FELIPE ROBERTO VITA PEDROSA

**Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura
obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo**

São Paulo

2010

FELIPE ROBERTO VITA PEDROSA

**Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura
obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientadora:

Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2357
FMVZ

Pedrosa, Felipe Roberto Vita
Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em
feiras livres da cidade de São Paulo / Felipe Roberto Vita Pedrosa. -- 2010.
69 p. : Il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde
Animal, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Queijo Minas (cura). 2. *Salmonella* spp. 3. Feiras livres. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de *Mycobacterium spp*, *Salmonella spp*. E *Escherichia coli* em queijos minas meia cura obtidos em feiras livres na Cidade de São Paulo", protocolado sob o nº1506/2008, não utilizando animais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Eveliese Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26 de novembro de 2008.

We certify that the Research "Recovery of *Mycobacterium spp*, *Salmonella spp*. e *Escherichia coli* in minas meia cura cheese from open markets of the São Paulo city", will not be used animals, protocol number 1506/2008, under the responsibility Profa. Dra. Eveliese Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/26/08.

São Paulo, 27 de novembro de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ-USP

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PEDROSA, Felipe Roberto Vita

Título: Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*A Deus e ao meu querido e saudoso pai Gustavo Alberto de Arruda
Pedrosa (in memoriam), pelos exemplos e ensinamentos”.
-Obrigado por tudo e até breve!*

AGRADECIMENTOS

A **Deus e aos amigos espirituais**, que sempre estiveram e estarão ao meu lado, presentes constantemente na minha jornada diária da vida, por muitas vezes me carregando nos braços, quando achei que estivesse totalmente sozinho.

À Profa. Dra. **Evelise Oliveira Telles**, pela orientação e pela amizade.

A todos os meus familiares, em especial às minhas avós, **Alzira Martins Vita (in memorian)** e **Maria Beatriz de Arruda Pedrosa**, aos meus irmãos, **Gustavo Vita Pedrosa**, **Maria Fernanda Vita Pedrosa** e **Bruno Vita Pedrosa**, à minha mãe **Rosângela Martins Vita Pedrosa** e à minha sobrinha, **Maria Eduarda Peloggia Pedrosa**, pelo apoio, carinho, companhia, ensinamentos e incentivo.

A todos os meus **amigos e companheiros (as) de jornada**, que, independente do tempo, local e intensidade, participaram da minha vida, me apoiando e contribuindo para meu crescimento, tanto pessoal como profissional.

À **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e a bibliotecária **Elza Faquim**, pela disponibilidade boa vontade.

Aos funcionários do Laboratório de Higiene Alimentar, **Orlando Bispo de Souza e Sandra Aberlado Sanches**, pelos ensinamentos, parceria e apoio.

RESUMO

PEDROSA, F. R. V. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo.** [Recovery of *Salmonella* spp. in Minas meia-cura cheese from open markets of the Sao Paulo city]. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O queijo tipo Minas, quando curado, desenvolve características específicas que têm grande aceitação no mercado nacional. Isto, associado ao fato de ser um queijo de fácil fabricação e que tem bom valor agregado, estimula a produção informal, com o uso do leite cru e com tempo de cura de 10 a 12 dias; o que não atende o tempo mínimo que a legislação exige para que se use o leite cru. Este projeto se propôs a pesquisar a presença de *Salmonella* spp. em 161 amostras de queijo Minas meia-cura comercializado informalmente na cidade de São Paulo; em 32 amostras foram pesquisados a Aw, umidade e pH. Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. em 25g e os valores médios de umidade, Aw e pH foram, respectivamente, de 29,92, 0,94 e 5,1. Conclui-se que o risco de se contrair salmonelose pelo consumo desse produto é menor do que era esperado, embora não tenha sido pesquisada a presença de células viáveis mas não cultiváveis. No entanto, deve-se ter em mente que a ausência de controle da cadeia produtiva desse queijo é um fator de risco para outros perigos, seja de natureza microbiológica, química, física e de fraudes.

Palavras-chave: Queijo Minas (cura). *Salmonella* spp. Feiras livres.

ABSTRACT

ABSTRACT

PEDROSA, F. R. V. **Recovery of *Salmonella* spp. in Minas meia-cura cheese from open markets of the Sao Paulo city.** [Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo]. 2010. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The curing of Minas type cheese develops specific characteristics that are accepted by the consumers. This, together with the facts that Minas type cheese is easy to be made and has a good added value encourage informal production, using raw milk and 10 to 12 days of curing; this period does not meet the minimum required by law in case of using raw milk. This study aimed to investigate the presence of *Salmonella* spp. in 161 samples of Minas meia-cura cheese informally sold in Sao Paulo open markets; Aw, moisture and pH were analyzed in 32 samples. All samples were negative for *Salmonella* spp. in 25g and the average values for moisture content, Aw and pH were, respectively, 29,92, 0,94 and 5,1. It is concluded that the risk of having salmonellosis by eating this product is lower than expected, although the presence of viable but nonculturable cells had not been evaluated. However, the lack of control throughout the chain production of this cheese is a risk factor for other hazards, whether of microbiological, chemical or physical origin, besides frauds.

Keywords: Minas meia-cura cheese. *Salmonella* spp.. Open market.

LISTA DE FIGURA

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Variedade de queijos vendidos como Minas meia-cura na feira livre em São Paulo	52
---	----

LISTA DE QUADRO

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Relação das amostras de queijos Minas meia-cura coletados, identificando a região da cidade, feira de origem e data de coleta - São Paulo – 2010.....	43
------------	---	----

LISTA DE TABELA

LISTA DE TABELA

Tabela 1 -	Resultado descritivo das análises físico químicas de queijos Minas meia-cura provenientes de feira livres, segundo a classificação oficial pelo teor de umidade - São Paulo, março 2009 a novembro 2009	53
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

ZL	Zona Leste
ZN	Zona Norte
ZS	Zona Sul
ZO	Zona Oeste
VNC	Viável Não Cultivável

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
µL	Microlitro
mg	Miligrama
min	Minuto de hora
mL	Mililitro
°C	Graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
A _w	Atividade de água
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
nº	número

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	26
1.1	<i>Salmonella</i> spp. e qualidade higiênico sanitária de queijos no Brasil...	29
1.2	Comércio em feiras livres	33
1.3	Bactérias láticas.....	35
1.4	Métodos rápidos para pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	37
1.5	Células Viáveis e Não Cultiváveis	38
2	OBJETIVO	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Obtenção das Amostras.....	43
3.2	Análises Físico-Químicas	48
3.3	Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	49
3.4	Identificação bioquímica	49
3.5	Identificação Sorológica	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Análises físico-químicas	52
4.2	Presença de <i>Salmonella</i> spp.....	53
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÕES.....	60
	REFERÊNCIAS	62

INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

A indústria de queijos ocupa lugar de destaque na economia mundial, sendo a produção global anual prevista para 2008 era de 14.501 milhões de toneladas. Os Estados Unidos são os maiores produtores, sendo responsáveis por 26% da produção mundial, enquanto o Brasil ocupa a sétima posição, com 460 mil toneladas anuais (MATA, 2009). O Brasil, com uma produção estimada de 27,08 bilhões de litros no ano de 2008, apresenta a sexta colocação entre os maiores produtores mundiais de leite.

Porém, outro dado importante da literatura nacional informa o risco envolvido nesta produção de queijos: aproximadamente 40% da produção leiteira do Brasil não são submetidos a nenhum tipo de inspeção, sendo comercializada como leite fluido e derivados lácteos, especialmente o queijo Minas, sem nenhum tratamento térmico (ORTOLANI, 2009). Sendo assim, esses queijos eventualmente podem veicular diversos patógenos, como têm relatado vários estudos, onde também se afirma que características intrínsecas (principalmente pH e atividade de água) e extrínsecas (principalmente temperatura, umidade relativa e atmosfera) desses queijos não impossibilitam a sobrevivência ou mesmo a multiplicação de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*, entre outros, (FAVARO et al., 2006; SOUSA et al., 2006), bem como de microrganismos deteriorantes, já que vários estudos em relação à qualidade higiênico-sanitária de queijos apontam altos índices de não-conformidades em relação aos padrões legais vigentes.

O queijo Minas frescal é um dos mais populares do Brasil e ocupa o terceiro lugar na escala de produção, com um total aproximado de 34 mil toneladas/ano (em estabelecimentos sob inspeção federal), perdendo somente para o queijo Mussarela e o queijo Prato (ABIQ, 2005). A produção de queijos no Brasil teve origem no início do século XIX, no local que hoje corresponde à região do Serro, no estado de Minas Gerais. O queijo ali produzido foi inicialmente chamado de queijo de Minas e deu origem a outros tipos de queijo hoje conhecidos como: Minas frescal, Minas padrão, Minas meia-cura, Minas curado ou prensado, queijo do Serro, de coalho, Minas de Araxá, entre outros (LISITA, 2005). Hoje, o maior produtor de queijos do Brasil é o

Estado de Minas Gerais, que coloca anualmente no mercado 215 toneladas (TEIXEIRA; FONSECA, 2008).

Por definição, queijo é o produto fresco ou maturado, obtido por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, enzimas específicas de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para consumo alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes. Além disso, os queijos são produtos com base láctea que não contém gordura ou proteína de origem não láctea (BRASIL, 1952).

O queijo Minas é um produto de massa crua, ou seja, após a coagulação da massa, ela está pronta para ser enformada e salgada. Quando é vendido logo após a salga, o queijo é denominado "Minas frescal", mas, se for prensado após a enformagem e mantido por cerca de 10 a 15 dias em geladeira ou em temperatura ambiente, dá origem ao produto "meia-cura" ou "curado"; nesse período ocorre uma redução no teor de umidade e o desenvolvimento de sabor e aroma característicos (SOUSA et al., 2006). O queijo Minas quando curado apresenta-se com uma casca fina, de cor amarelo-palha e massa de coloração branca (ALBUQUERQUE; SAITO, 2007).

