11/27 (10,19%) ^b	12/27 (11,11%) ^a
Total	63/108 (58,33%)	64/108 (59,26%)

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Observou-se uma diminuição da população de coliformes totais e *E. coli* após 28 e 42 dias de maturação, respectivamente. No entanto, o período influenciou apenas a quantificação de coliformes totais, onde se observou uma diminuição significativa destes microrganismos aos 63 dias de maturação. Segundo Ordóñez *et al.* (2005) este fato pode ter ocorrido devido aos fenômenos que ocorrem ao longo do processo de maturação que envolvem entre outros, a acidificação do meio e diminuição da atividade de água (a_w), fazendo com que os coliformes comecem a diminuir podendo até desaparecer. O aumento da acidez encontrada no presente estudo após 28 dias (Tabela 4) indica que, este parâmetro pode ter influenciado o desenvolvimento dos coliformes.

No entanto, essas bactérias competem com as bactérias lácticas quando o pH é elevado e a temperatura é adequada, por isso, apresentam um aumento durante os primeiros períodos de maturação (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Semelhante a este trabalho Ortolani e colaboradores (2010) encontraram que a maturação foi importante para a redução na população de coliformes fecais. Evidenciando assim, que os fenômenos que ocorrem durante a maturação são os responsáveis pela diminuição e/ou eliminação de possíveis patógenos.

Outro resultado observado foi que, das 108 amostras 37 (34,26%) e 39 (3%) apresentaram contagens acima de 10^3 UFC/g (valor estabelecido como máximo pela legislação vigente para coliformes a 45°C) para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente (Tabela 2). Sendo que com um ponto de corte de 10^3 UFC/g, houve uma diminuição significativa na população de *E. coli* após 28 dias de maturação (Tabela 2), o que pode ser explicado também pelo aumento da acidez encontrado neste período. Embora a contagem de coliformes totais não seja exigida pela legislação vigente, sua presença em níveis elevados indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto, uma vez que, estes microrganismos geralmente são contaminantes ambientais (BRANT; FONSECA; SILVA, 2007). Sugerem ainda, a presença de possíveis patógenos ou a deterioração precoce do alimento. Por ser um indicador de contaminação fecal, a presença de *E. coli* pode indicar a ocorrência de outros enteropatógenos, devido a condições inadequadas de higiene durante ou após a fabricação do produto (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA; CAVALLI; OLIVEIRA, 2006). Análogo a este estudo Ide e Benedet (2001), Brant, Fonseca e Silva (2007) e Visotto *et al.* (2011) constataram a presença de altos níveis de coliformes a 45°C, evidenciando a baixa qualidade higiênico – sanitária dos queijos analisados em seus trabalhos. O consumo de queijos com contagens de *E. coli* acima de 10^3 UFC/g constitui um perigo para saúde pública, pois sabidamente algumas linhagens deste microrganismos são altamente patogênicas ao homem, podendo provocar sérias manifestações clínicas e inclusive a morte (QUINN *et al.*, 2005), por isso, deve-se evitar ou assegurar uma baixa contaminação inicial do produto de forma que, a maturação possa eliminar a presença do microrganismo.

Tabela 2. Frequência de isolamento e quantificação de Coliformes Totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* acima de 103 UFC/25g de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.

Dias de Maturação	Contagem/ Total (%)		
	Coliformes Totais	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
14	10/27 (9,26%) ^a	15/27 (13,89%) ^a	13/27 (12,04%) ^a
28	13/27 (12,04%) ^a	10/27 (9,26%) ^a	10/27 (9,26%) ^a
42	7/27 (6,48%) ^a	9/27 (8,33%) ^b	4/27 (3,70%) ^a
63	7/27 (6,48%) ^a	5/27 (4,63%) ^b	9/27 (8,33%) ^a
Total	37/108 (34,26%)	39/108 (36,11%)	36/108 (33,33%)

