



**Perfil microbiológico e sensorial do queijo tipo Emmental embalado sob três condições**

# **INSTITUTO BIOLÓGICO**

## **PÓS-GRADUAÇÃO**

**Perfil microbiológico e sensorial do queijo tipo Emmental embalado sob três condições**

**ROSANGELA DE SALES SOUSA**

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Scarcelli Pinheiro

**São Paulo  
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo**  
**Núcleo de Informação e Documentação – IB**

---

Sousa, Rosângela de Sales.

Perfil microbiológico e sensorial do queijo tipo Emmental embalado sob três condições. / Rosângela de Sales Sousa. – São Paulo, 2016.  
77 p.

Dissertação (Mestrado). Instituto Biológico (São Paulo). Programa de Pós-Graduação.

Área de concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema.  
Linha de pesquisa: Qualidade de produtos e processos na produção animal.  
Orientador: Eliana Scarcelli Pinheiro.

Versão do título para o inglês: Microbiological and sensory profile of Emmental cheese packed in three conditions.

1. Emmental 2. *Staphylococcus* 3. *Salmonella* 4. *Listeria* 5. *Clostridium*  
I. Sousa, Rosângela de Sales II. Pinheiro, Eliana Scarcelli III. Instituto Biológico (São Paulo). IV. Título.

*IB/Bibl./2016/02*

---



**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**

AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO

**Pós-Graduação**

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252

CEP 04014-002 - São Paulo - SP

secretariapg@biologico.sp.gov.br



**INSTITUTO BIOLÓGICO**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Nome do candidato:** Rosangela de Sales Sousa

**Título:** Perfil microbiológico e sensorial do queijo tipo Emmental embalado sob três condições

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Eliana Scarcelli Pinheiro

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Segurança Alimentar e Sanidade no Agroecossistema

Aprovada em:

Banca Examinadora

Assinatura:

\*Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Eliana Scarcelli Pinheiro

\*Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

\*Prof. Dr.: Hans Fröder

\*Instituição: Universidade Ibirapuera, UNIB

Assinatura:

\*Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>: Alessandra Figueiredo de Castro Nassar

\*Instituição: Instituto Biológico

*Dedico este trabalho à minha  
amada mãe, a mulher mais incrível  
que conheço!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por Seu infinito amor, por me guiar, me proteger e sempre me carregar em Seus braços nos momentos de dificuldade.

À **Rosa Maria de Sales Sousa**, minha querida e amada mãe, que sempre me conduziu pelos caminhos do bem, me ensinando a ser cada dia melhor. Sem seu apoio e seus esforços eu não teria chegado até aqui. Obrigada por todo amor, carinho, dedicação, cuidado e paciência, ser sua filha é meu maior orgulho! Te amo imensamente!

Ao **Sebastião Almeida Sousa**, meu amado e eterno pai, que de onde estiver sei que olha por nós e está presente em todas as minhas conquistas. Obrigada por seu amor e carinho, tenho certeza que um dia nos encontraremos.

À **Eliana Scarcelli Pinheiro**, minha querida orientadora, por aceitar me orientar e por toda sua paciência, compreensão e sabedoria. Por me acalmar em todos os momentos de nervosismo e por todo seu auxílio. Foi um imenso prazer conviver com você nesses dois anos.

À **Alessandra Figueiredo de Castro Nassar**, minha querida chefe, por todas as oportunidades que você me deu desde o início, pois sem elas eu não estaria aqui, e por tudo que me ensinou. Obrigada por acreditar e confiar em mim. Obrigada pela sua amizade, apoio, auxílio e por se preocupar comigo. Sou imensamente grata à você por tudo!

Ao **Hans Fröder**, meu querido professor de microbiologia, por compartilhar seus valiosos conhecimentos durante a minha graduação e por aceitar participar de mais uma etapa da minha formação acadêmica. Obrigada pelo auxílio e pelos ensinamentos de sempre!

Ao **Dr. Airton Vialta**, do Instituto de Tecnologia de Alimentos, pela contribuição nas correções.

À **Simone Miyashiro**, por todas as sugestões de correção, **Gabriela Terezinha Daniel**, por me ensinar as metodologias, assim como as demais meninas do Laboratório de Bacteriologia Geral e Tuberculose: **Renata Esper**, **Bernadete Pereira**, **Aline Gomes** e **Cristina Dib** por me receberem tão bem desde o meu primeiro dia. Todas são muito queridas e especiais para mim. Obrigada por fazerem meus dias mais divertidos, pelas conversas, risadas e por todas as nossas “gordices”.

Ao **Laticínio**, pelo fornecimento das amostras para análise, assim como à **Aline Rezende**, que sempre foi um amor comigo, respondendo todas as minhas dúvidas e me auxiliando em tudo que precisei.

Ao Prof. Dr. **Sérgio Santos de Azevedo**, da Universidade Federal de Campina Grande, pela análise estatística.

Ao **Instituto Biológico** e todos os **docentes** e **palestrantes** da pós-graduação, por ensinarem e dividirem conosco seus conhecimentos e suas experiências, foi uma caminhada de novos aprendizados e desafios. Obrigada por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos **alunos da pós-graduação** do Instituto Biológico 2014-2016, pelo companheirismo, amizade e convivência nesses dois anos.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela concessão da bolsa.

À **Maria Emília de Sales**, minha amada avó, que mesmo distante sempre ora por mim e vibra a cada conquista minha. Por todos os seus sábios ensinamentos e conselhos. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao **Adriano de Sales Sousa** e **Carla Martins**, meus queridos irmão e cunhada, por serem presentes em minha vida e por todos os momentos que passamos juntos. Obrigada por todo apoio e por serem parte dessa grande família que eu tanto amo!

À **Raquel, Bruna, Gabriela e Júlia**, minhas queridas sobrinhas, por todo amor e carinho que vocês me dão. Pela confiança, amizade e por todas as risadas, que não são poucas. Obrigada por fazerem parte da minha vida, pois sem vocês ela não seria tão colorida e animada.

Ao **Vinícius Braga Rodrigues**, o grande amor da minha vida, por todo amor, carinho, paciência e compreensão. Por seu apoio incondicional, não apenas nessa etapa como em todos os momentos que precisei. Estar ao seu lado é o melhor presente que eu poderia receber!

À **Cristina, Gustavo e Nércia Braga**, minha sogra, cunhadinho e avó postiça, por terem me recebido tão bem desde sempre e terem me acolhido como parte da família. Obrigada pelas

conversas, risadas, pelo apoio e preocupação. Obrigada por todos esses anos de convivência e aprendizados.

À **Elza Eleutério Sinokava**, minha querida “professora do pré”, que mesmo após tantos anos continua me acompanhando e torcendo por cada conquista minha. Minha primeira professora que eu levo com muito carinho em meu coração. Obrigada ter sido a base do meu conhecimento e mesmo de longe fazer parte da nossa família!

À **Ana Beatriz Monteiro Ferreira**, minha pequena grande amiga, meu presente ao iniciar o mestrado. Obrigada por trilhar esse caminho comigo. Obrigada pelas nossas conversas, inclusive na madrugada, pelas aulas e trabalhos que compartilhamos, mesmo separadas em algumas delas. Que a sua presença seja sempre constante e a nossa amizade eterna.

À **Débora Campos Micas**, minha irmã postiça, por estar sempre ao meu lado. Por todo apoio, auxílio, desabafos, conselhos e banquetes deliciosos que você faz. Obrigada por permitir que eu faça parte da sua vida e da nossa princesinha Angelina.

À **Jackeline Almeida, Maria Francisca Carvalho e Shirley Araújo**, minhas queridas “elementas” e irmãs, por toda amizade e apoio. Agradeço pelas voltas que a vida deu e fez com que nos encontrássemos na Biomedicina. Não importa o momento, se é bom ou ruim, estamos e estaremos sempre unidas. Obrigada por torcerem sempre por mim e estarem presente em mais essa etapa.

À **Ívana Neves da Silva**, minha primeira amiga e irmã de coração, pela amizade que perdura por anos e tenho certeza que será eterna. Você está presente em todos os momentos da minha vida, mesmo que seja apenas por pensamento. Obrigada pela torcida e pelo nosso anjinho Tales.

Aos meus filhos de quatro patas: **Melody, Theodore, Alfredo, Clara e Bolinha**, por fazerem meus dias mais felizes e por intensificarem meu amor por animais, um amor que nem eu mesma sabia que era tão grande!

E a todos que contribuíram e compartilharam dessa jornada comigo direta ou indiretamente. Muito obrigada!