Já o queijo Minas (padrão), que é produzido por empresas formais e cujo processo de fabricação se assemelha ao do queijo Minas meia-cura, é o produto obtido do leite integral ou padronizado, pasteurizado, de massa crua, prensado mecanicamente e devidamente maturado durante 20 dias, devendo apresentar:

1. Formato: cilíndrico, de faces planas e bordos retos, formando ângulo vivo.
2. Peso: 1 kg a 1,200 kg (um quilograma a um quilo e duzentas gramas).
3. Crosta: fina amarelada, preferentemente revestida de parafina.
4. Consistência: semidura, tendente a macia, de untura manteigosa.
5. Textura: buracos mecânicos e em cabeça de alfinete, pouco numerosos.
6. Cor: branco-creme, homogênea.
7. Odor e sabor: próprios, ácidos, agradáveis e não picantes (BRASIL, 1952).

Os microrganismos são componentes essenciais para a fabricação dos queijos e são divididos em biota principal e secundária. A biota principal,

responsável pela acidez, é composta pelos gêneros *Lactococcus* spp, *Lactobacillus* spp e *Streptococcus* spp, sendo que dependendo do tipo de queijo podem ser utilizadas várias combinações. A biota secundária desenvolve textura e sabor e é composta por mistura de bactérias e fungos, de acordo com a variedade do queijo (PEDRO, 2003).

Devido ao fato do chamado “queijo Minas meia-cura” ser um produto informal e, portanto, sem um Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade específico, há muitas diferenças em relação às características físico-químicas desses produtos, como verificado por Ventura (1988), que analisou 50 amostras de queijo Minas meia-cura e obteve muita variação nesses itens, chegando à conclusão que esse fato deve-se à grande variedade de técnicas de fabricação empregadas.

Durante o período de maturação, o queijo sofre diversas transformações, como redução da atividade de água e do pH e aumento do percentual de cloretos. Essas transformações, juntamente com a microbiota competidora presente, como bactérias lácticas e coliformes, podem influenciar o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e dificultar sua detecção pelos métodos microbiológicos convencionais (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1990; MATA, 2009).

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal determina que só é permitida a fabricação de queijo fresco e mole a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 1952), já que o leite cru constitui importante via de transmissão para inúmeros agentes etiológicos de enfermidades (PINTO; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L., 1996). Apesar desta proibição legal imposta à comercialização de queijos frescos e moles, elaborados a partir de leite cru no Brasil, a comercialização de queijo Minas produzido artesanalmente tem sido realizada abertamente, especialmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002). Além disso, o queijo Minas pode ser produzido na propriedade leiteira e pode ser fabricado a partir de leite cru, desde que comercializado após 60 dias de cura ou maturação em temperatura inferior a 5°C (BRASIL, 1996; BRASIL, 2000). Entretanto, tal período não é normalmente seguido pelo produtor de queijo Minas meia-cura (MACHADO et al., 2004). Isso é alarmante do ponto de vista de saúde pública, já que como esses queijos são frequentemente produzidos com leite cru, na maioria das vezes em estabelecimentos sem inspeção sanitária e práticas de higiene apropriadas, são vendidos sem embalagem adequada, em temperatura ambiente e sem indicação de

procedência ou data de validade (CORREIA; RONCADA, 1997; PEDRO, 2003; FAVARO et al., 2006; SOUSA et al., 2006; SILVA et al., 2007). Esse período de 60 dias de maturação exigido para a comercialização também já se mostrou ineficaz na inativação de alguns patógenos, entre eles *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (MATA, 2009). Mata (2009) concluiu que o período de maturação mínimo de 60 dias para o queijo Minas artesanal (que é um tipo Minas com cura curta) não foi suficiente para garantir segurança microbiológica no produto quando queijos foram produzidos com leite cru artificialmente contaminado com *Listeria innocua* na concentração de 10 UFC/mL. Em razão do grande risco para os consumidores, a elaboração de queijos a partir do leite cru vem sendo abandonada em alguns países da Europa e substituída pela forma semi-artesanal, envolvendo a pasteurização do leite, adoção de outros processos de conservação e a adequação às boas práticas de fabricação a partir da substituição de equipamentos tradicionais por outros modernos (MANOLOPOULOU et al., 2003; LINTON et al., 2008).

Outro fator a ser considerado é a qualidade microbiológica das salmouras, uma vez que elas podem vir a ser fonte de contaminação para os queijos (LISITA, 2005). Amaral, Iaria e Nader Filho, (2001) avaliaram as características microbiológicas das salmouras utilizadas na produção de queijo Minas frescal e observaram altos índices de contaminação, cujas contagens de microrganismos mesófilos, coliformes totais, coliformes fecais, *Staphylococcus aureus* e bolores e leveduras alcançaram valores de até $2,9 \times 10^{11}$, $7,8 \times 10^{12}$, $7,8 \times 10^{12}$, $2,3 \times 10^3$ e $7,4 \times 10^5$ UFC/g, respectivamente.

1.1 *Salmonella* spp. e qualidade higiênico sanitária de queijos no Brasil

As bactérias do gênero *Salmonella* têm seu nome derivado do cientista Daniel Elmer Salmon, que realizou o primeiro isolamento. Este gênero bacteriano está amplamente distribuído na natureza e já foi isolado de todos os vertebrados, sendo o homem e os animais seus reservatórios primários (NOGUEIRA, 2010).

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae, sendo um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbio facultativo e geralmente móvel, com

presença de flagelos. As bactérias do gênero *Salmonella* são lactose e indol negativas, produzem ácido sulfídrico e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A uréia não é hidrolisada e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina. *Salmonella* spp. se desenvolve em um pH ótimo entre 6,5 e 7,5, mas pode tolerar pH entre 4,5 e 9. Da mesma forma, multiplica-se em um amplo intervalo de temperatura que vai de 7 a 45°C, porém a temperatura ótima de crescimento é 37°C (ROITMAN; TRAVASOS; AZEVEDO, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 1996; FORSYTHE, 2002; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005;). *Salmonella* spp. pode se desenvolver em atividade de água (Aw) aproximada de 0,93 a 0,95, com ótimo entre 0,94 e 0,99 (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Sousa et al. (2006) avaliaram a Aw de queijos Minas meia-cura e valores mínimo, médio e máximo encontrados respectivamente foram 0,83; 0,93 e 0,98 enquanto Favaro et al. (2006) encontraram respectivamente valores mais altos: 0,94; 0,96 e 0,98. Favaro et al. (2006) obtiveram ainda pH médio de 4,91 e umidade, realizada em apenas 5 amostras, de 40,31% (valor médio).

Estudos caracterizando antígenos somáticos (O), representados por lipopolissacarídeos componentes da parede celular, e flagelares (H), de teor protéico, formaram a base de classificação do gênero *Salmonella* em um extenso número de sorovares (GRIMONT; WEILL, 2007). Além dos antígenos somáticos e flagelar, *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi e *Salmonella* Dublin apresentam o antígeno capsular único, o qual contribui para a identificação e para a virulência dos mesmos (D'AOUST, 1994).

A classificação taxonômica de *Salmonella* sofreu várias modificações e o gênero é dividido em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Por sua vez, *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. A espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* compreende uma grande variedade de sorovares ou sorotipos, classificados conforme sua estrutura antigênica. O nome dos sorovares é escrito após a subespécie, ou diretamente após a denominação do gênero, sem a utilização de itálico (DE PAULA, 2002). A denominação dos sorovares é muitas vezes derivada da localização geográfica do primeiro relato de isolamento (NOGUEIRA, 2010).

Dentre os diversos sorovares existentes, *Salmonella enterica* subsp. sorovar Typhimurium é o mais frequentemente implicado em surtos de salmonelose em humanos em países desenvolvidos (MENDES, 2009). As doenças causadas por

Salmonella spp. dividem-se em dois grupos, segundo a divisão proposta pela Organização Mundial de Saúde (OMS) utilizada em seu sistema de estatísticas sanitárias: o primeiro composto pela febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, e pelas febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi (A, B e C); o segundo grupo de doenças é composto pelas enterocolites ou salmoneloses, causadas pelos demais sorovares, que são os agentes mais frequentemente veiculados por alimentos (ICMSF, 2000). Os sintomas da salmonelose incluem náusea, vômitos, dor abdominal, dor de cabeça, calafrios e diarreia. Estes sintomas são geralmente acompanhados por prostração, fraqueza muscular, febre moderada, agitação e sonolência. Os sintomas geralmente persistem por dois a três dias. A taxa de mortalidade média é de 4,1%, variando de 5,8% durante o primeiro ano de vida, para 2% entre um e 50 anos e de 15% para pessoas com mais de 50 anos (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Em 1987, o Brasil registrava apenas casos de infecções alimentares por *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* e intoxicações alimentares por enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* (SILVA et al., 2007). A partir daí, vários outros microrganismos foram identificados como agentes etiológicos de infecções ou intoxicações humanas de origem alimentar, destacando-se diversos registros onde produtos lácteos estavam envolvidos, embora não haja dados epidemiológicos sistematizados. Além disso, deficiências nos serviços de vigilância epidemiológica e a falta de conscientização da população diante do problema preocupam, já que somente 10% do número real de surtos de toxinfecções alimentares são confirmados (SOUSA et al., 2006; SILVA et al., 2007). Entretanto, nos últimos anos, tem sido observado aumento expressivo da prevalência de *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis como agente etiológico de surtos de doenças de origem alimentar em vários países, inclusive no Brasil (MENDES, 2009), alertando assim a comunidade científica em vários países, com atenção especial nos casos do risco envolvendo os consumidores, principalmente os imunosuprimidos e idosos (SILVA et al., 2007; ORTOLANI, 2009).