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

Trinta e seis/ 108 (33,33%) amostras analisadas exibiram contagens de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g (valor estabelecido como máximo pela legislação vigente para *Staphylococcus* coagulase positiva). A quantificação de *S. aureus* não foi influenciada pelo período de maturação. Porém, foi observada uma diminuição na sua contagem dos 14 aos 42 dias e após este período houve um aumento na população desse microrganismo (Tabela 2). Este fato demonstra que, até os 42 dias de maturação o *S. aureus* apresentou comportamento semelhante aos coliformes. No entanto, diferente de outros patógenos de origem alimentar, o *S. aureus* é mais resistente quanto às alterações de pH, baixa atividade de água e concentrações de até 25% de NaCl para o seu crescimento, possibilitando assim, que as células bacterianas sobrevivam em ambientes que seriam hostis para o desenvolvimento de outros microrganismos, devido às essas condições (SILVA *et al.*, 2010). Além disso, no presente estudo detectou-se o aumento no teor de NaCl dos 42 para os 63 dias de maturação nos queijos analisados (Tabela 4).

Assim como nesse estudo, Arqués *et al.* (2005) observou a diminuição deste microrganismo em queijos com 60 dias de maturação. Os resultados do presente experimento são semelhantes aos relatados por Brant, Fonseca e Silva (2007) que verificaram a diminuição da população de *Staphylococcus* coagulase positiva aos 30 dias de maturação do queijo-de-minas artesanal.

O alimento contaminado por *S. aureus* com valores acima do permitido pela legislação torna-se impróprio para o consumo humano (BRASIL, 2001). Devido a isso, as práticas de higiene devem ser rigorosamente respeitadas a fim de prevenir a contaminação do produto. Sendo que, os manipuladores portadores desse microrganismo e a matéria-prima representam as principais fontes de contaminação do alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Como observado nesse estudo outros pesquisadores igualmente obtiveram contagens de *S. aureus* acima de 10^3 UFC/g, consentindo que estes queijos encontravam-se fora dos padrões exigidos pela legislação (ARAÚJO *et al.*, 2002; FERREIRA *et al.*, 2010; SENGER; BIZANI, 2011). Diferindo do presente estudo Rosengren *et al.* (2010), Ortolani *et al.* (2010) e Brooks *et al.* (2012) encontraram poucas amostras de queijos contaminadas por *S. aureus*.

É importante salientar que neste estudo não foi detectada a presença de *S. aureus* com valores acima de 10^5 UFC/g de alimento. Segundo Sant'ana e Azeredo,

(2005) a intoxicação alimentar causada por *S. aureus*, ocorre após a ingestão da toxina pré-formada no alimento, sendo a toxina formada quando a população dessa bactéria obtém valores entre 10^5 e 10^6 UFC/g de alimento. Meyrand *et al.* (1998) encontraram alta contagem de *S. aureus* mesmo durante o processo de maturação dos queijos avaliados, enfatizando a necessidade de se aderir a procedimentos sanitários adequados durante a produção, manipulação e processamento de queijos, como no presente estudo.

O isolamento e identificação de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. de maneira semelhante, não foram influenciados pelo período de maturação (Tabela 3).

Tabela 3. Frequência de isolamento e identificação de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e *Listeria monocytogenes* de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.

Dias de Maturação	Positivos/ Total (%)		
	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Listeria</i> sp.*	<i>Listeria monocytogenes</i>
15	0/27	6/27 (22,22%)	0/27
30	0/27	6/27 (22,22%)	1/27(3,70%)4b**
45	0/27	5/27 (18,51%)	2/27(7,40%)1/2b**
60	0/27	4/27 (14,81%)	0/27
Total	0/108	21/108 (19,44%)	3/108 (2,77%)

* Não houve diferença estatística entre o isolamento de *Listeria* sp. e dias de maturação ($p < 0,05$).