*“Que os vossos esforços desafiem  
as impossibilidades, lembrai-vos de  
que as grandes coisas do homem  
foram conquistadas do que parecia  
impossível”*

*(Charles Chaplin)*

SOUSA, R.S. PERFIL MICROBIOLÓGICO E SENSORIAL DO QUEIJO TIPO EMMENTAL EMBALADO SOB TRÊS CONDIÇÕES. São Paulo. 2016. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## RESUMO

O queijo é um alimento frequentemente utilizado na dieta da população, tanto no Brasil quanto mundialmente, entretanto sua composição rica em nutrientes facilita a contaminação por micro-organismos resultando em surtos alimentares. A análise microbiológica visa diminuir essa contaminação e o potencial risco causado à população, para isso são necessárias medidas de segurança e de fiscalização, que vão desde a matéria-prima até o processamento e conservação adequada do produto. Outro fator importante relacionado aos queijos são as embalagens nas quais são acondicionados, que devem ser adequadas, evitando assim, alterações microbiológicas ou sensoriais que possam prejudicar à saúde do consumidor e dispêndio aos fabricantes. Avaliando esses fatores, o objetivo do presente estudo foi analisar microbiológica e sensorialmente 10 lotes de queijo tipo Emmental, fornecidos por um laticínio localizado em Minas Gerais, com Serviço de Inspeção Federal (SIF), em 6 diferentes períodos pós-fabricação e 3 embalagens (vácuo, resina e atmosfera modificada), totalizando 180 amostras, a fim de verificar a qualidade do produto e consequente possibilidade do aumento de vida de prateleira, além de indicar qual embalagem possui melhor custo-benefício. As metodologias para análise microbiológica foram realizadas de acordo com a Instrução Normativa 62 de 26/08/2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e os resultados foram avaliados conforme o preconizado pela Resolução RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para Coliformes, *Staphylococcus coagulase positiva*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Além disso, foram realizadas análises para *Clostridium* sulfito redutores, devido serem bactérias anaeróbicas e as embalagens a vácuo e atmosfera modificada possuírem baixo teor de oxigênio. A análise sensorial foi realizada por 7 funcionários do laticínio, que avaliaram sabor, odor, consistência e maciez após os 90 dias de produção. Para coliformes totais, 6 (3,33%)

amostras apresentaram níveis elevados, entre elas, 1 (0,56%) amostra também apresentou níveis elevados para coliformes termotolerantes. O *Staphylococcus* coagulase positiva foi o agente mais encontrado em desacordo com a legislação, com 17 amostras acima do permitido. Para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* sulfito redutores todas as amostras foram negativas em 25g de queijo. Do ponto de vista sensorial, apenas a embalagem resinada se mostrou alterada em relação às demais, nos lotes analisados. De acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa entre os patógenos e as embalagens, porém visualmente a embalagem a vácuo foi a que melhor conservou as características externas do produto, pois mesmo após 180 dias de fabricação, o queijo se manteve inalterado, diferente da embalagem resinada que provocou ressecamento e da atmosfera modificada que elevou sua umidade superficialmente. Mesmo diante de produtos fiscalizados, ainda é possível notar a presença de micro-organismos patogênicos, fato preocupante, pois nem sempre o cozimento é capaz de eliminá-los ou eliminar suas toxinas, além do que, alguns alimentos como o queijo, podem ser consumidos sem cozimento facilitando ainda mais sua disseminação na população, sendo um contínuo problema na saúde pública.

**Palavras-chave:** Emmental, Coliformes, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*.

SOUSA, R.S. MICROBIOLOGICAL AND SENSORY PROFILE OF EMMENTAL CHEESE PACKED IN THREE CONDITIONS. São Paulo. 2016. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

## ABSTRACT

Cheese is a food often consumed by the population, both in Brazil and worldwide, however its composition rich in nutrients facilitates contamination by microorganisms resulting in food outbreaks. Microbiological analysis aims to reduce this contamination and the potential risk to the population, therefore security measures and supervision are necessary, ranging from feedstock to processing step and proper preservation of the product. Cheese packages are another important factor, since they must be appropriate, avoiding microbiological and sensory changes that can harm the consumer's health and must not be so expensive to the manufacturer. Evaluating these factors the aim of this study was to analyze microbiological and sensorial 10 batches of Emmental cheese with Federal Inspection, provided by a dairy cheese located in Minas Gerais, in 6 different post-production periods and in 3 different package conditions (vacuum, resin and modified atmosphere), totalizing 180 samples in order to verify the quality of the product and the consequent increased expiration date, and indicate which package has a best cost benefit. The methodologies for microbiological analysis were performed according to Normative Instruction 62 of 26/08/2003 (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply) and the results were evaluated as recommended by RDC Resolution No. 12 of January 2, 2001 (National Agency of Health Surveillance) for coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. Moreover, samples were processed for *Clostridium* sulfite reducing analyzes, because they are anaerobic bacteria, and vacuum packaging and modified atmosphere have a low oxygen level. Sensory analysis was performed by 7 dairy employees, who evaluated taste, odor, consistency and softness after 90 days of production. For total coliforms results, 6 (3.33%) samples showed high levels, and out of these, one (0.56%) sample also showed high levels for fecal coliforms. In this study, *Staphylococcus* coagulase positive was the most frequent agent found in

disagreement with the law, with 17 (9,44%) samples above the allowed quantity. All samples (25 g) were negative for *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Clostridium* sulfite reducer. Sensory evaluation revealed that only the resin package showed some alteration in the analyzed lots. According to the statistical analysis, there was no difference between each pathogen and packaging system, but macroscopically the vacuum packaging was the system that best preserved the external characteristics of the product, because even after 180 days of production, the cheese appearance remained unchanged, differently, the resin package showed a dry aspect and the modified atmosphere increased the surface moisture. Even in inspected products, it is still possible to notice the presence of pathogenic microorganisms, and this is a worrying fact since cooking is not always able to eliminate them or eliminate their toxins, and besides some food such as cheese can be consumed without cooking thus facilitating their spread among the population, being a continuous problem for public health.

**Keywords:** Emmental, Coliforms, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Clostridium*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Consumo por tipo de queijo em pesquisa realizada pela Mintel em 2013 .....	5
<b>Figura 2</b> - Aplicação de resina em peça de queijo.....	7
<b>Figura 3</b> - Principais agentes etiológicos associados aos surtos de DTA ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2014 .....	12
<b>Figura 4</b> - Alimentos comumente envolvidos nos surtos alimentares ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2014 .....	13
<b>Figura 5</b> - Da esquerda para direita, amostras de queijos embaladas a vácuo <b>(a)</b> , com resina <b>(b)</b> e atmosfera modificada <b>(c)</b> .....	23
<b>Figura 6</b> - Fluxograma da metodologia de prova presuntiva para determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes.....	23
<b>Figura 7</b> - Fluxograma da metodologia de prova confirmatória para determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes.....	24
<b>Figura 8</b> - Fluxograma da metodologia para contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva .....	25
<b>Figura 9</b> - Fluxograma da metodologia para isolamento de <i>Salmonella</i> spp.....	26
<b>Figura 10</b> - Fluxograma da PCR para identificação de <i>Salmonella</i> spp. ....	27
<b>Figura 11</b> - Fluxograma da PCR para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
<b>Figura 12</b> - Fluxograma da metodologia para contagem de <i>Clostridium</i> sulfito redutores ....	30
<b>Figura 13</b> - Colônias transparentes suspeitas de <i>Salmonella</i> spp. em ágar MacConkey proveniente de caldo Rappaport Vassiliadis .....	41
<b>Figura 14</b> - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de <i>Salmonella</i> spp. ....	41
<b>Figura 15</b> - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	43

**Figura 16** - Amostra negativa para *Clostridium* sulfito redutores em ágar SPS .....44

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Número de indivíduos expostos, surtos e doentes em casos de DTA ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2013.....	12
<b>Quadro 2</b> - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> (Invitrogen®) que amplificam fragmento do gene <i>Inv A</i> de <i>Salmonella</i> spp. ....	27
<b>Quadro 3</b> - Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> (Invitrogen®) que amplificam fragmento do gene <i>Listeriolisina</i> de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
<b>Quadro 4</b> - Interpretação utilizada para plano de amostragem.....	31
<b>Quadro 5</b> - Resultado dos coliformes totais e termotolerantes acima do valor máximo permitido de acordo com a embalagem, lote e tempo de prateleira .....	35
<b>Quadro 6</b> - Resultado da população de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva acima dos limites aceitáveis nos diferentes tipos de embalagens, lote e tempo de prateleira .....	38
<b>Quadro 7</b> - Amostras de queijo Emmental que apresentaram bolor por tipo de embalagem, lote e dias de prateleira .....	46

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1** - Porcentagem de amostras aceitáveis e não aceitáveis para coliformes totais (NMP/g) nos queijos analisados ..... 33
- Tabela 2** - Porcentagem de amostras aceitáveis e não aceitáveis para coliformes termotolerantes (NMP/g) nos queijos analisados ..... 34
- Tabela 3** - Porcentagem de amostras para *Staphylococcus* coagulase positiva aceitáveis e não aceitáveis nos queijos analisados ..... 37
- Tabela 4** - Porcentagem de amostras com presença ou ausência visual de bolores nos queijos analisados ..... 45

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

ATCC – American Type Culture Collection  
ATM – Atmosfera Modificada  
Aw – Atividade de Água  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
DNA – Ácido Desoxirribonucléico  
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
IN – Instrução Normativa  
KCl – Cloreto de potássio  
MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio  
N<sub>2</sub> – Nitrogênio  
NaOH – Hidróxido de sódio  
O<sub>2</sub> - Oxigênio  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
RPM – Rotação Por Minuto  
TBE – Tris-Borato-EDTA  
TE – Tampão de Eluição  
TRIS-HCl – Hidroximetil Amino Metano Cloridrato  
UFC – Unidade Formadora de Colônia

**LISTA DE SÍMBOLOS**

g – Grama

% – Porcentagem

kg – Quilograma

mm – Milímetro ( $10^{-3}$  metro)

°C – Graus centígrados

µm – Micrômetro ( $10^{-6}$  metro)

pH – Potencial Hidrogeniônico

ng – Nanograma ( $10^{-9}$  grama)

mL – Mililitro ( $10^{-3}$  litro)

µL – Microlitro ( $10^{-6}$  litro)

U – Unidade

µM – Micromolar ( $10^{-6}$  molar)

mM – Milimolar ( $10^{-3}$  molar)

M – Molar

pmol – Picomol ( $10^{-12}$  mol)

V/cm<sup>3</sup> – Volts por centímetro cúbico

nm – Nanômetro ( $10^{-9}$  metro)

n<sup>o</sup> – Número

bp – Base Pair

## APÊNDICES

- Apêndice A** - Resultado de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP/g, nos 3 tipos de embalagem (vácuo, resina e atmosfera modificada), nos diferentes lotes e dias avaliados ..... 65
- Apêndice B** - Resultado das análises microbiológicas para *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* sulfito redutores e aspecto visual de bolores ..... 71