Na maioria das vezes, essas enfermidades não são diagnosticadas ou são sub-diagnosticadas pela dificuldade e demora de detectar os casos e surtos, pela falta de amostras dos alimentos supostamente contaminados e/ou envolvidos nos

casos ou mesmo pelas limitações e lentidão das metodologias analíticas usualmente empregadas no diagnóstico (ORTOLANI, 2009).

A bibliografia nacional revela de maneira repetitiva um quadro desfavorável envolvendo os queijos consumidos no Brasil, incluindo o queijo Minas, em relação a segurança alimentar (GARCIA-CRUZ; HOFFMAN; VINTURIM, 1994; ÁVILA; GALLO, 1996; CÂMARA et al., 2002; CORREIA; RONCADA, 1997; PEREIRA et al., 1999; ALMEIDA FILHO et al., 2000; PERESI et al., 2001; ALMEIDA FILHO; NADER FILHO, 2002; ALMEIDA; FRANCO, 2003; FEITOSA et al., 2003; PEDRO, 2003; LISITA, 2005; CAMPOS et al., 2006; FAVARO et al., 2006; SALOTTI et al., 2006; SOUSA et al., 2006; BRANT; FONSECA; SILVA, 2007; PANETO et al., 2007; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007; GRADI; ROSSI, 2007; SANTANA et al., 2008; MELO; ALVES; COSTA, 2009; MORAES et al., 2009; ORTOLANI, 2009; SCHNEIDER, 2009).

Porém, poucos trabalhos na literatura contemplam o queijo Minas meia-cura; a maioria é realizada com o queijo Minas frescal, embora os dois tipos de queijos sejam oriundos da mesma massa (PEDRO, 2003).

Os principais problemas envolvendo a qualidade microbiológica de queijos no Brasil se relacionam com as más condições higiênicos-sanitárias do leite produzido, as péssimas condições de fabricação dos queijos e a falta ou ineficiência do sistema de refrigeração ao longo da cadeia produtiva (LISITA, 2005).

Sousa et al. (2006) encontraram 30% das amostras (3/10) positivas para *Salmonella* spp. e também amostras acima dos limites de legislação para coliformes fecais e estafilococos, assim como Favaro et al. (2006) pesquisou as contagens de estafilococos coagulase positiva e de coliformes totais e fecais em queijos Minas meia-cura informais vendidos nas ruas da cidade de São Paulo-SP, encontrando 59,38% (19/32) das amostras consideradas impróprias para o consumo devido a pelo menos um dos padrões microbiológicos (contagem de estafilococos coagulase positiva ou coliformes) estar acima dos padrões exigidos pela legislação nacional.

Entretanto, Pereira et al. (1999) já não encontrou amostras positivas (0/168) para *Salmonella* spp. em queijos informais e não informais na cidade de Belo Horizonte-MG, mas várias amostras também estavam acima dos limites de legislação para coliformes fecais.

Pedro (2003) avaliou a qualidade higiênico-sanitária de locais (comércio ambulante, feiras livres e Mercados Municipais) de comercialização de queijo Minas meia-cura do Município de São Paulo. Nenhum dos locais estudados atingiu o máximo de 10 pontos possíveis e, entre os parâmetros em desacordo com a legislação, a temperatura do produto era superior a 20°C em 75% dos locais estudados. Os resultados demonstram a necessidade de um trabalho educacional, com treinamento de vendedores dos três tipos de comércio estudados visando a melhorias na prática de manipulação e conservação do produto. O trabalho também alerta vendedores e consumidores para os riscos do consumo de produtos de origem desconhecida.

1.2 Comércio em feiras livres

O consumo de alimentos vendidos nas ruas é um hábito cultural muito disseminado (PEDRO, 2003).

As feiras livres ocorrem na cidade de São Paulo desde os meados do século XVII, visto que, em 1687, foi autorizada a venda de “gênero da terra, hortaliça e peixe”, no Terreiro da Misericórdia (SÃO PAULO, 1995).

No início do século XVIII, nota-se a distinção entre alguns ramos de comércio: aparecem as lojas ou vendas, onde se compravam fazendas (tecidos) e gêneros alimentícios não perecíveis, e as quitandas, que ofereciam verduras e legumes (SÃO PAULO, 1995).

Em fins do século XVIII e começo do século XIX, criaram-se as feiras fora da cidade, nos locais de pouso de tropas, ou um início de mercado caipira e a Feira de Pilatos, no Campo da Luz, estabelecida pelo então Governador Melo Castro de Mendonça (SÃO PAULO, 1995).

Em 1914, surgiu a Feira Livre, por meio do ato do Prefeito Washington Luiz P. de Souza, não como projeto novo, mas sim como o reconhecimento oficial de algo que já existia, tradicionalmente, na cidade de São Paulo (SÃO PAULO, 1995).

A primeira Feira Livre oficial da cidade de São Paulo teve 26 feirantes e ocorreu no Largo General Osório, a segunda foi no Largo do Arouche, com 116 feirantes, e a terceira realizou-se no Largo Morais de Barros (SÃO PAULO, 1995).

Em 1915, existiam um total de 7 feiras, sendo duas no Arouche, duas no Largo General Osório e as demais no Largo Morais de Barros, Largo São Paulo e na Rua São Domingos (SÃO PAULO, 1995).

O prefeito Antonio Carlos Assumpção, através do Ato nº 625, de 28 de maio de 1934, reorganizou as feiras livres e permitiu a venda de produtos não alimentícios. Além disso, ele introduziu no feirante a ética profissional, inserindo também nos trabalhos por eles efetuados as noções de higiene (SÃO PAULO, 1995).

Em 1948, houve uma expansão das feiras livres, quando o prefeito Paulo Lauro, por meio de Lei, determinou a realização de, pelo menos, uma feira semanal em determinadas regiões da cidade (SÃO PAULO, 1995).

No ano de 1953, autorizou-se a comercialização de artigos de pequena indústria caseira, exclusiva de instituições de caridade. Através do Decreto nº 5.841, de 15 de abril de 1964, as feiras foram reorganizadas, ordenando-se a forma de sua criação, suas dimensões, disposição das bancas por ordem cronológica e ramo de comércio e dividindo-as nas categorias Oficiais e Experimentais (SÃO PAULO, 1995).

Em 1974, o Decreto nº 11.199, de 02 de agosto de 1974, exigiu outra importante questão relativa à segurança alimentar em feiras-livres: a utilização de equipamentos isotérmicos especiais para a venda de aves abatidas, miúdos e pescados, bem como o uso de uniformes pelos feirantes (SÃO PAULO, 1995).

Nos últimos anos, diversos fatores sócio-econômicos, tais como desemprego e queda do poder aquisitivo, impulsionaram o comércio nas vias públicas, dificultando a fiscalização dessa atividade (PEDRO, 2003).

Por meio do Decreto nº 48, de 06 de março de 2007 do prefeito Gilberto Kassab, determinou-se a forma como as feiras livres são realizadas atualmente na cidade de São Paulo: o horário de comercialização é das 07:30 as 13:30 e existem por volta de 850 feiras livres por todo o município (SÃO PAULO, 1995).

Porém, nestas feiras os queijos geralmente são de origem desconhecida, armazenados e manipulados em condições inadequadas de higiene, o que aumenta o risco de contaminação com microrganismos patogênicos (CORREIA; RONCADA, 1997; PEDRO, 2003; SOUSA et al., 2006).

1.3 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas constituem um grupo de microrganismos Gram-positivos, catalase negativos, muito heterogêneos entre si (ALEXANDRE et al., 2002) e que constituem uma parte significativa da microbiota autóctone do leite e derivados, sendo ainda consideradas como as principais responsáveis pelos efeitos inibitórios e/ou deletérios em outros tipos de microrganismos, incluindo os patogênicos (ORTOLANI, 2009). Entre os tipos de BAL presentes nas diversas variedades de queijos, encontram-se 11 gêneros: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus Vagococcus* e *Weissella* (ORTOLANI, 2009).

A atividade antagonista das BAL sobre outros microrganismos ocorre por diversos mecanismos, como sensibilidade às interações microbianas, competição por nutrientes e sítios de adesão, e a produção de substâncias inibitórias potencialmente letais, entre elas os ácidos orgânicos (fundamentalmente ácido láctico, mas também propiônico e acético), diacetil, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, substâncias antimicrobianas de baixo peso molecular (reuterina, reutericiclina e ácido piroglutâmico), e as bacteriocinas. Essas substâncias possuem comprovado efeito bacteriostático e/ou bactericida e, podem criar um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes (ORTOLANI, 2009). Devido à produção dessas substâncias, as BAL naturalmente presentes no leite e derivados podem ser consideradas como importantes fatores de inibição a alguns microrganismos patogênicos, como *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* (NERO et al., 2008).

Alexandre et al. (2002) isolaram 192 cepas de BAL de cinco amostras de queijo-de-Minas artesanal, oriundos da região do Serro, MG. Os resultados da prova de inibição direta indicaram que 25% (48/192) das cepas isoladas foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* de microrganismos indicadores, dentre os quais *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. As 48 cepas foram submetidas à prova de inibição indireta, onde se verificou que 20,8% (10/48) das cepas demonstraram amplo espectro antimicrobiano frente a microrganismos como: *Salmonella enteritidis* var. *typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*.