** sorotipos encontrados

Em nenhum dos períodos analisados foi detectado a presença de *Salmonella* sp., estando o queijo dentro dos padrões exigidos pela legislação que estabelece ausência de *Salmonella* sp. em amostras mínimas de 25g de queijos e demais alimentos (BRASIL, 2001). Já *Listeria* sp. foi isolada em 21/108 (19,44%) das amostras analisadas, sendo 18 (16,66%) identificadas como *Listeria innocua* e três (2,77%) como *Listeria monocytogenes* (Tabela 3), tornando o produto impróprio para o consumo humano e fora dos padrões exigidos pela legislação. Como demonstrado na tabela 3 o isolamento de *Listeria* sp. diminuiu a partir dos 30 dias de maturação, sendo a *Listeria monocytogenes* isolada aos 30 e 45 dias.

Concorda-se com Ortolani *et al.* (2010) que alguns dos principais fatores para o não isolamento de *Salmonella* sp. nos períodos finais da maturação, poderiam ser o desenvolvimento das bactérias ácido lácticas e seus metabólitos produzidos ao

longo do processo de maturação, tornando o ambiente inóspito ao seu desenvolvimento. Demonstrando assim, a importância da microbiota autóctone na obtenção de um alimento seguro para o consumidor (ORTOLANI *et al.*, 2010). Outro fator que pode ter influenciado a ausência de *Salmonella* sp. neste trabalho, é sua menor capacidade de competição em relação aos coliformes e aos *Staphylococcus* sp., que foi observado também por Brant, Fonseca e Silva (2007). Semelhante a este trabalho Menéndez *et al.* (2001), Salotti *et al.* (2006), Dalla Santa *et al.* (2010), Brooks *et al.* (2012) não isolaram *Salmonella* sp. de nenhuma das amostras de queijos analisadas.

A presença de *Listeria monocytogenes* condena o produto para o consumo, uma vez que, a ANVISA estabelece ausência desse microrganismo em 25g do alimento.

Borges e colaboradores (2009) relatam que entre os produtos lácteos, os queijos de média e alta umidade são os mais comumente contaminados por *L. monocytogenes*. A contaminação do queijo pela *Listeria* sp. pode ter origem tanto da matéria-prima (leite) de baixa qualidade, quanto de falhas na higiene durante o processo de fabricação e armazenamento do produto (SILVA *et al.*, 2010).

Resultados semelhantes aos observados aqui, foram encontrados por Menéndez *et al.* (2001) e Feitosa *et al.* (2003) em seus estudos. A diminuição após 30 dias de maturação da população de *L. monocytogenes* sugere que este microrganismo, semelhante a outros patógenos de origem alimentar, sigam desenvolvimento semelhante aos coliformes durante a maturação (diminuindo sua população ao longo do período). E uma vez que suas taxas são menores, admite-se que ao longo do período de maturação, esses microrganismos terão desaparecido ou pelo menos, seu número será tão baixo que não chegarão a causar danos à saúde do consumidor (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005). Diferente do encontrado nesse trabalho Salotti *et al.* (2006) e Brant, Fonseca e Silva (2007), Brooks *et al.* (2012) não detectaram a presença de *L. monocytogenes* em nenhuma das amostras analisadas em seus estudos.

A presença de *Listeria innocua*, a qual foi a mais isolada neste trabalho, sugere que a *Listeria monocytogenes* pode estar presente contaminando o alimento, devido ao fato desta ser menos competitiva em relação às outras do seu gênero (DUARTE *et al.*, 2005; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

A sorotipagem das cepas identificadas indicou a presença de quatro diferentes sorovares entre eles: *L. monocytogenes* 1/2b e 4b (Tabela 3) e *L. innocua* 6a e 6b. Como no presente, estudo Duarte *et al.* (2005) avaliaram 127 amostras de queijo de coalho produzidos e comercializados no estado de Pernambuco, das quais 9,5% apresentaram-se positivas para *Listeria* sp. e 5,5% para *L. monocytogenes* 1/2a.