**ANEXOS**

<b>Anexo A</b> - Interpretação de Números Mais Prováveis (NMP/g ou mL) para coliformes totais e termotolerantes.....	77
--	----

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	v
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	x
<b>APÊNDICES</b> .....	xi
<b>ANEXOS</b> .....	xii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 GERAL:.....	3
2.2 ESPECÍFICOS: .....	3
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
3.1 MERCADO DE LEITE E QUEIJOS NO BRASIL.....	4
3.2 QUEIJO EMMENTAL .....	5
3.2.1 Embalagem a vácuo.....	6
3.2.2 Embalagem resinada .....	7
3.2.3 Embalagem com atmosfera modificada .....	8
3.2.4 Análise microbiológica.....	8
3.2.5 Análise sensorial .....	9
3.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS .....	10
3.3.1 Coliformes totais e termotolerantes .....	13
3.3.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva .....	14
3.3.3 <i>Salmonella</i> spp.....	16
3.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.3.5 <i>Clostridium</i> sulfito redutores.....	20
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
4.1 LATICÍNIO .....	22
4.1.1 Produção dos queijos.....	22
4.2 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES.....	23
4.2.1 Prova presuntiva.....	23
4.2.2 Prova confirmatória .....	24

4.3 METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA.....	25
4.4 METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO DE <i>Salmonella</i> spp.....	26
4.4.1 PCR para identificação de <i>Salmonella</i> spp. ....	27
4.5 METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> .....	28
4.5.1 PCR para identificação de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
4.6 METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE <i>Clostridium</i> SULFITO REDUTORES.....	30
4.7 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS .....	30
4.8 ANÁLISE SENSORIAL.....	32
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES .....	33
5.2 CONTAGEM DE <i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA .....	37
5.3 DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. POR ISOLAMENTO E PCR .....	40
5.4 DETECÇÃO DE <i>Listeria monocytogenes</i> POR PCR .....	42
5.5 CONTAGEM DE <i>Clostridium</i> SULFITO REDUTORES .....	44
5.6 ANÁLISE SENSORIAL.....	47
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	47
5.7.1 Coliformes totais e termotolerantes .....	47
5.7.2 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva .....	48
5.7.3 <i>Salmonella</i> spp.....	48
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, estima-se que dois milhões de mortes ocorram anualmente por conta da ingestão de alimento ou água contaminada, afetando principalmente crianças, com maior frequência em países em desenvolvimento. Ao todo há mais de 200 doenças causadas por alimentos contaminados, veiculadas por bactérias, fungos, parasitas, vírus ou substâncias químicas que podem causar desde diarreia em casos mais brandos, até câncer em casos mais graves (OMS, 2014).

A maioria dos surtos ocorre em alimentos sem alterações organolépticas visíveis, isso porque a dose infectante do patógeno normalmente é menor do que a dose necessária para causar essas alterações, dificultando sua rastreabilidade, pois em casos de investigação epidemiológica os pacientes não conseguem associar o alimento visivelmente “saudável” como possível fonte de contaminação (OLIVEIRA et al., 2010). Além do mais, os casos de gastroenterite, comuns nas doenças transmitidas por alimentos (DTA), normalmente não necessitam de hospitalizações, sendo assim, a maioria das pessoas não procuram auxílio médico e os casos são subnotificados, tanto no Brasil quanto em outros países (SHINOHARA et al., 2008).

O queijo é um alimento bastante utilizado na dieta da população, abrangendo em geral, todas as classes sociais, entretanto devido a sua rica composição de nutrientes pode apresentar contaminação por micro-organismos, principalmente coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, cuja presença ou contagem elevada pode comprometer a qualidade do produto (SALVADOR et al., 2001) e diminuir sua vida de prateleira (LOSITO et al., 2013).

Coliformes totais e termotolerantes indicam a qualidade higiênico-sanitária do alimento (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997). Em alimentos de origem animal, estes micro-organismos estão associados à manipulação, armazenamento ou processamento inadequado ou ainda recontaminação pós-processamento, devido a problemas provenientes da matéria-prima ou equipamentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Entre os *Staphylococcus* coagulase positiva, o *S. aureus* é um dos principais agentes de DTA, responsável por intoxicação alimentar no homem, causado pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas pré-sintetizadas pela bactéria (NORMANO; FIRINU; VIRGILIO, 2005) e comumente encontradas em queijos (KONEMAN et al., 2008). Devido as suas toxinas serem termorresistentes os cuidados com a refrigeração devem ser tomados após o aquecimento, caso contrário, o micro-organismo poderá multiplicar-se e produzir as toxinas (MOTTA; BELMONT, 2000).

A *Salmonella* é um dos principais agentes de infecções alimentares em diversos países (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000), dentre o grupo de laticínios o leite cru ou inadequadamente pasteurizado e os queijos são os alimentos mais envolvidos (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Locais com grandes populações e condições higiênico-sanitárias mais precárias são mais propícios à contaminação por esse patógeno (SHINOHARA et al., 2008).

Os queijos também são frequentemente contaminados por *Listeria*, especialmente os que possuem de média a alta umidade, fator preocupante à população, pois são armazenados sob refrigeração por longos períodos, seu consumo é sem cozimento e mesmo a pasteurização não é suficiente para evitá-la (BARANCELLI et al., 2011).

Os *Clostridium* sulfito redutores também são indicadores de qualidade higiênica dos alimentos e do seu tempo útil de conservação (DRUBI, 2005). Entre os *Clostridium* sulfito redutores, o *C. perfringens* é apontado como um dos micro-organismos mais frequentemente envolvidos em DTA devido a sua rápida multiplicação e formação de esporos resistentes em condições adversas, portanto os cuidados com o cozimento devem ser adequados, pois do contrário, além de não reduzirem a quantidade de esporos dos *C. perfringens* ainda podem induzir sua germinação e favorecer seu desenvolvimento aumentando rapidamente o número de micro-organismos nos alimentos (OTUKI, 2010).

Para diminuir os riscos de contaminação são utilizadas algumas técnicas como as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que é um conjunto de medidas adotadas pelas indústrias de alimentos para garantir a qualidade sanitária de seus produtos por meio de regras rigorosas de higiene pessoal e limpeza do local de trabalho (VIEITES, 2013).

Os Programas de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) também devem ser seguidos pelas indústrias a fim de reduzir a contaminação de seus produtos (BARANCELLI et al., 2011). No entanto, apesar da utilização de diferentes técnicas para garantir a qualidade e a inocuidade dos alimentos, as DTA causadas por patógenos provenientes dos produtos de origem animal ainda são um problema de saúde pública (GERMANO, 1993; OMS, 2009), pois além dos danos econômicos, um produto alterado ou deteriorado inviabiliza sua venda e, conseqüentemente, prejudica o produtor (PEIXOTO; WECKWERH; SIMIONATO, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL:

Comparar características microbiológicas e sensoriais das frações do queijo tipo Emmental, embalados em três condições: a vácuo, resina e atmosfera modificada em diferentes períodos de maturação.

### 2.2 ESPECÍFICOS:

1) Comparar as análises microbiológicas no queijo tipo Emmental embalado a vácuo, com resina e em atmosfera modificada, nos dias 0, 45, 90, 120, 150 e 180 pós-produção, de acordo com o prazo de validade preconizado pelo Laticínio:

- ❖ Determinar os números mais prováveis de coliformes totais e termotolerantes por grama (NMP/g);
- ❖ Realizar a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Clostridium* sulfito redutores;
- ❖ Detectar colônias presuntivas de *Salmonella* spp. por meio de isolamento e identificação microbiológica e empregar a reação em cadeia pela polimerase (PCR) convencional utilizando as colônias isoladas, para confirmação do gênero *Salmonella* spp., e posterior diferenciação entre *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium;
- ❖ Detectar *Listeria monocytogenes* por meio da PCR convencional.

2) Realizar análise sensorial das amostras de queijo tipo Emmental, embalados a vácuo, com resina e em atmosfera modificada, nos dias 90, 120, 150 e 180 pós-produção.

3) Avaliar se há diferença estatística entre os resultados das análises microbiológicas e os diferentes tipos de embalagem, nos diferentes dias de produção.

4) Verificar se a embalagem mais adequada impacta na redução dos custos de produção, devido ao aumento da vida de prateleira.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MERCADO DE LEITE E QUEIJOS NO BRASIL

Embora ocupando a sexta posição no ranking dos países produtores, a produção de leite no Brasil é altamente heterogênea, com propriedades de baixíssima escala de produção e outras altamente especializadas. Entre 1990 e 2006, a produção brasileira cresceu 75%, graças a um aumento do rendimento do rebanho em torno de 60%, que foi complementado com um crescimento de 40% no rebanho e de quase 10% no número de vacas ordenhadas. Em 2006, as principais regiões produtoras de leite no Brasil foram o sudeste, com uma participação de 38,4%, seguido do Sul (27,7%), Centro-Oeste (14,6%), Nordeste (12,6%) e Norte (6,7%). Entre 1990 e 2006, as regiões que mais incrementaram sua produção leiteira foram o Norte (74,6%), Centro-Oeste (25%) e Sul (23%), havendo reduções nas regiões Sudeste (19,8%) e Nordeste (10,8%) (WILKINSON et al., 2009). Com esse aumento, o volume de leite gerado já cobre 99% da necessidade do mercado interno e a perspectiva é que, em um curto prazo, seja suficiente para dispor de um excedente que possa ser exportado (CEPEA-ESALQ, 2011; MARTINS, 2007).

Em 2014, a produção nacional de queijos foi de aproximadamente um milhão e setenta e cinco mil toneladas (ABIQ, 2014), com importação de 20.600 toneladas (ABIQ, 2015a) e exportação de 2.600 toneladas (ABIQ, 2015b).