Neto et al. (2005) avaliaram a atividade antagonista de bactérias ácido-láticas (quatro cepas de *Lactobacillus* spp. e duas cepas de *Lactococcus* spp.) isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente aos patógenos isolados dos mesmos queijos (*Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*) e frente a cepas de patógenos de referência, entre eles *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium. *Lactobacillus* spp. apresentaram as atividades antagonistas mais potentes: *L. casei* e *L. rhamnosus* foram as espécies que apresentaram as maiores médias dos halos de inibição frente aos patógenos utilizados como reveladores, demonstrando o seu potencial benéfico para melhorar a qualidade sanitária de queijo de coalho.

Porém, Ortolani (2009) avaliou as características microbiológicas de amostras de leite cru e queijo Minas artesanal da região de Viçosa/MG, bem como detectou e caracterizou BAL naturalmente presentes nesses produtos, visando a verificação da atividade antimicrobiana sobre alguns microrganismos patogênicos. Foram selecionadas 389 culturas de BAL isoladas desses produtos e foi verificada a atividade antagonista contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Typhimurium e *Lactobacillus sakei*. Grande parte das amostras analisadas apresentou culturas com atividade antagonista a esses microrganismos, exceto para *Salmonella* Typhimurium, dado que microrganismos Gram Negativos, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, possuem a camada dupla lipídica externa que pode dificultar a absorção pela membrana plasmática das substâncias antagonistas produzidas pelas BAL, o que explicaria um menor índice ou ausência de BAL antagonistas a esses agentes. Contudo, não se pode descartar a eventual existência de outros tipos de substâncias antagonistas contra Gram Negativos não incluídas neste estudo, bem como a dificuldade de recuperação do microrganismo através do método utilizado.

Entretanto, no Brasil, os estudos de caracterização e identificação da microbiota láctica nesses produtos são raros, sendo que esses estudos são considerados a etapa inicial de trabalhos mais avançados, que visam determinar quais são os fatores responsáveis pela atividade inibitória, espectro de ação, potencial de antagonismo, purificação das substâncias inibidoras e futuras aplicações das mesmas na indústria de alimentos, a fim de se obter alimentos microbiologicamente mais seguros para o consumidor (ORTOLANI, 2009).

1.4 Métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. atualmente, pode ser feita através de uma variedade de técnicas, porém nenhuma é considerada perfeita (RALL et al., 2005). A metodologia tradicional de plaqueamento, embora tradicional e confiável, é baseada na fermentação de lactose e na produção de H₂S, sendo que a maioria dos meios são caros, inespecíficos e exigem uma análise demorada (RALL et al., 2005). Além disso, devido a fatores ambientais, variações na expressão gênica dos microrganismos podem ocorrer e afetar o poder discriminatório dos testes bioquímicos. Outro problema são as células viáveis não-cultiváveis, que não são detectadas na metodologia convencional (MATA, 2009).

Os métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos surgiram como consequência da necessidade de se abreviar o tempo necessário para a obtenção de resultados analíticos, melhorar a produtividade e simplificar o trabalho no laboratório. Entre esses métodos, podem-se citar: genotípicos, imunológicos, métodos bioquímicos miniaturizados e meios de cultura modificados e/ou substratos especiais, como os meios cromogênicos (KILLNER, 2008; MATA, 2009).

De modo geral, os estudos de avaliação do desempenho de métodos alternativos para detecção rápida de *Salmonella* spp. em alimentos publicados na literatura científica foram desenvolvidos com alimentos experimentalmente contaminados, trabalhando-se em condições laboratoriais artificiais (FENG, 1998)

Killner (2008) e Mata (2009) fizeram levantamentos de métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* spp. presentes no mercado e testaram alguns deles.

Killner (2008) avaliou o desempenho de sete métodos rápidos (BAX *Salmonella*, VIDAS *Salmonella*, Transia Plate *Salmonella* Gold, VIP *Salmonella*, TECRA UNQUIQUE SALMONELLA, Singlepath *Salmonella* e 1-2 Test) em 244 amostras de alimentos sem contaminação experimental, empregando um método de cultura como referência. O autor concluiu que o desempenho desses métodos pode mudar bastante quando se utilizam alimentos naturalmente contaminados ou artificialmente contaminados, bem como que a utilização como fins de triagem é a melhor opção para esses métodos, além do fato de que podem ocorrer resultados falsos-negativos e falsos-positivos.

De Paula (2002) e Mata (2009) compararam o método tradicional de cultura com alguns métodos rápidos para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de queijos Minas artesanais e em outros alimentos de origem animal que não queijo, respectivamente. Em ambos os casos, os resultados do método tradicional de cultura e dos métodos rápidos não foram diferentes significativamente e as autoras sugerem o uso dos métodos rápidos apenas para triagem de amostras negativas para *Salmonella* spp. nos métodos tradicionais.

1.5 Células Viáveis e Não Cultiváveis

Os microrganismos geralmente enfrentam uma série de condições adversas tanto no ambiente como nos alimentos. Essas condições incluem alterações de temperatura, altas concentrações salinas, falta de nutrientes e pH. Bactérias não formadoras de esporos, quando expostas às condições ambientais adversas, podem adotar como estratégia de sobrevivência, a entrada em um estado fisiológico de dormência denominado viável não cultivável (VNC), onde permanecem viáveis, metabolicamente ativas, porém incapazes de crescer em meios de cultura tradicionais (FLORESTA, 2006; MENDES, 2009).

A indução do estado VNC em *Salmonella* Typhimurium pode ser obtida em condições de desidratação, estresse osmótico, diminuição de temperatura, exposição a radiações ultravioleta, condições ácidas e decréscimo da atividade de água também (FLORESTA, 2006; MENDES, 2009).

Microrganismos no estado VNC podem retomar a culturabilidade sem que seja verificado aumento do número total de células. A este fenômeno dá-se o nome de ressuscitação. A recuperação integral da capacidade de ser cultivado pode levar vários dias. A ressuscitação está frequentemente associada à manutenção da virulência por vários patógenos, constituindo-se um risco potencial a ingestão de alimentos aparentemente seguros, mas que apresentam estes patógenos no estado viável não cultivável (FLORESTA, 2006). Ou seja: patógenos podem estar presentes em alimentos no estado VNC e não serem detectados por procedimentos laboratoriais de rotina, ocasionando a classificação errônea do alimento como adequado para consumo. Estas células, ao serem ingeridas e entrarem em contato

com fatores presentes no hospedeiro, podem retomar a capacidade de se multiplicar e causar doenças (MENDES, 2009).

Floresta (2006) estudou dois fatores de indução do estado VNC (adição de NaCl -cloreto de sódio- e refrigeração) em *Salmonella* e *Escherichia coli* e as mudanças morfológicas causadas por essas condições. A adição de NaCl reduziu a velocidade de crescimento das estirpes de *Salmonella* e *Escherichia coli* avaliadas e parte das células de *Salmonella* e *Escherichia coli* entraram, possivelmente, no estado fisiológico VNC em caldo infusão cérebro coração (BHI) e solução fosfato de Butterfield (BPS) acrescido de 0,68 M e 1,02 M e 1,02 M e 1,28 M, respectivamente, evidenciada pela perda de culturabilidade acompanhada da manutenção da viabilidade, conforme métodos estabelecidos.

Mendes (2009) avaliou a influência da estirpe, do meio de suspensão de células, da concentração salina e da densidade populacional inicial na entrada de *Salmonella enterica* no estado VNC, além de estudar o perfil de proteínas intracelulares e a presença de transcritos dos genes *invA*, *rpf*, *katF* e rDNA 16S na população de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC. Verificou-se que células de *S. Enteritidis* PT4 963 no estado VNC estão ativas metabolicamente devido à produção de transcritos para o gene rDNA16S, que pode ser considerado um marcador de viabilidade, comprovando assim o risco dessa situação em relação à segurança alimentar. Entretanto, a quantidade de RNA total produzida por células neste estado é muito menor quando comparada às células em crescimento ativo. Não houve detecção dos transcritos relacionados aos genes *invA*, *rpf* e *katF* em *S. Enteritidis* no estado VNC neste trabalho, no entanto, outros genes podem estar sendo transcritos neste estado.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

- Determinar alguns parâmetros físico químicos (umidade, A_w e pH) e avaliar a presença de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura comercializados informalmente em feiras livres da cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização da pesquisa proposta neste trabalho foram utilizados o material e métodos descrito a seguir:

3.1 Obtenção das Amostras

O número de amostras a ser coletada foi calculado com base no número de feiras livres que comercializam esse queijo no município de São Paulo em relação ao total de feiras, bem como sua distribuição na capital paulista. Ressalta-se que, em 24 de abril de 2006, a Sra. Marta Cristina de Sousa Reis, Supervisora de Feiras Livres do município de São Paulo (Secretaria de Serviços Central de Feiras) foi contatada e relatou o número total, naquela ocasião, de feiras livres (889), o número total de bancas de laticínios cadastradas (82) e o número total de feiras cadastradas que tinham bancas de laticínios (277). Também foi obtido o número de feiras livres semanal, por região (apresentado como numerador), e o número destas que tinham bancas de laticínios (no denominador): zona leste – 345/88; sul – 242/86; norte – 181/38; oeste – 90/45 e central - 31/20. Assim, considerando a proporcionalidade de bancas de feira por região da cidade, do total de 161 amostras coletadas foram assim distribuídas: 51 amostras na zona leste, 50 na zona sul, 22 na zona norte, 26 na zona oeste e 12 na zona central da cidade de São Paulo. No quadro 1, abaixo, observa-se a relação de amostra, feira-livre de origem, região da cidade e data de coleta.