Destaca-se também o fato de que os sorovares encontrados no presente estudo (1/2b e 4b) estão entre os principais causadores de doenças transmitidas por alimentos. A *L. monocytogenes* é representada por 13 sorovares, sendo os sorovares 1/2a, 1/2b e 4b frequentemente associados a surtos de listeriose humana (MCLAUHLIM, 1990; JAMES, 2005). Hoffer *et al.* (2006) realizaram análise fenotípica de 255 cepas de *Listeria* isoladas de material clínico humano durante os anos de 1969 a 2000 em várias regiões do país e observaram maior incidência do sorotipo 4b (60,3%), seguido pelo 1/2a (29%), destacaram ainda que as regiões Sul e Sudeste do país apresentaram o maior número de *L. monocytogenes* (87,8%), sugerindo que este fato pode estar relacionado a diferentes hábitos alimentares. Semelhante a este trabalho Abrahão *et al.* (2008) ao analisarem a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos e sorvetes produzidos no estado do Paraná, encontraram três cepas da bactéria e o sorovar prevalente foi 1/2a.

Apesar de ser baixa a incidência, a ocorrência de *L. monocytogenes* 1/2b e 4b é um fato de grande preocupação para os órgãos fiscalizadores, pois revela que, o consumo destes queijos constitui um perigo de infecção a população em geral, especialmente aquelas pessoas imunocomprometidas (JAMES, 2005). Demonstrando a necessidade da utilização das boas práticas de fabricação visando sempre prevenir a contaminação do alimento.

Diante dos resultados do presente trabalho, concorda-se com Brooks *et al.* (2012) sobre a importância da maturação para garantir um produto microbiologicamente seguro ao consumidor. A maturação é a única forma de diminuição e/ou eliminação dos microrganismos patogênicos que podem estar presente contaminando os queijos produzidos a partir do leite cru (MEYRAND *et al.*, 1998; MENDOZA; OYÓN, 2002; AYUB; SOUZA; ROSA, 2003; PERRY, 2004).

Em seu estudo Brooks *et al.* (2012) aponta um período de 60 dias como mínimo para a obtenção da estabilidade do queijo. Embora no presente estudo não tenha sido possível estabelecer este período, observou-se que aos 60 dias o queijo

apresentou-se mais seguro, uma vez que, aos 45 dias de maturação ainda isolou-se *Listeria monocytogenes*.

Por outro lado, na maioria das vezes por pressão dos próprios consumidores, os produtores acabam vendendo seus queijos com um tempo bem reduzido de maturação (PERRY, 2004). Produtores do queijo artesanal serrano se Santa Catarina, relatam que os consumidores têm preferência por queijos entre 7 a 15 dias de maturação (CÓRDOVA *et al.*, 2011). Devido a esse comportamento torna-se evidente a importância de se conhecer a qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano, com o propósito de transmitir informações concretas sobre, a importância da utilização de uma matéria – prima de qualidade, de seguir as boas práticas de fabricação e respeitar um período mínimo de maturação, aos produtores.

Tabela 4. Resultados médios dos parâmetros físico-químicos de queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina.

Dias de Maturação	Parâmetros			
	Acidez (%)	NaCl	Gordura (%)	Proteína (%)
14	0,78 ^a	0,020 ^a	32,14 ^a	24,46 ^a
28	0,75 ^a	0,021 ^a	23,06 ^b	25,38 ^a
42	0,76 ^a	0,013 ^a	23,50 ^b	25,85 ^{ab}
63	0,82 ^a	0,017 ^a	23,17 ^b	27,28 ^b
Média	0,78	0,018	25,30	25,75
CV(%)	31,73	58,09	20,06	8,1

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

* coeficiente de variação

Os resultados físico-químicos demonstrados na tabela quatro encontram-se dentro de uma faixa de variação normal, pois a maioria dos coeficientes de variação encontra-se com valores próximos a 30%, o que é considerado normal para respostas obtidas na área biológica (SAMPAIO, 1998). O período de maturação influenciou apenas o teor de gordura, onde se observou uma diminuição significativa dos 14 para os 28 dias e o teor de proteína o qual se apresentou mais alto ao final do período maturativo.