Atualmente os Estados Unidos é o país com o maior mercado de queijos do mundo com rentabilidade de US\$22 bilhões anuais, seguido da França com US\$9,4 bilhões. O Brasil aparece na sexta posição, entretanto com possibilidade de chegar a US\$9,9 bilhões em 2020, ultrapassando a Itália e ficando em quinto lugar (ABIQ, 2015c). Em relação ao consumo, os níveis brasileiros ainda são inferiores aos níveis europeus, a exemplo da Grécia e França, onde a demanda é superior a 25 kg/habitante/ano (GUIMARÃES et al., 2008). Contudo, entre 2006 e 2013 o Brasil teve um aumento de 8,3% no consumo de queijos *per capita*, subindo de 3 kg/ano para 5,3 kg/ano respectivamente, ultrapassando o consumo de 4,8 kg/habitante/ano do México. Em 2017 a expectativa é que o consumo de queijos no Brasil chegue a 8 kg por habitante/ano (CARVALHO; VENTURINI; GALAN, 2015).

Em 2013, uma pesquisa realizada pela Mintel, empresa especializada em pesquisa global de mercado e *insights* de mercado, envolvendo 1500 pessoas com idade mínima de 16 anos, de ambos os sexos e classes sociais variadas nas dez principais capitais do Brasil, incluindo São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Brasília, Belém, Fortaleza, Salvador, Recife, Curitiba e Porto Alegre, avaliou quais são os queijos mais consumidos pelos

brasileiros. De acordo com a pesquisa, os queijos mais consumidos no Brasil são: Muçarela (88%), Requeijão (76%), Queijo prato (75%), Queijo branco (72%) e Queijo parmesão (62%). Os queijos especiais como o Emmental, ainda representam uma baixa porcentagem no consumo (28%) (Figura 1) (ABIQ, 2013), diferenças que têm sido justificadas primariamente por questões culturais e pela renda da população (ABIQ 2013; GUIMARÃES et al., 2008).

**Figura 1** – Consumo brasileiro por tipo de queijo em pesquisa realizada pela Mintel em 2013



Fonte: ABIQ, 2013.

### 3.2 QUEIJO EMMENTAL

O queijo tipo Emmental é um queijo suíço originário do cantão de Berna. Apresenta cor amarelada, casca escovada e dura, consistência média e características olhaduras, originadas pelo dióxido de carbono produzido pela bactéria *Propionibacter shermani* (HUNT, 2012), que devem possuir entre 10 e 25 mm de diâmetro segundo a IN-68 de 12/12/2006 (BRASIL, 2006). Por possuir massa semi-dura está classificado como queijo de média umidade, entre 36,0% e 45,9% (BRASIL, 1996). Sua produção é feita com leite de vaca, e sua pasta é cozida e prensada, seu sabor é suave e levemente adocicado. No Brasil, é conhecido simplesmente como "queijo suíço" (HUNT, 2012).

No âmbito do consumo doméstico, a especialização da produção, as novas formas de embalagem favorecendo o transporte a grandes distâncias, maior prazo de validade e diminuição das perdas dos queijos, unidos à elevação da renda da população brasileira,

favoreceu um incremento significativo no consumo de lácteos e derivados (WILKINSON et al., 2009).

A embalagem que envolve os alimentos desempenha muitas funções ao longo de todo o ciclo de vida do produto, desde a sua produção até o momento em que este é consumido. A embalagem tem papel fundamental no processo de conservação de alimentos, evitando ou retardando a degradação do produto pela ação do oxigênio, da luz e de micro-organismos, garantindo que a composição, o valor nutritivo e a qualidade microbiológica se mantenham inalteráveis. No caso dos queijos, a embalagem além de não transmitir ao produto qualquer aroma ou sabor, permite a manutenção de qualidades sensoriais normais do produto (OKURA et al., 2006).

No caso dos queijos, é comum uma divisão de acordo com o processo de produção, e cada categoria pode ter diferentes tipos de embalagens, por exemplo, o queijo fresco que se trata de um queijo bastante frágil, deve ser preservado em uma embalagem que evite a perda de água e o proteja da ação da luz e oxigênio do ar; queijos como o Emmental podem ser produzidos e comercializados em peças maiores e a embalagem se caracteriza apenas por uma resina que reveste toda a peça evitando a ação de micro-organismos na sua superfície, ou em alguns casos, a peça é porcionada no próprio laticínio e comercializada em embalagens a vácuo ou que utilizam atmosfera modificada (OKURA et al., 2006; PAULA et al., 2012).

No laticínio, fornecedor das amostras para a realização desse projeto, o queijo tipo Emmental é vendido em tamanhos diferentes de acordo com a embalagem utilizada: 300g na embalagem a vácuo, peça de 12kg na embalagem resinada e peça de 3kg na embalagem de atmosfera modificada, sendo a embalagem resinada de menor custo, porém sem possibilidade de venda em peças menores, embalagem a vácuo com segundo menor custo e a embalagem de atmosfera modificada com maior custo de produção.

### 3.2.1 Embalagem a vácuo

A embalagem a vácuo consiste em acondicionar o alimento de forma que ele não fique exposto ao ar, controlando o desenvolvimento de micro-organismos, ação enzimática e a oxidação, principais mecanismos de deterioração de alimentos. As estruturas normalmente utilizadas são boas barreiras a gases, a fim de maximizar ou evitar por completo o contato do produto com o oxigênio do ar. Normalmente, esse processo consiste em retirar todo o oxigênio existente com a aplicação do vácuo (EILERT, 2005).

Para que a função de proteger o alimento seja atendida, há a necessidade do uso de embalagens que funcionem como completa barreira à passagem dos gases, mantendo o

vácuo no seu interior pelo maior tempo possível. No caso de laticínios, o mais comum é trabalhar com embalagens a vácuo, dessa forma a embalagem tem contato íntimo com o produto, o que minimiza problemas de deterioração e favorece a barreira a gases, e hoje é considerada uma das mais eficazes dentre as diversas formas de embalagem de queijos, por garantir padrões excepcionais de conservação, além de prevenir a deterioração. Este tipo de embalagem também tem papel na diminuição do ressecamento dos laticínios, e dessa forma, aumenta a vida de prateleira dos produtos, sem alterar seu sabor (JAY, 2005; SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990).

### 3.2.2 Embalagem resinada

A resina normalmente utilizada em queijos é uma dispersão de copolímero de vinil acetato e maleato de dibutil, livre de plastificantes comumente utilizada para fabricação de queijos maturados sem embalagem como o parmesão e o Emmental (MAGALHÃES et al., 2009) autorizado pela ANVISA (BRASIL, 2001b).

A resina é um gel, solúvel em água e pode ser aplicada sobre o queijo quando a casca não apresenta mais umidade. Quanto menor a forma do queijo, mais rápida a formação da casca. A aplicação deve ser realizada com uma fina camada de resina na parte superior e na metade superior da lateral do queijo (Figura 2). A secagem normalmente ocorre após 30 minutos, dependendo da umidade do ambiente, e então pode-se repetir a aplicação na outra parte do queijo. A consistência ideal da película é quando for de fácil aplicação com o pincel sem que deixe grumos ou esteja muito líquida (ETIEL, 2014).

**Figura 2** - Aplicação de resina em peça de queijo



Fonte: ETIEL, 2014.

### 3.2.3 Embalagem com atmosfera modificada

A embalagem em atmosfera modificada é uma evolução da embalagem a vácuo. Foi inicialmente utilizada para carnes, e hoje é amplamente difundida entre os diferentes gêneros alimentícios; é a embalagem com introdução de uma mistura de gases, objetivando-se em maior conservação do produto, com maior vida útil e sem conservantes químicos (HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986; PARRY, 1995). O processo de conservação de produtos frescos a granel em atmosfera modificada é uma técnica de preservação antiga. Desde o final do século XIX, já se utilizava CO<sub>2</sub> para conservar carnes frescas na Austrália e em 50% dos produtos se empregavam esta tecnologia (HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986).

O aumento do prazo comercial deste método de conservação de alimentos deve-se ao efeito inibitório do CO<sub>2</sub> sobre os diferentes tipos de micro-organismos e a redução ou remoção do oxigênio do interior da embalagem. A estratégia da embalagem sob atmosfera modificada é retardar o crescimento dos micro-organismos patogênicos e deteriorantes presentes, a partir da diminuição da concentração de oxigênio e da aplicação de CO<sub>2</sub>, que possui efeito inibidor do crescimento bacteriano. A modificação da atmosfera no interior da embalagem é determinada pela interação de três fatores: respiração do produto, difusão do gás através do produto e permeabilidade do filme aos gases (MANTILLA et al., 2010).

Alguns fatores precisam ser mantidos para que a aplicação da tecnologia da atmosfera modificada atinja sua função, referente ao maior tempo de prateleira dos alimentos, incluindo: qualidade inicial do produto, mistura gasosa (CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>) e temperatura (HINTLIAN; HOTCHKISS, 1986; PARRY, 1995; SMITH; RAMASWAMY; SIMPSON, 1990).

A tecnologia de atmosfera modificada já vem sendo empregada para alguns queijos, por exemplo, o queijo parmesão ralado e muçarela em forma de nozinho, bolinha, palito, trancinha, muçarela fatiada e muçarela de búfala. Com o emprego dessa tecnologia conseguiu-se uma melhora na cor, manutenção da forma original (no vácuo o produto é deformado) e inibição do crescimento de micro-organismos, além do aumento no tempo de prateleira do produto (SARANTOPOULOS; ALVES; MORI, 1995; PAULA et al., 2012).