(Continua)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
1	Jardim Paulista	ZO	27/3/2009
2	Jardim Paulista	ZO	27/3/2009
3	Aclimação	ZS	27/3/2009
4	Aclimação	ZS	27/3/2009
5	Aclimação	ZS	27/3/2009
6	Biológico	ZS	28/3/2009
7	Juréia	ZS	29/3/2009
8	Israel	ZS	29/3/2009

(Continuação)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
9	Israel	ZS	29/3/2009
10	Praça da árvore	ZS	25/3/2009
11	Marieta da Silva	ZN	20/9/2009
12	Ararituaba	ZN	20/9/2009
13	Ararituaba	ZN	20/9/2009
14	Vila Medeiros	ZN	20/9/2009
15	Jardim Brasil	ZN	20/9/2009
16	Jardim Brasil	ZN	20/9/2009
17	Jardim São Bento	ZN	23/9/2009
18	Jardim São Bento	ZN	23/9/2009
19	Jardim São Bento	ZN	23/9/2009
20	Tanque Velho	ZN	23/9/2009
21	Benedito Calixto	ZO	3/3/2009
22	Benedito Calixto	ZO	3/3/2009
23	Pça Charles Muller	Centro	3/3/2009
24	Bem te vi	ZS	5/3/2009
25	Jardim da Glória	ZS	5/3/2009
26	Klabin	ZS	3/3/2009
27	Eça Queiróz	ZS	4/3/2009
28	Eça Queiróz	ZS	4/3/2009
29	Vergueiro	ZS	6/3/2009
30	Gandavo	ZS	6/3/2009
31	Tanque Velho	ZN	23/9/2009
32	Santa Monica	ZN	27/9/2009
33	Vila Bonilha	ZN	27/9/2009
34	Jardim Líbano	ZN	26/9/2009
35	Vila Butantã	ZO	26/9/2009
36	Frei Caneca	Centro	1/10/2009
37	Frei Caneca	Centro	1/10/2009
38	Bosque Vila da Saúde	ZS	30/9/2009
39	Bosque Vila da Saúde	ZS	30/9/2009
40	Alcino Braga	ZS	2/10/2009
41	Alcino Braga	ZS	2/10/2009
42	Alcino Braga	ZS	2/10/2009
43	Alcino Braga	ZS	2/10/2009
44	Altino Arantes	ZS	2/10/2009

(Continuação)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
45	Altino Arantes	ZS	2/10/2009
46	Planalto Paulista II	ZS	3/10/2009
47	Otaviano Tominic-Jardim Bonfilioli	ZO	24/04/2010
48	Lajeado-Avenida Araicas	ZO	19/04/2010
49	Augostinho Cautu	ZO	23/04/2010
50	Augostinho Cautu	ZO	23/04/2010
51	Vila Gomes	ZO	24/04/2010
52	Vila Sônia	ZO	24/04/2010
53	Azevedo Coutinho	ZL	19/04/2010
54	Irma Carolina	ZL	19/04/2010
55	Vila. Invernada	ZL	19/04/2010
56	Vila Invernada	ZL	19/04/2010
57	Baixo. Viaduto Glicério	Centro	19/04/2010
58	Vila Deodoro	Centro	19/04/2010
59	Planalto Paulista II	ZS	3/10/2009
60	Vila Guarani	ZS	2/10/2009
61	Vila Guarani	ZS	3/10/2009
62	Americanópolis	ZS	3/10/2009
63	Vila Maria Baixa	ZN	3/10/2009
64	Vila Maria Baixa	ZN	3/10/2009
65	Vila Nova Conceição	ZS	13/10/2009
66	Vila Nova Conceição	ZS	13/10/2009
67	Planalto Paulista	ZS	13/10/2009
68	Planalto Paulista	ZS	13/10/2009

(Continuação)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
69	Bartira	ZS	13/10/2009
70	Bartira	ZS	13/10/2009
71	Vila Jacuí	ZL	14/10/2009
72	Vila Jacuí	ZL	14/10/2009
73	Água Funda	ZS	18/10/2009
74	Parque Arariba	ZS	7/11/2009
75	Alfaro Vila Rica	ZL	26/07/2009
76	Greco Sapopemba	ZL	26/07/2009
77	Romildo Jardim Iva	ZL	26/07/2009
78	Jericinó Vila Manchester	ZL	26/07/2009
79	Maria Franciso Vila Cruzeiro	ZL	26/07/2009
80	Rufino Barreira Grande	ZL	26/07/2009
81	Pensilvania Cidade Monções	ZO	26/07/2009
82	Padre Artur Vila Beatriz	ZO	29/07/2009
83	Oscar Porto	ZS	26/07/2009
84	Oscar Porto	ZS	26/07/2009
85	Lavandisca Moema	ZS	26/07/2009
86	Lavandisca Moema	ZS	26/07/2009
87	Vila Verde	ZL	7/11/2009
88	Vila Verde	ZL	7/11/2009
89	Itaquera III	ZL	7/11/2009
90	Itaquera III	ZL	7/11/2009
91	Itaquera	ZL	8/11/2009
92	Itaquera	ZL	8/11/2009
93	Terra Brasileira	ZL	8/11/2009
94	Terra Brasileira	ZL	8/11/2009
95	Veleiros	ZS	8/11/2009
96	Veleiros	ZS	8/11/2009
97	Cidade Dutra	ZS	8/11/2009
98	Cidade Dutra	ZS	8/11/2009
99	Vila Prell	ZS	4/11/2009
100	Dentista Barretos	ZL	14/11/2009

(Continuação)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
101	Areião	ZL	14/11/2009
102	Comendador Gil Pinheiro	ZL	15/11/2009
103	Luis Pinto	ZL	15/11/2009
104	Luis Pinto	ZL	15/11/2009
105	Liberdade	Centro	14/11/2009
106	Liberdade	Centro	14/11/2009
107	Maria José	Centro	13/11/2009
108	Maria José	Centro	13/11/2009
109	Praça Nipon	ZN	11/11/2009
110	Praça Nipon	ZN	11/11/2009
111	Vila Noêmia	ZL	12/11/2009
112	Vila Noêmia	ZL	12/11/2009
113	Jardim das Camélias	ZL	12/11/2009
114	Jardim das Camélias	ZL	12/11/2009
115	Epeira	ZO	18/11/2009
116	Epeira	ZO	18/11/2009
117	Santa Ifigenia	Centro	22/11/2009
118	Santa Ifigenia	Centro	22/11/2009
119	Brookin Paulista	ZO	20/11/2009
120	Brookin Paulista	ZO	20/11/2009
121	Iguatemi	ZO	21/11/2009
122	Iguatemi	ZO	21/11/2009
123	Vila Madalena	ZO	21/11/2009
124	Vila Madalena	ZO	21/11/2009
125	Antonio Camardo	ZL	20/11/2009
126	Antonio Camardo	ZL	20/11/2009
127	Antonio Camardo	ZL	20/11/2009
128	Antonio Camardo	ZL	20/11/2009
129	Alberto Ramos	ZLP	20/11/2009
130	Alberto Ramos	ZL	20/11/2009
131	Parque São Lucas	ZL	20/11/2009
132	Piancó	ZL	20/11/2009
133	Manaiás	ZL	20/11/2009
134	Manaiás	ZL	20/11/2009

(Conclusão)

Amostra	Feira-livre	Região da cidade	Data de coleta
135	Rep. Líbano	ZS	28/11/2009
136	Rep. Líbano	ZS	28/11/2009
137	Cris Trojenberg	ZS	28/11/2009
138	Cris Trojenberg	ZS	28/11/2009
139	Imigrantes	ZS	25/11/2009
140	Anhangabau	Centro	29/11/2009
141	Central Park Lapa	ZO	28/11/2009
142	Central Park Lapa	ZO	28/11/2009
143	Dardanelos	ZO	27/11/2009
144	Dardanelos	ZO	27/11/2009
145	Vila Uberabinha	ZO	27/11/2009
146	Ponte Rasa	ZL	25/11/2009
147	Vila Norma	ZL	29/11/2009
148	Vila Norma	ZL	29/11/2009
149	Lasar Segall	ZN	27/11/2009
150	Lasar Segall	ZN	27/11/2009
151	Lasar Segall	ZN	27/11/2009
152	Lasar Segall	ZN	27/11/2009
153	Vila Prima	ZL	3/12/2009
154	Vila Prima	ZL	3/12/2009
155	Jardim Matarazzo	ZL	4/12/2009
156	Jardim Matarazzo	ZL	4/12/2009
157	Jardim Penha	ZL	5/12/2009
158	Jardim Penha	ZL	5/12/2009
159	Santos Dumont	ZL E	6/12/2009
160	Santos Dumont	ZL	6/12/2009
161	Santos Dumont	ZL	6/12/2009

Quadro 1 - Relação das amostras de queijos Minas meia-cura coletadas, identificando a região da cidade, feira de origem e data de coleta - São Paulo – 2010

3.2 Análises Físico-Químicas

O pH e umidade foram avaliados segundo métodos oficiais (BRASIL, 2003a) e Aw, em Analisador de Atividade de Água Aqualab Serie 3TE – Decagon, conforme instruções do fabricante.

3.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foi seguida a metodologia oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003b), que se baseia, resumidamente, no pré-enriquecimento de 25g de amostra em 225 mL de água peptonada a 1% (incubação a 36°C/16-20h), enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis (41°C/24 - 30h) e caldo Selenito Cistina (41°C/24-30h), isolamento em ágar verde brilhante vermelho fenol lactose sacarose adicionado de novobiocina a 4% e ágar Rambach (36°C/18-24h).

Havendo colônias suspeitas, serão selecionadas 5 por amostra para os testes de identificação bioquímica. Para tanto cada colônia será repicada em ágar não seletivo (36°C/18-24h). O resultado será expresso como: Ausência ou presença de *Salmonella* spp. em 25g.