A grande diversidade da composição dos queijos analisados pode ser devido à falta de padronização das técnicas de produção nas propriedades produtoras do queijo artesanal serrano (IDE; BENEDET, 2001), podendo explicar o alto

coeficiente de variação do cloreto de sódio. Outros fatores que podem ter influenciado na variação dos constituintes nutricionais dos queijos analisados, são as diferenças nas condições de criação dos animais e na produção do queijo (ALMEIDA *et al.*, 2012).

Resultados semelhantes aos deste estudo foram encontrados por Ide e Benedet (2001), Machado *et al.* (2004) e Almeida *et al.* (2012) que também encontram grandes variações na composição das amostras de queijo analisadas em seus estudos.

CONCLUSÕES

A presença de coliformes totais, *E. coli* e *S. aureus* acima dos valores fixados como máximos pela legislação vigente, demonstra inadequadas condições de higiene durante o processo de fabricação e/ou armazenamento dos queijos.

O isolamento de *Listeria monocytogenes* torna o produto impróprio para o consumo humano, constituindo um problema de saúde pública. Apesar de não tido diferença estatística entre o período de maturação dos queijos e o isolamento e/ou quantificação dos microrganismos estudados, a necessidade de mais estudos técnico-científicos a fim de compreender melhor este processo fica evidente.

A grande variação encontrada na composição dos queijos analisados demonstra a falta de padronização na produção do queijo artesanal nas unidades produtoras.

Estes resultados podem contribuir para demonstrar não só a necessidade de identificar a fonte contaminação, mas também alertar os produtores sobre a importância de se utilizar uma matéria prima de qualidade, aliada as boas práticas de fabricação com a finalidade de assegurar um produto que não ofereça risco a saúde do consumidor. Da mesma forma os órgãos de fiscalização devem atuar para garantir a qualidade e a segurança do alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHÃO, M. W.; ABRAHÃO, P. R. da S.; MONTEIRO, C. L. B.; PONTAROLO, R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 289 – 296, 2008 / <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322008000200014>. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v44n2/a14.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ALMEIDA, A. C. de.; DINIZ, T. T.; SOUZA, M. R. de.; PINTO, M. S.; SILVA, N. O.; QUEIROZ, M. R. A. Caracterização da produção de queijo artesanal na região de Montes Claros, Norte de Minas Gerais. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 6, n. 4, p. 312 – 320, 2012. Disponível em: <<http://periodicos.ufersa.edu.br/revistas/index.php/acta/article/view/2924/5149>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

ARAÚJO, V. S.; PAGLIARES, V. A.; QUEIROZ, M. L.; FREITAS-ALMEIDA, A. C. Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, Washington DC, v. 92, p. 1172 – 1177, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2002.01656.x/pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

ARQUÉS, J. L.; RODRÍGUEZ, E.; GAYA, P.; MEDINA, M.; GUAMIS, B.; NUÑEZ, M. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Washington DC, v. 98, p. 254 – 260, 2005 / doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02507.x. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15659179>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

AYUB, M. A. Z.; SOUZA, C. F. V. de.; ROSA, T. D. Change in the microbiological and physicochemical characteristics of serrano cheese during manufacture and reopening. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 260 – 266, 2003 / ISSN 1517 – 8382. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjm/v34n3/v34n3a16.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