### 3.2.4 Análise microbiológica

A análise microbiológica de um alimento visa investigar quantitativamente e qualitativamente a presença de um determinado micro-organismo em um produto, assim como identificar e caracterizar as diferentes espécies a fim de rastrear as condições de higiene

em que o alimento foi processado e os prováveis riscos à saúde do consumidor. Cerca de 70% das novas doenças que têm afetado os seres humanos nas últimas décadas são de origem animal, parcialmente relacionadas com a busca humana por alimentos desse tipo (FAO, 2013). Em consequência, anualmente milhões de pessoas adoecem em razão das zoonoses de origem alimentar (GERMANO, 1993; OMS, 2009).

As contaminações microbianas são indesejáveis e nocivas, portanto é necessário conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, sobretudo relacionadas aos micro-organismos, principalmente os patogênicos, que encontram no alimento um meio propício para o seu desenvolvimento e suas toxinas (SALOTTI et al., 2006).

O leite e seus derivados podem ser facilmente contaminados por micro-organismos, especialmente os queijos, devido ser um alimento de manipulação excessiva. Além do mais, processamentos e tecnologias de produção inadequadas, a falta da utilização das boas práticas de fabricação ou tempo insuficiente de maturação podem facilitar essa contaminação (PINTO et al., 2009).

### 3.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial é uma disciplina científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais utilizando a visão, audição, olfato, tato e paladar (ABNT, 2014).

É um parâmetro utilizado visando a aceitação da condição do queijo pelo consumidor. Essa metodologia envolve o indivíduo, o produto e sua avaliação. A relação estabelecida entre esses três elementos e suas possíveis combinações origina uma metodologia bastante diversificada. É uma análise de grande relevância para avaliar a aceitabilidade mercadológica e a qualidade do produto. Tais avaliações são realizadas por meio dos órgãos dos sentidos, e como são executadas por pessoas, é importante um criterioso preparo das amostras testadas e adequada aplicação do teste para se evitar influência de fatores psicológicos (TEIXEIRA, 2009; PINHEIRO et al., 2007).

Para o queijo, é necessário avaliar alguns fatores como o paladar, suavidade, aspereza, dureza, coesividade e elasticidade, propriedades avaliadas pela boca, porém muitas delas podem também ser percebidas por meio da manipulação. Os testes sensoriais de textura são divididos entre duas categorias: afetivo e analítico. Os testes afetivos envolvem consumidores e o modo como avaliam a textura do produto, tal como sua aceitabilidade no mercado, já os testes analíticos são realizados com profissionais treinados e suas respostas são tratadas como dados instrumentais (FOEGEDING et al., 2003).

É necessário ressaltar que mesmo alimentos que cumpram com os requisitos nutricionais, não terão uma boa aceitação no mercado se os consumidores não gostarem de seu sabor ou qualquer outra característica sensorial (DELIZA; ROSENTHAL; SILVA, 2003).

### 3.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A contaminação alimentar surgiu após o homem começar a preparar seu próprio alimento e armazená-lo de maneira incorreta, entretanto somente em 1837 Louis Pasteur comprovou a relação entre os micro-organismos e os alimentos, demonstrando que essa era a causa do azedamento do leite, utilizando em 1860 o calor (pasteurização) para destruição de micro-organismos indesejáveis nos alimentos, processo utilizado até hoje (FRANCO; LANDGRAF, 2008). As DTA podem ser veiculadas por perigos físicos, químicos ou biológicos tendo como fonte de contaminação desde a matéria-prima até o processamento e conservação dos alimentos. As DTA também podem originar surtos, que de acordo com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) são assim denominados quando duas ou mais pessoas apresentam sintomas semelhantes após ingerirem o mesmo alimento (BRASIL, 2005).

A identificação de um surto alimentar ocorre por meio de inquérito epidemiológico, no qual são verificados os indivíduos que consumiram os alimentos suspeitos, sintomas característicos da doença e exames laboratoriais nas amostras clínicas e alimentares, levando em consideração o período de incubação, gravidade e duração da doença, diferentes em alguns indivíduos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As DTA vêm aumentando progressivamente em todo mundo, e os fatores que contribuem com tal situação incluem o aumento da população, urbanização desordenada, grupos que estão mais expostos ou vulneráveis juntamente com a necessidade de produção de alimentos em grande escala, além do controle alimentar deficiente pelos órgãos públicos e privados. Há também a problemática do aumento pela procura de alimentos rápidos, como *fast-foods* e o consumo em vias públicas. Apesar da relação entre a ingestão de alimentos contaminados e as doenças causadas, em algumas regiões do país a verdadeira magnitude deste problema ainda é desconhecida, sendo necessário a estruturação de um sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) (BRASIL, 2010).

No Brasil, o perfil epidemiológico das DTA ainda é pouco conhecido, pois não são todos os estados e/ou municípios que possuem estatísticas sobre os agentes etiológicos mais comuns, população de maior risco, alimentos frequentemente contaminados e fatores

contribuintes, porém a distribuição é universal e a incidência varia de acordo com a educação, condições socioeconômicas, saneamento, fatores ambientais e culturais, entre outros (VE-DTA) (BRASIL, 2010).

Presume-se que as DTA sejam de alta morbidade, porém devido à ausência da VE-DTA em algumas localidades não é possível afirmar totalmente. De acordo com informações disponíveis, tanto a mortalidade quanto a letalidade são baixas e dependem das condições do paciente, agente etiológico envolvido e o acesso aos serviços de saúde, entretanto crianças menores de 5 anos, idosos e pacientes imunodeprimidos possuem mortalidade maior em decorrência das diarreias causadas nesse grupo (VE-DTA) (BRASIL, 2010).

As DTA são transmitidas pela ingestão de água e/ou alimentos contaminados, cuja contaminação alimentar pode ocorrer desde a produção primária até o consumo, sendo os alimentos de origem animal e preparo para consumo coletivo como os responsáveis pela maioria dos surtos. O período de incubação depende do agente etiológico envolvido, podendo variar entre horas a meses. Entre os agentes bacterianos mais frequentes estão a *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp. *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (VE-DTA) (BRASIL, 2010).

Do ponto de vista técnico, todas as etapas de produção, desde a coleta do leite na propriedade rural até a produção, maturação e embalagem do queijo, devem ser transcorridas sob condições que previnam a contaminação e que garantam a qualidade do produto final (EILERT, 2005). Dessa forma, as BPF e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade (PICOLI et al., 2006).

Para produção de queijos frescos é necessário que o leite utilizado seja pasteurizado, já para queijos maturados pode ser utilizado o leite cru desde que sejam respeitados os prazos de maturação juntamente com a utilização das boas práticas de fabricação, incluindo o preparo do produto com leite de alta qualidade e rigorosa higiene no local de produção (PERRY, 2004).

A comercialização deve seguir os padrões de higiene, para que a manipulação e o armazenamento sejam realizados da maneira adequada, além de campanhas para manipuladores e consumidores se atentarem à importância do manejo adequado dos alimentos (BARANCELLI et al., 2011).

Dados emitidos pela VE-DTA (BRASIL, 2014) demonstram os números de surtos entre 2000 e 2013 (Quadro 1) e os principais agentes etiológicos entre 2000 e 2014 (Figura 3).

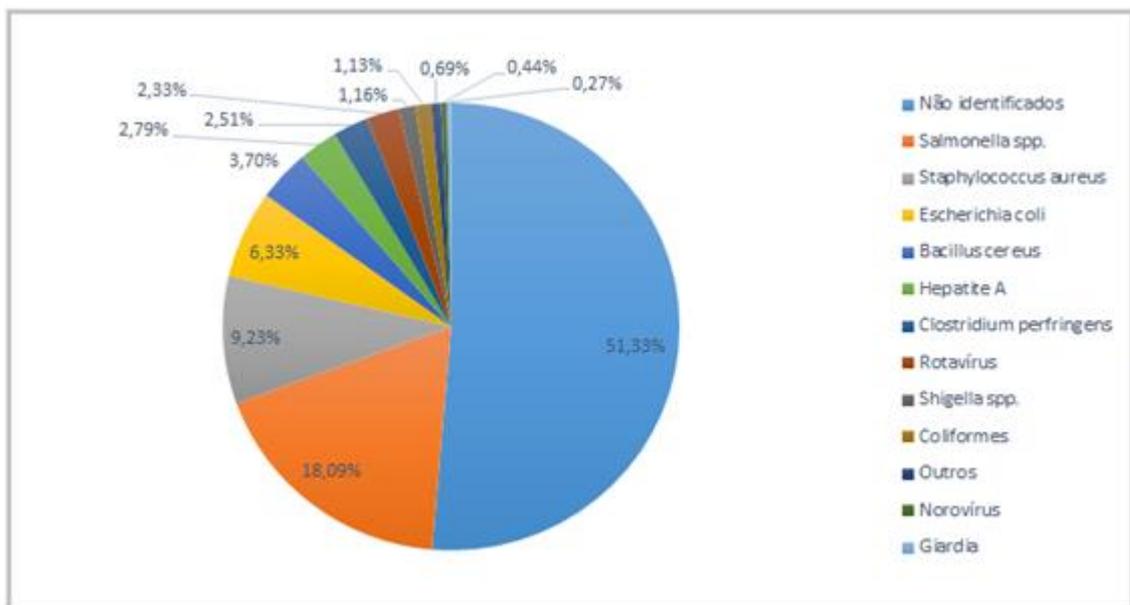
Dos alimentos identificados, leite e seus derivados seguem entre os principais causadores de surtos (Figura 4).