3.4 Identificação bioquímica

As provas bioquímicas foram realizadas em painéis para identificação de enterobactérias PROBAC do Brasil®, onde cada painel é constituído por 25 provas bioquímicas: Indol; Voges Proskauer; citrato de Simmons; produção de H₂S; hidrólise da uréia; triptofano desaminase; descarboxilação de lisina, arginina, ornitina e controle (base Moeller); malonato; utilização de glicose em meio base O/F; utilização dos açúcares: lactose, sacarose, manitol, adonitol, mioinositol, sorbitol, arabinose, rafinose, ramnose, maltose, melobiose, xilose; ONPG; hidrólise da esculina e a prova adicional de oxidase totalizando 26 provas. A identificação ocorre através das alterações de pH, hidrólise dos substratos e produção de produtos metabólicos. O painel consiste dos substratos desidratados das provas distribuídos em microplaca.

O teste foi realizado a partir da colônia suspeita isolada no Agar não seletivo de 18 a 24 horas de crescimento, da qual uma alçada é suspensa em 3 a 4 mL da Solução Inoculante Probac do Brasil® na escala 0,5 McFarland, sendo que para cada colônia testada foi utilizado um painel.

Em seguida, foi aberto o envelope protetor do painel a ser utilizado e distribuído, 0,1 mL (100 µl) desta suspensão de bactéria e solução inoculante, bem homogeneizada, em cada pocinho da microplaca, com auxílio de uma pipeta estéril.

Então, uma gota de óleo mineral estéril foi pingada nas provas sublinhadas: H₂S (A4), Uréia (A5), Controle da Descarboxilação (A7), lisina(A8), arginina (A9), ornitina (A10), glicose (A12).

A seguir, foi realizada a prova de oxidase do isolado, com auxílio de uma fita, que é retirada rapidamente do frasco, e de alça de platina ou bastão de vidro ou madeira. Foi feito esfregão da bactéria a ser identificada na fita. Não foi utilizado nenhum tipo de alça ou bastão que tivesse vestígios de ferro, pois este catalisaria a reação de oxidação do reagente, resultando em reação falso-positiva. Foi realizado controle positivo com *Pseudomonas aeruginosa* e controle negativo com *E. coli*. Em seguida, foi colocado o painel na embalagem e incubado por 36°C por 18-24 horas.

3.5 Identificação Sorológica

As colônias suspeitas de serem *Salmonella* spp. foram submetidas à reação sorológica frente ao antisoro polivalente anti “O” e anti “H” PROBAC do Brasil® e o resultado foi expresso como presença ou ausência em 25g de queijo. As cepas que por ventura vierem a ser isoladas por esse método serão armazenadas para estudos moleculares posteriores, congeladas em caldo BHI glicerinado 5%.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos, baseados nas metodologias definidas para o presente estudo, estão descritos nos itens a seguir.

4.1 Análise físico-química

Foram realizadas análises físico-químicas em 20 das 161 amostras que se submeteram à análise microbiológica. Os resultados mostraram grande variabilidade dos dados, sugerindo falta de controle do processo de fabricação desse tipo de queijo, o que era esperado, em função de ser um produto fabricado em condições não controladas. Durante a coleta de amostras, foi observada visualmente a discrepância entre os estágios de maturação, de textura e de umidade entre os queijos vendidos sob a denominação de “queijo Minas meia-cura”, como ilustra a figura 1.

Figura 1 - Variedade de queijos vendidos como Minas meia-cura na feira em São Paulo

Como o critério microbiológico estabelecido para queijos é baseado na sua classificação quanto à umidade (BRASIL, 1994), os resultados físico-químicos estão apresentados na tabela 1, agrupados conforme o teor de umidade das amostras.

Observa-se na tabela que a maioria (78,1%) das amostras analisadas foram classificadas como queijo de baixa ou de média umidade (umidade média das 32 amostras em que foram feitas análises físico químicas de 29,92).

Os valores da Aw variaram de 0,87 a 0,98, com média geral de 0,94.

Quanto ao pH, o valor mínimo registrado foi de 4,4 e o máximo foi de 6,4, com média geral de 5,1.

Tabela 1 - Resultado descritivo das análises físico químicas de queijos Minas meia-cura provenientes de feira livres, segundo a classificação oficial pelo teor de umidade. São Paulo, mar. 2009 a nov. 2009.

classificação quanto ao teor de umidade	número de amostras na categoria	descritivo	U (%) (+++++)	Aw (+++++)	pH (+++++)
m.a.U. (†) (> 55%)	n=1 (3,1%)		55,4	0,93	5,2
a.U. (††) (46-54,9%)	n=0				
m.U. (†††) (36-45,9%)	n=6 (18,8%)	Média	39,66	0,96	5,34
		Desvio padrão	3,20	0,015	0,86
		Mediana	38,0	0,96	5,11
		Mínimo	38,0	0,94	4,6
		Máximo	45,9	0,98	6,4
b.U. (††††) (< 35%)	n=25 (78,1%)	Média	25,33	0,94	5,31
		Desvio padrão	5,16	0,0119	0,272
		Mediana	26	0,94	5,25
		Mínimo	19,2	0,87	4,4
		Máximo	34,0	0,98	5,8

(†) Muito alta umidade; (††)Alta umidade; (†††) Média umidade; (††††) Baixa umidade
(+++++) umidade percentual; (+++++) atividade de água; (+++++) potencial
hidrogeniônico

4.2 Presença de *Salmonella* spp.

Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. em 25 gramas.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Não há muita informação na literatura sobre dados físico-químicos de queijo Minas meia-cura, talvez, pela dificuldade de se padronizar esse produto, já que se trata de um produto informal. Os dados disponíveis de produtos que se assemelham a ele retratam uma variedade nos resultados, confirmando a falta de padronização.

Neste trabalho, a maioria das amostras foi classificada em baixa e média umidade, concordando assim com Ide e Benedet (2001), que encontraram valor médio de 43,72% (média umidade) para queijo colonial, porém discordando de Machado et al. (2004), que analisaram queijo Minas artesanal e encontraram valor médio de 50,8 % (alta umidade).

Os resultados de Aw encontrados neste trabalho (de 0,87 a 0,98) são semelhantes aos encontrados por Sousa et al. (2006), que registraram Aw de queijos Minas meia-cura informais entre 0,83 e 0,98. Porém, discordam com os resultados encontrados por Favaro et al. (2006), cujos valores em queijos Minas meia-cura informais variaram entre 0,94 e 0,98. Isso mostra como o queijo Minas vendido como meia-cura apresenta grande variação na quantidade de água livre, parâmetro importante na modulação da atividade microbiana.

Quanto ao pH, houve grande variação também nos resultados obtidos: 4,4 a 6,4 (pH médio de 5,1). Favaro et al. (2006) obtiveram pH de queijos Minas meia-cura entre 4,6 e 5,3, enquanto Ide e Benedet (2001), encontraram valores médios em queijo Minas colonial de pH 5,4 e Machado et al. (2004), que analisaram queijo Minas artesanal e encontraram valor médio de pH de 4,98.

Mata (2009), analisando queijo Minas artesanal (que é um tipo Minas com cura curta) da Cooperativa de Produtores Rurais do Serro (MG) obteve, aos 37 dias de maturação, os seguintes resultados médios de umidade, Aw e pH: 49,1% (alta umidade); 0,913 e 5,24. Aos 69 dias de maturação, houve alteração significativa dos valores médios de Aw e pH: 0,924 e 5,66.

Salmonella spp. pode tolerar pH 4,5 a 9, com ideal de 6,5 a 7,5 (ROITMAN; TRAVASOS; AZEVEDO, 1988; TRABULSI et al., 2002; FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001; FORSYTHE, 2002; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005), ao passo que a Aw ideal é 0,94 a 0,99, com faixa tolerável de 0,93

a 0,95 (FRAZIER; WESTHOFF, 1993). Portanto, os valores encontrados de pH (4,4 a 5,4, com média de 5,1) apesar de não ideais ao desenvolvimento do agente, estão dentro da faixa tolerável ao agente, com exceção à uma amostra (com pH de 4,4). Porém, os valores encontrados de Aw (0,87 a 0,98, com média de 0,94) estão dentro dos valores ideais à *Salmonella* spp., com exceção à uma amostra (com Aw de 0,87).

Diversos autores já relataram a pesquisa *Salmonella* spp. em queijo Minas frescal, porém há poucos trabalhos em queijos Minas meia-cura.

Os resultados dessa pesquisa divergem dos encontrados por Sousa et al. (2006), que informou 30% (3/10) das amostras de queijos Minas meia-cura informais positivas para *Salmonella* spp. na cidade de Jacareí-SP. Vialta et al. (2003) avaliaram a presença de *Salmonella* spp. e outros agentes patogênicos em 48 amostras de queijos Minas meia-cura clandestinos apreendidos no estado de São Paulo, mas nenhuma amostra foi positiva, assim como neste trabalho, embora os resultados obtidos demonstrassem claramente as péssimas condições higiênico-sanitárias dos produtos, ficando clara a necessidade de se mobilizar forças que estimulem a coibição do comércio de tais produtos, protegendo assim os consumidores, bem como a necessidade de sensibilizar os produtores clandestinos a passarem para a formalidade (BORGES; BRANDÃO; PINHEIRO, 1990) avaliaram a sobrevivência de *S. Typhi*, *S. Typhimurium* e *S. Dublin* em queijo Minas padronizado (curado) elaborado a partir de leite cru (valores médios de contagem padrão em placas e coliformes totais, em UFC/mL e NMP/mL, de $2,1 \times 10^6$ e $5,2 \times 10^3$), durante o período de maturação (60 dias) a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), sendo que uma mistura dessas espécies de *Salmonella* spp. foi inoculada ao leite cru previamente à elaboração dos queijos, bem como a carga inicial. Nesse período (maturação por 60 dias), a cada 15 dias, foi realizada pesquisa de ausência ou presença de *Salmonella* spp.. As salmonelas sobreviveram, nos queijos avaliados, por um período de 30-45 dias de maturação, o que sugere risco em relação à segurança alimentar desses produtos.