BORGES, M. F.; ANDRADE, A. P. C. de.; ARCURI, E. F. A.; KABUKI, D. Y.; KUAYE, A. Y. **Listeria monocytogenes em leite e produtos lácteos**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009 / ISSN 1677-1915. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/cd/jss/acervo/Dc_119.pdf>. Acesso em: 04 out. 2012.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo- de- minas artesanal do Serro- MG. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Belo Horizonte, v.59, n.6, p. 1570 – 1574, 2007. Disponível em: <<http://www.vet.ufmg.br/editora/arquivo-brasileiro-de-medicina-veterinaria-e-zootecnia>>. Acesso em: 24 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Instrução Normativa Nº 57. Brasília, 16 de dezembro de 2011. Disponível em: < <http://sertaobras.org.br/wp-content/uploads/2011/12/Instruc%CC%A7a%CC%83o-Normativa-n57.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução, RDC n.12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União 2001. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 24 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68 de 12 de dezembro de 2006. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos**. Brasília: MAPA. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 24 mar. 2012.

BROOKS, J. C. MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.; HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of foodborne pathogens. **Food Microbiology**, v. 31, p. 154 – 158, 2012 / DOI 10.1016/j.bbr.2011.03.031. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012000792> >. Acesso em: 24 set. 2012.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **Projeto de Qualificação e Certificação do Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Altitude de Santa Catarina** – Relatório Final. Convênio Epagri/Mapa 00132/2007. Florianópolis, 2009.

CÓRDOVA, U. de A.; PUCCI, A. A.; SCHLICKMANN, A. de F. de M. B. F.; SCHLICHTING, A. P.; NUNES, I. R.; SOUZA, L. T. de.; SOUZA, N. G.; JESUS, N. N. de.; NETO, S. P. **O queijo artesanal serrano nos campos do Planalto das Araucárias catarinense**. Florianópolis: Epagri, 2011.

DALLA SANTA, O. R.; PELOZATO, E. C.; SANTOS, dos M.; SILVA, T. V.; MIMURA, H. J.; ALVAREZ, D. C.; DALLA SANTA, H. S. Qualidade microbiológica de queijos

colonial elaborados em pequenas propriedades rurais de Guarapuava, PR. **Ciência e Cultura**, Barretos, v. 25, n. 1, p. 39 – 44, 2010 / ISSN 1980 – 0029.

DUARTE, D. A. M; SCHUCH, D. M. T.; SANTOS, S. B.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M; M.; SILVA, J. V. D.; MOTA, R. A. da. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 72, n. 3, p. 297 – 302, 2005. Disponível em: <http://200.144.6.109/docs/arg/V72_3/duarte.PDF>. Acesso em: 04 out. 2012.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F. de. MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp., e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, p. 162 – 165, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v23s0/19490.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

FERREIRA, B. G. OLIVEIRA, A. C. S. de.; MARSON, J. M.; TERRA, A. P. S. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijos tipo “Minas Frescal” comercializados na região do Triângulo Mineiro. **Revista Baiana de Saúde Pública**, Salvador, v. 34, n. 3, p. 575 – 589, 2010 / ISSN: 01000233. Disponível em: <<http://inseer.ibict.br/rbsp/index.php/rbsp/article/viewFile/57/56>>. Acesso em: 24 set. 2012.

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

HOFER, E.; REIS, M. F. dos.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 1, p. 32 – 37, 2006 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822006000100006>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v39n1/a06v39n1.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao Conhecimento do Queijo Colonial Produzido na Região Serrana de Santa Catarina, Brasil. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1351 – 1358, 2001. Disponível em: <http://www.editora.ufla.br/adm/upload/revista/25-6-2001_13.pdf>. Acesso em: 24 set. 2012.

JAMES, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, p. 516 – 521, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n4/a06v24n4.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

MCLAUHLIN, J. Distribution of Serovars of *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Categories of Patients with Listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, New York, v. 9, p. 210 – 213, 1990. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01963840?LI=true#page-1>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

MENDOZA, C.; OYÓN, R. Estudio comparativo de dos coberturas para queso llanero madurado. **Rev. Fac. Agron.**, Maracay, v. 28, p. 1 – 11, 2002. Disponível em: <<http://www.infolactea.com/descargas/biblioteca/401.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

MENÉNDEZ, S.; GODINEZ, R.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. **Food Microbiology**, v. 18, p. 151 – 158, 2001/ DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.031>. Disponível em: <<http://www.deepdyve.com/lp/elsevier/microbiological-chemical-and-biochemical-characteristics-of-tetilla-WLBVBoHohQ>>. Acesso em: 04 out. 2012.