**Quadro 1** - Número de indivíduos expostos, surtos e doentes em casos de DTA ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2013

ANO	EXPOSTOS	SURTOS	DOENTES
2000	31.821	427	9.535
2001	211.228	872	15.631
2002	116.962	806	12.391
2003	668.772	619	17.910
2004	368.109	635	21.776
2005	242.191	913	17.214
2006	49.465	573	10.312
2007	25.195	683	11.708
2008	23.275	641	8.995
2009	24.014	594	9.431
2010	23.954	498	8.626
2011	52.662	795	17.884
2012	42.138	863	14.670
2013	42.072	800	16.720
<b>TOTAL</b>	<b>1.941.858</b>	<b>9.510</b>	<b>189.853</b>

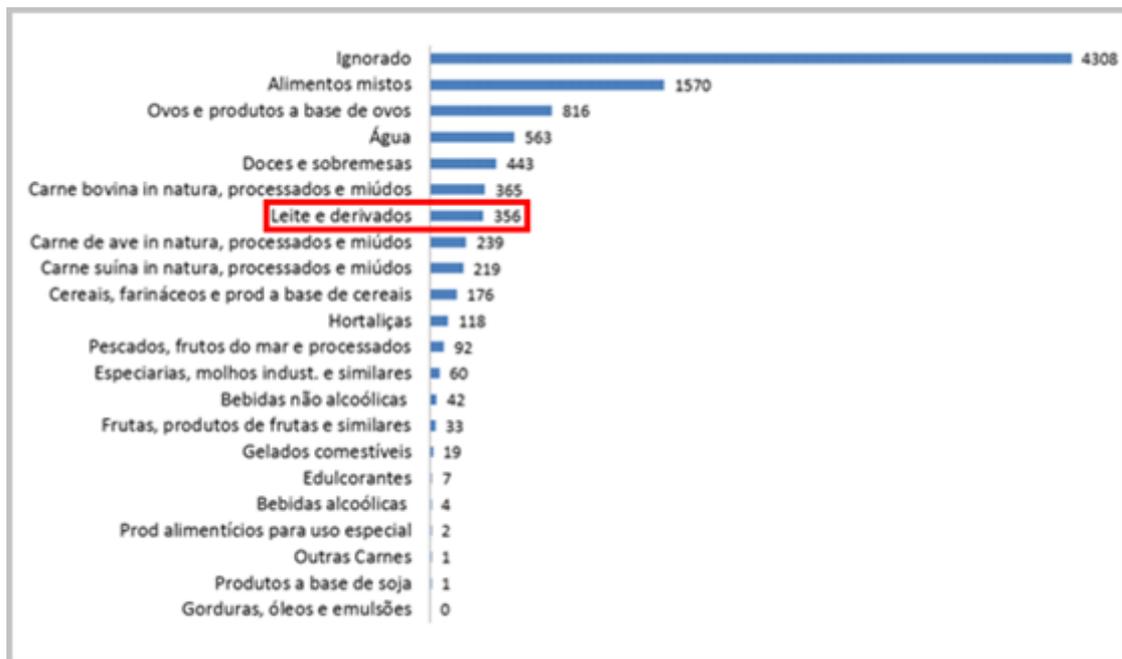
FONTE: Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) (BRASIL, 2014).

**Figura 3** - Principais agentes etiológicos associados aos surtos de DTA ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2014



FONTE: Dados emitidos pela Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) (BRASIL, 2014).

**Figura 4** - Alimentos comumente envolvidos nos surtos alimentares ocorridos no Brasil entre os anos de 2000 e 2014



FONTE: Dados emitidos pela Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA) (BRASIL, 2014).

### 3.3.1 Coliformes totais e termotolerantes

Coliformes totais é um grupo formado por bactérias da família Enterobacteriaceae, representado pelos gêneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. São bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, fermentadores de lactose e produtores de gás quando incubados entre 35°C e 37°C por 48 horas. Entre eles, apenas a *Escherichia coli* possui como hábitat natural o trato intestinal do homem e animais, as demais são encontradas nas fezes, vegetais e solo, permanecendo nesses locais por mais tempo do que as bactérias patogênicas de origem intestinal, portanto, a presença de coliformes totais nos alimentos não indica necessariamente a contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os coliformes termotolerantes diferenciam-se dos totais por fermentarem a lactose com produção de gás a uma temperatura entre 44°C e 45,5°C. Nessas condições 90% das culturas de *Escherichia coli* são positivas, porém apenas algumas cepas de *Enterobacter* e *Klebsiella* possuem essa característica. A pesquisa de coliformes fecais ou *E.coli* nos alimentos fornece mais segurança sobre as condições higiênicas do produto e melhor

indicação da presença de enteropatógenos. Em vegetais frescos apenas a *E.coli* é indicador de contaminação fecal, pois os demais micro-organismos estão presentes naturalmente nesse tipo de alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1885, pelo pediatra alemão Theodor Von Escherich, anteriormente chamada de *Bacterium coli commune* (FRIEDMANN, 2006), mede aproximadamente de 1,5 a 4  $\mu\text{m}$ , são anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa e reduzem nitrato a nitrito. Na grande maioria são móveis, mas em alguns casos podem ser imóveis. Representa aproximadamente 1% da microbiota bacteriana intestinal. Sua presença na água e em alimentos indica contaminação fecal e sua habilidade de causar doenças em humanos se dá devido a fatores de virulência, nos quais os genes responsáveis por sua codificação podem estar tanto no cromossomo como nos plasmídeos ou fagos (VON SYDOW, 2005).

Em alimentos frescos de origem animal os números elevados de bactérias da família Enterobacteriaceae podem indicar manipulação sem higiene ou armazenamento inadequado. No entanto, nos alimentos processados quando encontrados altos números de coliformes ou bactérias da família Enterobacteriaceae, é indicativo de processamento inadequado ou recontaminação pós-processamento, devido aos problemas provenientes da matéria-prima, equipamento sujo ou manipulação sem cuidados de higiene (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Tanto a contagem de coliformes termotolerantes como a pesquisa da presença ou ausência de *Salmonella* spp. tem sido utilizado para avaliar as condições higiênico-sanitárias dos alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

### 3.3.2 *Staphylococcus* coagulase positiva

Os estafilococos são cocos Gram-positivos imóveis, não formadores de esporos e catalase positiva. Esses micro-organismos ocorrem na forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas, porém aparecem predominantemente em grupos semelhantes a cachos de uva e são em sua maioria anaeróbios facultativos polares (KONEMAN et al., 2008).

São micro-organismos mesófilos, ou seja, seu crescimento varia entre 7°C e 47,8°C e podem produzir enterotoxinas termorresistentes a temperaturas entre 10°C e 46°C, sendo ótima entre 40°C e 45°C. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas em alimentos a multiplicação ocorre com pH entre 4,2 e 9,3. São os únicos que se multiplicam com valores de atividade de água inferiores ao normalmente considerados mínimos para outras bactérias halófilas. O valor mínimo de  $A_w$  é 0,86, apesar de já ter sido relatado em

alimentos com  $A_w$  de 0,83. A presença de outros micro-organismos é importante, pois os estafilococos são considerados maus competidores (SANTANA et al., 2010).

O gênero *Staphylococcus* spp. é dividido em dois grupos: os produtores e os não produtores de coagulase (SILVA, 2008), enzima capaz de promover a transformação do fibrinogênio em fibrina e conseqüente coagulação do plasma sanguíneo humano e outras espécies animais como o coelho (SANTANA et al., 2010). Os estafilococos coagulase negativos são tipos de comensais epidérmicos responsáveis por infecções hospitalares. Existem cerca de 32 espécies de estafilococos, das quais 5 são capazes de produzir a enzima coagulase (SILVA, 2008).

Os estafilococos foram descritos primeiramente em 1878 por Robert Koch a partir de um material purulento e em 1884 envolvendo surtos alimentares em Michigan (EUA), associado ao consumo de queijo tipo cheddar. Em alimentos, as espécies de maior importância são *Staphylococcus aureus* (representa 98% dos casos), *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus chromogenes* e *Staphylococcus intermedius* (SANTANA et al., 2010).

O queijo quando consumido em condições inadequadas, pode trazer graves conseqüências para a população, sendo um problema de saúde coletiva (SILVA, 2008).

O período de incubação ocorre de 1 a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado e os sintomas são típicos de gastroenterite como náuseas, vômitos, diarreia e cefaleia que costumam durar de 1 a 2 dias ou evoluir para quadros mais graves em casos de pacientes debilitados. Estima-se que sejam necessários de 15 a 357 ng de enterotoxina por kg de peso corporal para provocar intoxicação alimentar no homem. A mortalidade por intoxicação alimentar estafilocócica é incomum, entretanto pode ocorrer em crianças, idosos e indivíduos com sistema imunológico debilitado (CUNHA; CUNHA, 2007).

Nos Estados Unidos, entre 1993 e 1997 ocorreram 42 surtos de intoxicação estafilocócica com 1.413 pessoas envolvidas e 1 óbito. No Japão, no ano de 2000 um surto ocorreu após o consumo de leite reconstituído contaminado com toxinas envolvendo 13.420 pessoas. No Brasil, essas intoxicações também são muito comuns, entretanto a maioria não é investigada ou notificada. No Paraná, em 1998 houve 200 surtos, e em apenas 107 foram identificados os agentes, 30 deles por *S. aureus*; em Minas Gerais entre 1995 e 2001, 12.820 pessoas foram intoxicadas, dentre eles 17 óbitos e, em São Paulo, entre 2001 e 2002 foram notificados 25 surtos por intoxicação com *S. aureus* envolvendo 200 pessoas (SANTANA et al., 2010).

No Brasil, esses surtos de intoxicações estafilocócicas são comumente associados ao consumo de queijo fresco e minas padrão (CARMOS et al., 1995) e os manipuladores são a fonte mais importante de contaminação (HOLT et al., 1994). Neste contexto, o aquecimento do alimento após sua manipulação torna-se relevante na prevenção de toxinfecções (MOTTA;

BELMONT, 2000) sendo necessária a temperatura de 60°C por 43 segundos a 8 minutos para destruição do *S. aureus* (SANTANA et al., 2010).