Além disso, Melo, Alves e Costa (2009) avaliaram as características microbiológicas de queijos tipo Minas padrão na cidade de São Luís/MA e também não encontraram amostras de positivas para *Salmonella* spp. (0/30), concordando também com os resultados deste trabalho, assim como Ávila e Gallo (2003), que verificaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e

queijo Minas frescal, não encontrando nenhuma amostra positiva (0/57) para este agente. Salotti et al. (2006) avaliaram amostras de queijos Minas frescal de origem artesanal e industrial, sendo 60 amostras no total. Os resultados microbiológicos revelaram que 86,7% (25/30) das amostras artesanais e 66,7% (20/30) das amostras industriais estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente, devido a altos valores de Números mais prováveis (NMP/g) de coliformes fecais ($\geq 5,0 \times 10^2$ NMP/g) e altas contagens de estafilococos coagulase positiva ($\geq 5,0 \times 10^2$). Não foram encontradas amostras positivas para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. Já Garcia-Cruz, Hoffmam e Vinturim (1994) pesquisaram a presença *Salmonella* spp. e outros agentes patogênicos em amostras de queijos Minas frescal artesanais de São José do Rio Preto/SP, sendo que 54,5% (6/11) foram positivas para este agente.

Já Feitosa et al. (2003) verificaram 9% (1/10) e 15% (2/15) das amostras de queijos coalho e queijo de manteiga positivas para *Salmonella* spp., respectivamente, ao passo que Santana et al. (2008) encontrou 26,7% (16/60) das amostras de queijos-coalho comercializados em 15 pontos de venda do Mercado Central de Aracaju/SE positivas para *Salmonella* spp.. É importante lembrar que o queijo Minas frescal, bem como o queijo tipo coalho e o de manteiga, tem umidade mais alta que o queijo Minas meia-cura, possibilitando assim um melhor ambiente para o desenvolvimento de microrganismos, entre eles a *Salmonella* spp..

Schneider (2009) avaliou a qualidade microbiológica do queijo Serrano de Cambará do Sul, com diferentes períodos de maturação e concluiu que 11% (3/27) das amostras eram impróprias para consumo humano, devido a contagens altas de Coliformes a 45°C ($3,6 \times 10^3$, 10^4 , $1,2 \times 10^4$), porém não foi verificada a presença de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus* coagulase positiva em nenhuma amostra. Como possíveis causas para os resultados encontrados, o autor ainda cita a menor capacidade competitiva de *Salmonella* spp. frente a coliformes e estafilococos e a não infecção dos bovinos por este agente, uma vez são criados em sistema extensivo, diminuindo assim o contato com as fezes, principal fonte de contaminação por *Salmonella* spp. em animais. Pereira et al. (1999), que pesquisaram a presença deste agente em queijos Minas (frescal, canastra e padronizado) informais e formais na cidade de Belo Horizonte-MG, não encontraram amostras de positivas para *Salmonella* spp. (0/168), concordando assim como os resultados do presente trabalho, afirmando ainda que esta ausência de *Salmonella*

spp. pode ser admitida, possivelmente, em função de sua discreta incidência no leite, bem como da ação deletéria de metabólitos da flora acompanhante, no caso os coliformes fecais, significativamente elevada no trabalho citado.

Segundo Roitman, Travassos e Azevedo (1988), o não isolamento de *Salmonella* spp. supõe a presença de uma microbiota bacterianas, especialmente as bactérias ácido lácticas (BAL), que são responsáveis por processos bioquímicos que tornam o queijo um meio adverso para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, sendo que além disso as salmonelas são péssimas competidoras.

Além disso, não foram feitos estudos quanto ao antagonismo de eventuais bactérias lácticas com atividade antagonista à *Salmonella* spp. presentes nos queijos Minas meia-cura nesse trabalho, porém Alexandre et al. (2001) demonstrou a presença de bactérias lácticas com amplo espectro antimicrobiano, incluindo *Salmonella* Enteritidis var. Typhimurium, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* em amostras de queijo-de-Minas artesanal (que é um tipo Minas com cura curta), oriundos da região do Serro, MG. Por sua vez, Neto et al. (2005) avaliou a atividade antagonista de bactérias ácido-lácticas (quatro cepas de *Lactobacillus* spp. e duas cepas de *Lactococcus* spp.) isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente aos patógenos isolados dos mesmos queijos (*Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*) e frente a diversas cepas de patógenos de referência, encontrando cepas de bactérias lácticas antagonistas à *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e à *Salmonella enterica* sorovar Typhi. Porém, Ortolani (2009) não detectou em amostras de queijo Minas frescal (0/16) produzidos com leite cru na região de Viçosa/MG, bactérias com atividade antagonista à *Salmonella* Typhimurium, mas sim com atividade antagonista a outros microrganismos patogênicos Gram Positivos como *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* dado que microrganismos Gram Negativos, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* possuem a camada dupla lipídica externa que pode dificultar a absorção pela membrana plasmática das substâncias antagonistas produzidas pelas BAL, o que explicaria um menor índice ou ausência de BAL antagonistas a esses agentes. Contudo, não se pode descartar a eventual existência de outros tipos de substâncias antagonistas contra Gram Negativos não incluídas neste estudo.

Conforme sugerido por De Paula (2002) e Mata (2009), os métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos são aplicados como triagem, para

identificar rapidamente as amostras negativas. Além disso, são métodos com alta sensibilidade, mas menor especificidade, os resultados positivos precisam ser confirmados pelo método tradicional.

Uma condição que pode ter contribuído para os resultados negativos encontrados nessa pesquisa é a ocorrência de células viáveis e não cultiváveis. Floresta (2006) e Mendes (2009) mostraram que a fatores como presença de NaCl, pH ácido, refrigeração e a redução da A_w que são características intrínsecas ou inerentes a fabricação ou armazenamento do queijo Minas meia-cura, podem induzir *Salmonella* spp. a entrar no estado VNC, ou seja, as bactérias não são detectadas na metodologia convencional, embora estejam ativas metabolicamente e possam, posteriormente, em ressuscitação, voltando a se multiplicar e causar doenças. Não foram realizados testes para detecção de bactérias em estado VNC neste trabalho.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que a ocorrência de *Salmonella* spp. em queijo Minas meia-cura comercializado em São Paulo é baixa, o que permite deduzir que o risco de adquirir salmonelose pelo consumo desse queijo é, aparentemente, também baixo.

No entanto, deve-se considerar que não foi avaliada neste trabalho a presença de *Salmonella* spp. no estado de viáveis e não cultiváveis, em que poderiam manter o potencial de virulência, mas que não permite o isolamento por métodos tradicionais de análise.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABIQ – Associação Brasileira das Indústrias de Queijos. **Queijos - Mercado Total Brasileiro**. Compilado e organizado por Disney Criscione, São Paulo, 2005.

ALBUQUERQUE, L. C.; SAITO, M. M.; Queijo Minas padronizado. 2007. Disponível em: <<http://www.cienciadoleite.com.br/Minaspadrao.htm>>. Acesso em: 07 maio 2008.

ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-Minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.

ALMEIDA, P. M. P.; FRANCO, R. M. Avaliação bacteriológica de queijo tipo Minas frescal com pesquisa de patógenos importantes à saúde pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e coliformes fecais. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 11, p. 79-85, 2003.

ALMEIDA FILHO, E. S.; LINDER, A. L.; ALMEIDA, D. S. D.; SIGARINI, C. D. O.; FERREIRA, M. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo frescal. **Revista de Saúde Pública**, v. 6, n. 34, p. 578-580, 2000.

ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo tipo Minas frescal de produção artesanal, comercializado em Poços de Caldas, MG. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p. 71-73, 2002.

AMARAL, L. A.; IARIA, S. T.; NADER FILHO, A. Variação das características físico-químicas e microbiológicas das salmouras empregadas na salga de queijos tipo Minas frescal durante o período de sua utilização. **Revista de Microbiologia**, v. 22, p. 136-40, 1991.

ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo “Minas Frescal” comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agrícola**, v. 53, n. 1, p. 159-163, 1996.

BALABAN, N.; RASOOLY, A. Staphylococcal Enterotoxins [review]. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 1-10, 2000.

BORGES, M. F.; BRANDÃO, S. C. C.; PINHEIRO, A. J. R. Sobrevivência de *Salmonella* spp em queijo Minas padronizado durante a maturação. **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 3, p. 276-281, 1990.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-Minas artesanal do Serro-MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento. Resolução nº. 7 de 28 de novembro de 2000. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil],

Brasília DF, 2 jan. 2001. Seção 1, p. 22. Disponível em: < http://www.agais.com/normas/leite/queijo_func_queijarias.htm > . Acesso em: 11 nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº. 146 de 07 de março de 1996. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 11 nov. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 352 de 04 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF 08 de set. 2007. Seção 1, p. 19684. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1220>>. Acesso em: 08 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 22 de 14 de abril de 2003. Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químico para o controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 02 mai. 2003a. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para o Controle de produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 18 set. 2003b. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura. RIISPOA: Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Decreto no.30.691 de 29 de março de 1952. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 07 jul. 1952. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC n.12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 10 jan. 2001. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> >. Acesso em: 22 nov. 2008

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Resolução GMC n. 69** de 1994. Fixar os requisitos microbiológicos que deverão obedecer os queijos. Disponível em: <http://www.mercosur.int/msweb/porta1%20intermediario/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/GMC_RES_1993-069_PT_RTM_Microbiologicos_Queijos.PDF>. Acesso em: 22 nov. 2008

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no Mercado Municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Higiene Alimentar**, v.16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. D.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFINI, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores, de leite cru e de queijo “Minas Frescal” em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1221-1227, 2006.