MEYRAND, A. BOUTRAND –LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GASPARD, C. E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G. LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **Journal of Applied Microbiology**, Washington DC, v. 85, p. 537 – 544, 1998/ DOI: 10.1046/j.1365-2672.1998.853531.x. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.853531.x/pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 279 p.

ORTOLANI, M. B. T. YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 7, n. 2, p. 175 – 180, 2010 / DOI: 10.1089/fpd.2009.0390 Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/fpd.2009.0390>>. Acesso em: 24 set. 2012.

PERRY, K. S. P. QUEIJOS: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 27, n. 2, p. 293 – 300, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n2/19276.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artemed, 2005.

ROSENGREN, A.; FABRICIUS, A.; GUSS, B.; SYLVÉN, S.; LINDQVIST, R. Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 263 – 269, 2010 / doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005568>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171 – 175, 2006. Disponível em: < http://200.144.6.109/docs/arg/V73_2/salotti.PDF>. Acesso em: 24 set. 2012.

SANT'ANA, A. S.; AZEREDO, D. R. P. Comparação entre o sistema petrefilm rsa® e a metodologia convencional para a enumeração de estafilococos coagulase positiva em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 25, n. 3, p. 531 – 535, 2005 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612005000300023>. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v25n3/27023.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.

SENGER, A. E. V.; BIZANI, D. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal, produzido de forma artesanal e industrial, comercializado na cidade de Canoas/RS, Brasil. **Revista de Ciências Ambientais**, Canoas, v. 5, n. 2, p. 25 – 42, 2011 / ISSN 1981-8858. Disponível em: <<http://www.revistas.unilasalle.edu.br/index.php/Rbca/article/view/259/251>>. Acesso em: 24 set. 2012.

SILVA, M. P.; CAVALLI, D. R.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 352 – 359, 2006 / <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200018>. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n2/30183.pdf>>. Acesso em: 04 out. 2012.

SILVA, N. da.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S. dos; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimento e água**. São Paulo: Varela, 2010.

VISOTTO, R. G.; OLIVEIRA, M. A. de.; PRADO, S. de P. T.; BERGAMINI, A. M. M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico – sanitário e avaliação da rotulagem. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 8 – 15, 2011. Disponível em: <<http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/rial/v70n1/v70n1a02.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2012.

ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; COSTA, M. Qualidade Bacteriológica de Queijos Artesanais Comercializados em Estradas do Litoral Norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 003, p. 862 – 867, 2007/ ISSN 0103 – 8478. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/22256/000607652.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 24 set. 2012.

AGRADECIMENTOS

Aos produtores por disponibilizarem seus queijos para realização do experimento. A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) pela parceria que possibilitou a execução do projeto.

APÊNDICE

Apêndice A - Análises Bacteriológicas

Amostras representativas de 25g e 10g de cada queijo foram adicionadas a 225 mL de água peptonada tamponada 1% (APT) estéril e 90 mL de caldo *University of Vermont* (UVM), respectivamente, ambas homogêneas em *Stomacher* por dois minutos. As diluições eram realizadas em tubos contendo 9,0 mL de solução salina (0,85%) estéril, para contagem de Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Logo depois de homogêneas, as amostras foram submetidas as análises descritas abaixo.

Para contagem de Coliformes totais e *E. coli* utilizou-se o sistema *Petrifilm*TM (método oficial da *Association of Analytical Communities* – AOAC nº 991.14) no qual placas de *Petrifilm*TM EC foram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições da amostra, em seguida foram incubadas a 35°C/24h para a leitura de Coliformes totais e 35°C/48h para leitura de *E. coli*, onde colônias vermelhas e azuis, ambas associadas a bolhas de gás, eram consideradas colônias de Coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expressos em UFC/25g de acordo com a diluição.