A produção de enterotoxinas geralmente está relacionada a cepas que produzem as enzimas coagulase e termonuclease, entretanto algumas cepas sem essa característica também podem produzir as enterotoxinas. As toxinas estafilocócicas são denominadas pela sigla SE seguida de letras do alfabeto de acordo com a ordem cronológica em que foram descobertas (SILVA, 2013).

Entre as toxinas estafilocócicas as principais são: SEA; SEB; SEC; SED; SEE, porém também há as toxinas não clássicas (SEG até SEU) e outros genes de virulência como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1), toxinas esfoliativas e citolíticas (PUAH; CHUA; TAN, 2016).

As enterotoxinas não são facilmente destruídas pelo aquecimento dos alimentos e quanto mais toxinas presentes, maior o nível de aquecimento para inativá-las a números indetectáveis. Entretanto, quanto maior a temperatura, mais rapidamente elas serão inativadas, algumas podem ser destruídas quando aquecidas a 100°C (DOYLE, 1989).

### 3.3.3 *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, que apresentam metabolismo respiratório e fermentativo, são móveis pela presença de flagelos peritríquios (HOLT et al., 1994), exceto os sorovares *Salmonella enterica* sorovar Pullorum e *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum. Não são formadores de esporos, produzem gás a partir da glicose, com exceção da *Salmonella enterica* sorovar Typhi e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. Possuem temperatura ideal de crescimento entre 35°C e 37°C, pH ótimo na faixa de 7, porém podem crescer com pH entre 4 e 9 (FRANCO; LANDGRAF, 2008) e  $A_w$  mínima de 0,94. Não fermentam lactose e sacarose e a maioria produz sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) (OLIVEIRA et al., 2013).

A *Salmonella* é dividida em três espécies, apesar de algumas literaturas citarem apenas duas.

Entre as espécies de *Salmonella* estão: *Salmonella bongori*, com 23 sorovares e *Salmonella enterica*, subdividida em seis subespécies: *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, *Salmonella enterica* subespécie *salamae*, *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *houtenae* e

*Salmonella enterica* subespécie *indica*, com 2.587 sorovares descritos, totalizando 2.610 sorovares nas duas espécies (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A terceira espécie foi descoberta em 2004 em um estudo realizado por Shelobolina et al. (2004), em que uma estirpe foi isolada do sedimento contaminado, por nitrato e urânio, de um aquífero no Tennessee, no qual a análise da sequência gênica indicou que esta possuía 96,4% de similaridade com a *S. bongori* e 96,3% com a *Enterobacter cloacae*. Posteriormente foram realizadas análises fisiológicas e filogenéticas confirmando que a linhagem encontrada pertencia ao gênero *Salmonella* espécie *subterranea*.

A *Salmonella* é um dos principais agentes de infecções alimentares em diversos países (LACONHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000), incluindo o Brasil, e sua ocorrência na Inglaterra e países vizinhos chega a 90% dos casos. Estão amplamente distribuídas na natureza sendo o trato intestinal do homem e dos animais o principal reservatório, nos quais as aves são os mais importantes (FRANCO; LANDGRAF, 2008). A transmissão da *Salmonella* ao homem ocorre geralmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados (WEGENER; BAGER, 1997), as carnes, inclusive de aves, são as mais frequentes. Quando associado a laticínios, os alimentos mais envolvidos são leite cru ou inadequadamente pasteurizado e queijos. Alimentos relacionados a ovos, principalmente as saladas a base de ovos, sorvetes e outros produtos de fabricação caseira também estão entre os mais afetados. Hábitos alimentares, manuseio excessivo e a conservação inadequada dos alimentos também influenciam a epidemiologia das salmoneloses. Entre os sorovares de *Salmonella*, alguns costumam ser mais específicos para cada animal: *S. Dublin* afeta o gado bovino, *S. Abortusovis* o gado ovino, *S. Choleraesuis* os suínos e *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* as aves (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Nos Estados Unidos, Canadá, Japão e Brasil a *S. enterica* sorovar Typhimurium é o sorotipo mais encontrado nos alimentos, entretanto os casos envolvendo *S. enterica* sorovar Enteritidis têm aumentado em produtos que contenham ovos, pois esse sorotipo pode colonizar o canal ovopositor das galinhas causando a contaminação da gema durante a formação do ovo (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As salmonelas resistem muito tempo nos alimentos desidratados e são sensíveis aos tratamentos térmicos (pasteurização e cozimento) assim como a irradiação, mas podem crescer em alimentos armazenados entre 2°C e 4°C (SILVA, 2012), entretanto a condição do meio onde ela se encontra interfere na temperatura de destruição. Na presença da água a resistência é menor do que em um alimento seco (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Além dos alimentos, pode ocorrer transmissão direta de pessoas ou animais infectados ou ainda contaminação fecal-oral e por meio da água (SHINOHARA et al., 2008).

É considerada uma das principais zoonoses na saúde pública em todo mundo, devido sua alta morbidade e dificuldades em seu controle, pois alguns sorotipos são multirresistentes

a antibióticos. O primeiro surto de salmonelose ocorreu em 1888 na Alemanha e foi descrito por Gurtner, no qual 59 pessoas adoeceram, entre eles houve o óbito de um jovem, 35 horas após ter ingerido 800 gramas de carne crua. Normalmente é necessária uma alta dose infectante, em torno de  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^6$ , dependendo do sorotipo e alimento envolvido, entretanto em crianças, idosos e imunodeprimidos a doença pode ser fatal. O quadro de salmonelose costuma se reverter após 48 horas sem a necessidade de antibióticos, medida que deve ser seguida, pois seu uso prolonga a excreção do agente e faz com que o portador assintomático selecione as salmonelas multirresistentes (SHINOHARA et al., 2008). Nos Estados Unidos, a salmonelose atinge cerca de um milhão de pessoas, com 19 mil hospitalizações e 380 óbitos anualmente (CDC, 2015).

### 3.3.4 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* compreende bactérias Gram-positivas em forma de cocobacilos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, não encapsulados e móveis entre 10°C a 25°C (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001), porém se tornam imóveis a 37°C, são catalase positiva com oxidase negativa, ureia e indol negativos, hidrolisam esculina e hemolisam hemácias de ovino ou equino (COSTA, 2013). Crescem em temperatura de 1°C a 45°C, sendo ótima a faixa entre 30°C a 37°C, com relatos de crescimento também a 0°C suportando congelamentos e descongelamentos repetidos (MANTILLA et al., 2007). Seu pH de crescimento varia entre 5 e 9 sendo ótimo entre 6 e 8 embora em meios de cultura possam se multiplicar em pH em torno de 9,5. Apesar da Aw ser ótima em 0,97 pode se multiplicar em condições mais baixas como 0,92 (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

O gênero *Listeria* pode ser isolado do solo, água, efluentes, alimentos ou fezes de seres humanos e animais (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Foi descrita pela primeira vez em 1940 por James Pirie e conta atualmente com quinze espécies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria marthii*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria weihenstephanensis* e cinco espécies descobertas recentemente, em 2014: *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria cornellensis*, *Listeria riparia* e *Listeria grandensis* (DEN BAKKER et al., 2014).

A listeriose pode ser considerada uma infecção de origem alimentar potencialmente fatal que acomete principalmente gestantes, recém-nascidos, idosos e pessoas com sistema imunológico debilitado. Os sintomas da doença são variados e podem causar manifestações graves como aborto, sepse e meningoencefalite ou sintomas mais brandos como febre e gastroenterite (COSTA, 2013). Nos Estados Unidos é a terceira principal causa de intoxicação

alimentar com aproximadamente 1.600 doentes anualmente, a maioria com necessidade de cuidados hospitalares e 1 óbito a cada 5 pessoas infectadas (CDC, 2013). Entre todas as espécies, duas se destacam por serem altamente patogênicas: *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. A *L. monocytogenes* pode infectar humanos e outros animais como aves e mamíferos domésticos e selvagens, já a *L. ivanovii* é específica para ruminantes (COSTA, 2013).

A *L. monocytogenes* está associada a aproximadamente 98% dos casos de contaminação em humanos. Devido a sua ampla distribuição na natureza, sua presença em carnes cruas é quase inevitável, podendo variar de 0 a 68% (MANTILLA et al., 2007), porém entre os alimentos mais acometidos também estão os queijos e lácteos, patês, salsichas, peixe defumado, saladas e industrializados (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Ao entrar em contato com o hospedeiro por via oral, a *Listeria* atinge o trato intestinal e se instala no fígado para multiplicação, ação controlada pelo sistema imune saudável, porém em pacientes debilitados essa constante exposição pode ocasionar bacteremia invadindo órgãos secundários como o cérebro e o útero. O primeiro caso de listeriose humana foi relatado em 1929, entretanto o primeiro isolamento foi de um paciente com meningite em 1921 na França por Jérôme Dumont e Louis Cotoni (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Na década de 80 houve vários surtos de listeriose, entre eles, um surto causado por salada de repolho tipo “coleslaw” no Canadá. Em 1983 nos Estados Unidos, a contaminação ocorreu com leite pasteurizado que afetou 49 pessoas, com índice de mortalidade de 29% e em 1985 um surto envolvendo queijo mole do tipo mexicano. Outro surto envolvendo queijo mole também ocorreu na Suíça entre os anos de 1983 e 1987 com 122 casos e 31 mortes (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Somente a partir de 1983, devido aos diversos casos, a listeriose foi identificada como uma importante infecção de origem alimentar (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

O gênero *Listeria* compreende 17 sorovares, sendo que a *L. monocytogenes* possui 13 (JAY, 2005), dos quais apenas três sorotipos (1/2a, 1/2b e 4b) são responsáveis por mais de 90% dos casos de listeriose em humanos e animais, apesar do sorovar 1/2c ser frequentemente isolado nos alimentos. As cepas 4b causam mais de 50% dos casos de listeriose no mundo, mas cepas do grupo 1/2 (a, b e c) predominam nos alimentos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Seu período de incubação varia de 3 a 70 dias dificultando a origem da contaminação alimentar. No Brasil, a listeriose humana é subnotificada e subdiagnosticada. A listeriose causada pela *L. monocytogenes* pode ser invasiva ou não. Na forma invasiva não causa sintomas gastrointestinais em humanos e na forma não invasiva costuma ocorrer uma gastroenterite febril, entretanto com sintomas inespecíficos que levam a doença a ser subdiagnosticada. Além da via oral também é possível a contaminação por via respiratória por meio de aerossóis, devido ao manejo de animais infectados (BARANCELLI et al., 2011).