CORREIA, M.; RONCADA, M. J. Características microscópicas de queijos prato, mussarela e mineiro comercializados em feiras livres na cidade de São Paulo. São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 296-301, 1997.

D'AOUST, J. Y. Salmonella and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, n. 24, p. 11-31, 1994.

DE PAULA, A. M. R. **Detecção de Salmonella em alimentos crus de origem animal empregando os imunoensaios rápidos TECRA Salmonella VIA, TECRA Salmonella UNIQUE e o método convencional de cultura**. 2002. 49 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

FAVARO, C. F.; BALIAN, S. C.; AMAKU, M.; RAMOS E SILVA, E. O. T. Determination of water activity, pH, coagulase positive *Staphylococcus* counts, total and fecal coliform counts in Minas meia cura cheese sold in street markets in the southern region of the city of São Paulo. **Veterinária e Zootecnia**, v. 13, n. 2, p. 201-207, 2006.

FEITOSA, T.; BORGES, M. D. F.; NASSU, R. T.; AZEVEDO, E. H. F. D.; MUNIZ, C. R. Pesquisa de *Salmonella* sp, *Listeria* sp e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162-165, 2003.

FENG, P. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. In: UNITED STATES. **Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Bacteriological analytical manual**. 8. ed. Gaithersburg: FDA, 1998. Appendix 1. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-a1.html>. Acesso em: 21 set. 2008.

FLORESTA, F. A. Condições para indução do estado Viável e Não Cultivável em *Salmonella* e *Escherichia coli*. 2006. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2006.

FORSYTHE, S. F. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Acribia, 1993.

GARCIA-CRUZ, C. H.; HOFFMAN, F. L.; VINTURIM, T. M. Estudo microbiológico de queijo tipo Minas-frescal de produção artesanal, comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 54, n. 2, p. 78-82, 1994.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001.

GRADI, A. Z. de; ROSSI, D. A. Qualidade microbiológica do queijo Minas produzido em Uberlândia. **Horizonte Científico: a Revista Eletrônica da PROPP**, v. 1, n. 7, 2007. Disponível em:

<[http://www.horizontecientifico.propp.ufu.br/viewissue.php?id=5#Ciências Agrárias](http://www.horizontecientifico.propp.ufu.br/viewissue.php?id=5#Ciências_Agrárias)>. Acesso em: 07 maio 2008.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the Salmonella serovars**. Paris: Instituto Pasteur e Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), 2007. 9th WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella.

HOFFMANN, F. L.; SILVA, J. V.; VINTURIM, T. M. Qualidade microbiológica de queijos tipo “Minas frescal”, vendidos em feiras livres na região de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v. 96, p. 69-76, 2002.

ICMSF. INTERNATIONAL COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION **Microorganismos de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, 439 p.

IDE, L. P.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do estado de Santa Catarina. **Revista Ciência Agrotecnica**, v. 25, n. 6, p. 1351-1358, 2001.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7th ed. New York: Springer Science and Business Media, 2005. 790 p. (Food Science Text Series).

KILLNER, M. **Paralelos entre métodos fenotípicos, imunológicos e genotípicos para a detecção rápida de Salmonella spp em matrizes alimentares sem contaminação experimental: avaliações em condições reais e simultâneas de uso**. 2008. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. v. 1.

LINTON, M.; MACKLE, A. B.; UPADHYAY, V. K.; KELLY, A. L.; PATTERSON, M. F. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Camembert cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 423-428, 2008.

LISITA, M. O. **Evolução da População Bacteriana na Linha de Produção do Queijo Minas Frescal em uma Indústria de Laticínios**. 2005. 61 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M.; SOARES, F. M.; JÚNIOR, F. N. P. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na Região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese maturation and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.

MATA, G. M. S. C. **Comparação de métodos para pesquisa de Salmonella e Listeria sp e avaliação microbiana e físico química em queijo Minas artesanal**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

MELO, A. C. M.; ALVES, L. M. C.; COSTA, F. N. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo tipo Minas padrão comercializado na cidade de São Luís/MA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n. 4, p. 547-551, 2009.

MENDES, R. A. Estado Viável Não Cultivável em Salmonella enterica: indução, perfil de proteínas intracelulares e detecção de mRNA. 2009. 96 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2009.

MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. M.; YAMAZI, A. K.; ORTOLANI, M. B. T.; NERO, L. A. Foodborne Pathogens and Microbiological Characteristics of Raw Milk Soft Cheese Produced and on Retail Sale in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 2, p. 245-249, 2009.

NETO, L. G. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-láticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p. 245-250, 2005.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; ORTOLANI, M. B. T.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. Listeria monocytogenes and Salmonella spp. in Raw Milk Produced in Brazil: Occurrence and Interference of Indigenous Microbiota in their Isolation and Development. **Zoonoses and Public Health**, v. 55, n. 6, p. 299-305, 2008.

NOGUEIRA, M. G. **Avaliação de prebióticos e bacteriófagos lícitos para o controle de Salmonella em suínos experimentalmente infectados**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2010.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido lácticas autóctones de leite cru e queijo Minas fresco: isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2009.

ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; MORAES, P. M.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. 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**, v. 7, n. 2, p. 175-180, 2010.

PANETO, B. R.; SHOCKEN-ITURRINO, R. P.; MACEDO, C.; SANTO, E.; MARIN, J. M. Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 508-512, 2007.

PEDRO, S. C. M. **Avaliação da qualidade higiênico sanitária dos locais de venda e de amostras de queijo Minas meia-cura, comercializado na cidade de São Paulo**. 2003. 85 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijos Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 427-431. 1999.

PERESI, J. T. M.; GRACIANO, R. A. S.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; LIMA, S. I.; RIBEIRO, A. K.; CARVALHO, I. S. D.; LIMA, M. D. Queijo Minas tipo frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v. 83, n. 5, p.63-70, 2001.

PINTO, P. S. A.; GERMANO, M. I. S.; GERMANO, P. M. L. Queijo Minas: problema emergente da vigilância sanitária. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 44, p. 22-27, 1996.

PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos Ltda. Painel para enterobactérias Probac. São Paulo: PROBAC DO BRASIL Produtos Bacteriológicos, [2010].

RALL, V. L. M.; RALL, R.; ARAGON, L. C.; SILVA, M. G. Evaluation of three enrichment broths and five plating media for *Salmonella* detection in poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 147-150, 2005.

ROITMAN, I.; TRAVASOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de microbiologia**. São Paulo: Manole, 1988. 186 p.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTIS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no Município de Jaboticabal – SP. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.

SANTANA, R. F.; SANTOS, D. M.; MARTINEZ, A. C. C.; LIMA, A. S. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 6, p. 1517-1522, 2008.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria Municipal de Coordenação das Subprefeituras. **História das feiras livres**. São Paulo, 1995. Disponível em: <http://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/subprefeituras/abastecimento/feiras_livres/historico/index.php?p=6637>. Acesso em: 30 jan. 2010.

SCHNEIDER, R. N. **Análise microbiológica e do sistema produtivo do queijo serrano produzido no município de Cambará do Sul/RS**. 2009. 59 f. TCC

(Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, 2009.

SILVA, M. R.; PORTES, V. M.; MENIN, A.; ALVES, F. S. F. **Doenças transmitidas pelo leite e sua importância em saúde pública**. 18 de Janeiro de 2007. Disponível em: < <http://www.cienciadoleite.com.br/artigo.htm>>. Acesso em: 30 maio 2008.

SOUSA, D. D. P.; GUMARÃES, R.; VILLELA, F. R. M. A.; MENDES, H. M. F.; OLIVEIRA, N. S. P. D.; TUCCI, T. M.; BRAGA, M. D. C.; BALIAN, S. C.; TELLES, E. O. Avaliação da qualidade higiênico- sanitária de queijo Minas frescal e meia cura comercializados de forma informal em Jacareí-SP. **REVISA**, v. 2, n. 1, p. 60-63, 2006.

TEIXEIRA, L. V.; FONSECA, L. M. Perfil físico-químico do soro de queijos mozzarella e Minas-padrão produzidos em várias regiões do estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 1, p. 243-250, 2008.

TRABULSI, L. R., CAMPOS, L. C., LORENÇO, R. Salmoneloses. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds). São Paulo, Atheneu, 2002. p. 878-885.

VENTURA, R. F. Queijo Minas “Meia Cura”; características físico-químicas. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 10., 1988, Juiz de Fora, **Anais...** [S.l.: s.n], 1988, p. 38.

VIALTA, A.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; VIEIRA, M. C.; GRAEL-MARASCA, E. T.; BARBIERI, M. K.; SOUZA, F. K. H.; ALMEIDA, A. R.; POMPEI, J. C. A.; MARTINI, M.; LEAL, C. M.; LIMA, Z. M. B.; PRADO, M. V.; SCARCELLI, E.; ROXO, E.; BALDASSI, L.; TEIXEIRA, A. C.; PAULIN, L. M.; GENOVEZ, M. E. Caracterização microbiológica, microscópica e físico-química de produtos lácticos clandestinos apreendidos no estado de São Paulo. **REVNET DTA**, v. 3, n. 6, p. 212-216. 2003.

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. 3, p. 862-867, 2007