Para contagem de *S. aureus* foi utilizado o sistema *Petrifilm*TM (método oficial AOAC nº 2003.07), no qual placas de *Petrifilm*TM eram inoculadas com alíquotas de 1,0 mL das diferentes diluições da amostra (10^{-1} a 10^{-3}) e incubadas a 35°C/24 horas, colônias vermelho-violeta eram consideradas colônias de *S. aureus*. O resultado foi obtido pela contagem das colônias e expressos em UFC/25g de acordo com a diluição.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi conduzida segundo a *International Organization for Standardization-ISO 6579* (2007) que consiste em: a) pré-enriquecimento em caldo não seletivo onde 25 g de cada amostra foi acrescido a 225 mL de APT 1% e incubação a 37°C/24h, b) enriquecimento em caldo seletivo de 0,1 mL da amostra enriquecida para tubo com 9,9 mL Caldo *Rappaport* e incubado a 41°C/24h e 1 mL para tubo com 9 mL de Caldo Tetrato e incubado a 37°C/24h, ambos homogêneos no *Vortex* e c) plaqueamento seletivo diferencial

em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Ágar Verde Brilhante (VB). A partir do plaqueamento diferencial foram separadas três colônias típicas dos diferentes meios e repicadas em *Triple Sugar Agar* (TSA) para purificação, em seguida prosseguiu-se com coloração de Gram e confirmação bioquímica do agente através das provas de: *Triple Sugar Iron* (TSI), *Lysin Iron Agar* (LIA), urease, citrato e *Sulphide Indol Motility* (SIM). Por fim, os isolados com perfil bioquímico compatíveis com *Salmonella* sp. eram confirmados pela prova de aglutinação com soro polivalente somático. Após a confirmação bioquímica e sorológica as cepas sugestivas, seriam encaminhadas para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

A pesquisa de *Listeria monocytogenes* foi realizada segundo USDA (2009), seguindo: a) enriquecimento seletivo primário de 10g de cada amostra foi acondicionado em sacos plásticos estéreis contendo 90 mL de caldo *University of Vermont* (UVM) e incubação a 30°C/24h, b) enriquecimento seletivo secundário de alíquota de 0,1 mL da amostra enriquecida em tubo com 9,9 mL de caldo *Fraser*, em seguida homogeneizado no *Vortex* para incubação a 37°C/48h, c) plaqueamento seletivo diferencial a partir do caldo *Fraser* foi semeado 0,1 mL em *Agar Oxford Modified* (MOX) e uma alçada em *Agar Listeria Ottaviani & Agosti* (ALOA) ambas incubadas a 37°C/24h. Após a incubação foi verificada a presença de colônias típicas de *Listeria* sp. (esféricas, pretas, rodeadas por halo preto de hidrólise de esculina no meio MOX) e colônias típicas de *L. monocytogenes* (azuis esverdeadas com halo opaco no meio ALOA) e também *Listeria* sp.. Em seguida três colônias típicas de *L. monocytogenes* de cada meio eram purificadas em placas com *Trypticase Soy Agar* com *Yest Extract* (TSA- YE) para realização da confirmação bioquímica. As colônias características foram confirmadas através da coloração de Gram, catalase, *Christie, Atkins* e *Muncch-Peterson* (CAMP) Test e testes bioquímicos: TSI, Vermelho de Metila (VM)/*Voges Proskauer* (VP), SIM, manitol, ramanose, xilose e esculina, conforme Silva et al., (2010). Para realização do CAMP Test foram utilizadas as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC) e *Rhodococcus equi* (ATCC 6939). Os isolados identificados foram enviados para sorotipificação na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). A *L. monocytogenes* (ATCC 7644) foi utilizada como controle de todos os procedimentos.