Considerando a importância de *Listeria monocytogenes* em produtos lácteos, a legislação brasileira estabelece a ausência da bactéria em 25 g de queijo (BRASIL, 2001a), porém ela tem sido isolada em diferentes tipos de queijo nos continentes Americano e Europeu (SILVA et al., 1999; PARK et al., 2002; RUDOLF; SCHERER, 2001). No Brasil, dentre os vários estudos, observa-se uma frequência na ocorrência de 2,3% a 41,2% em queijos comercializados. Essa variação pode ser devido ao tipo de amostragem, região geográfica ou tipo de acondicionamento do produto (DESTRO; SERRANO; KABUKI, 1991; SILVA et al., 1999).

A listeriose causada pela *Listeria monocytogenes* é considerada uma doença relativamente rara em comparação com outras DTA, entretanto devido à sua alta taxa de letalidade, depois da salmonelose, é a segunda causa mais frequente de óbitos por doenças transmitidas por alimentos na Europa (ALLERBERGER; WAGNER, 2010).

### 3.3.5 *Clostridium* sulfito redutores

O gênero *Clostridium* pertence à família Bacillaceae, são bactérias Gram-positivas, anaeróbias, ubíquas, formadoras de esporos e móveis (MASSOLI, 2014), exceto o *Clostridium perfringens* devido à ausência de flagelos (HOLT et al., 1994), algumas espécies são patogênicas causando infecções e intoxicações que acometem animais e seres humanos devido a produção de toxinas. Sua temperatura ótima para crescimento é de 37°C a 45°C com pH próximo a 7 (MASSOLI, 2014).

*Clostridium* sulfito redutores são bactérias que fazem parte da microbiota intestinal tanto de seres humanos quanto de outros mamíferos e não se multiplicam em temperaturas abaixo de 20°C ou na presença de oxigênio, porém seus esporos são extremamente estáveis podendo sobreviver em diversas condições ambientais (ROBLES et al., 2000).

Os esporos podem ser responsáveis pelos estufamentos tardios nos queijos (FURTADO, 1985). Em geral o estufamento ocorre de 10 dias até oito semanas após a fabricação, acompanhado de mau cheiro e sabor alterado (SENYK et al., 1989). No Brasil, os estudos envolvendo esse patógeno são escassos, mas sabe-se que queijos tipo parmesão e Emmental são os mais afetados (MESQUITA et al., 2001).

A utilização dessas bactérias tem sido indicador de qualidade higiênica dos alimentos e do seu tempo útil de conservação. Quando está em grande número indica contaminação da matéria-prima e produzem endosporos altamente resistentes ao calor inclusive na pasteurização (DRUBI, 2005). Os *Clostridium* sulfito redutores possuem a capacidade de reduzir o sulfito a sulfeto de hidrogênio a 46°C (SILVA, 2012) e em meios seletivos reagem

com o ferro e precipitam na forma de sulfeto de ferro produzindo colônias enegrecidas (DRUBI, 2005).

O *C. perfringens* é classificado em cinco tipos toxigênicos: A, B, C, D e E de acordo com as quatro toxinas principais que cada um apresenta. O tipo A só produz a toxina alfa, tipo B produz as toxinas alfa, beta e épsilon, tipo C produz as toxinas alfa e beta, tipo D as toxinas alfa e épsilon e o tipo E as toxinas alfa e iota (OTUKI, 2010).

O tipo A é o mais encontrado em toxinfecções em humanos, entretanto além das 4 principais, há pelo menos 17 outras toxinas que podem ou não estar relacionadas aos diversos quadros clínicos em humanos e animais, dentre esses a enterotoxina CPE (*Clostridium perfringens* enterotoxin) é uma das toxinas confirmadas em casos de toxinfecção alimentar causada por *C. perfringens*, altamente resistente ao processamento térmico. Entre 1999 e 2008 o *C. perfringens* foi o quarto agente mais frequente nas DTA no Brasil, raramente leva ao óbito, mas em pessoas debilitadas, idosos e crianças pode ser fatal (PIRES; SILVA; LOBATO, 2011).

*C. perfringens* é comumente encontrado em carne crua e aves, e é umas das doenças mais comuns transmitidas por alimentos nos Estados Unidos, estimando-se que haja aproximadamente um milhão de casos anualmente. Os sintomas se desenvolvem entre 6 e 24 horas, normalmente entre 8 e 12 horas, causam diarreia e cólicas abdominais que começam abruptamente e duram menos de 24 horas. Febre e vômitos são incomuns e não é transmitido entre pessoas. Crianças e idosos são os mais suscetíveis para intoxicação alimentar por *C. perfringens* com sintomas mais graves como desidratação e duração mais intensa, de 1 a 2 semanas. A doença é causada pela ingestão de alimentos contaminados com a bactéria produtora da toxina, liberada no intestino da pessoa afetada durante o processo de esporulação (CDC, 2014).

Os alimentos mais comuns de infecção por *C. perfringens* são carne bovina, aves, molho e alimentos secos ou pré-cozidos, sendo mais fácil quando preparados em grandes quantidades e mantidos quentes antes de servir. É comum a ocorrência de surtos onde a demanda de pessoas é intensa como hospitais, cantinas escolares, prisões e asilos (CDC, 2014).

Para prevenção dos esporos de *C. perfringens* os alimentos devem ser cozidos em temperaturas adequadas e mantidos em temperaturas abaixo de 5°C ou acima de 60°C. Grandes porções de alimentos devem ser guardadas em pequenas quantidades e cobertas para reter a umidade com reaquecimento no mínimo a 74°C antes de servir (CDC, 2014).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LATICÍNIO

As amostras de queijo foram fornecidas por um laticínio localizado no Estado de Minas Gerais, com SIF, seguindo as normas estabelecidas pela IN-62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003a). O Laticínio segue as normas sanitárias vigentes, no que diz respeito à qualidade do leite recebido e utilizado na produção dos queijos e atende todos os procedimentos de boas práticas de fabricação e manipulação vigentes. Dessa forma, partiu-se da premissa de que os queijos produzidos atendam aos requisitos do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) do queijo tipo Emmental (BRASIL, 1996).

O estabelecimento produz uma larga gama de queijos, sendo o Emmental um de seus principais produtos. A validade do Emmental em embalagem fechada no laticínio é de 30 dias para embalagem resinada e de 90 dias para as embalagens a vácuo e atmosfera modificada. Após a abertura de qualquer uma das embalagens a validade passa a ser de 5 dias.

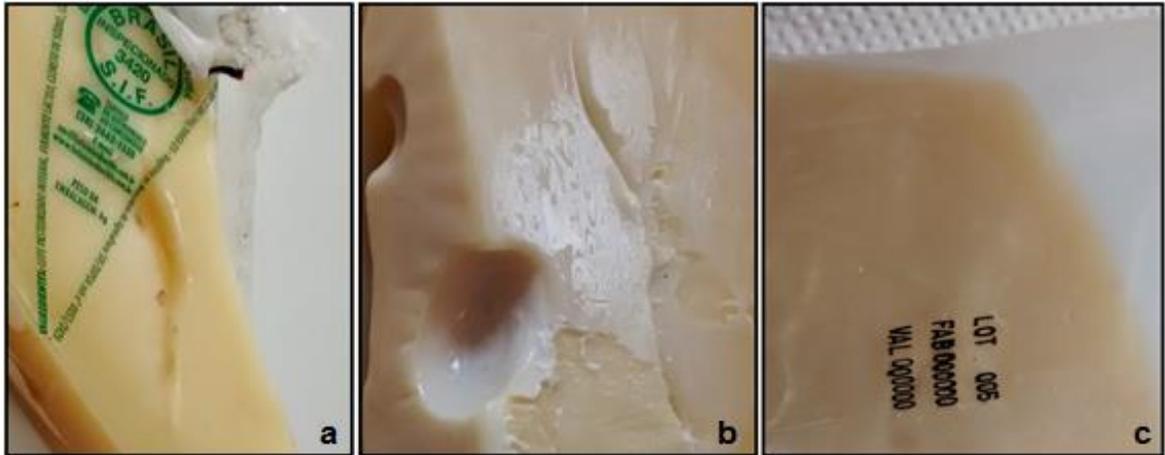
#### 4.1.1 Produção dos queijos

Foram produzidos no total 10 lotes do queijo tipo Emmental, com três tipos de embalagem e seis tempos de prateleira sendo um lote por semana, totalizando 180 amostras de queijo. A tecnologia de produção foi realizada de acordo com o preconizado por Furtado e Lourenço Neto (1994).

Após a produção dos lotes, cada peça foi porcionada em três frações (Figura 5): uma fração foi embalada a vácuo com equipamento (Selovac®), específico para esse fim, na segunda porção foi aplicada a resina de proteção e a terceira porção foi embalada no equipamento de atmosfera modificada.

Depois de embalados, os lotes foram alocados em uma embalagem secundária e mantidos em condições de refrigeração entre 4°C a 8°C, sendo enviados para o Laboratório de Bacteriologia Geral do Instituto Biológico de São Paulo nas datas pré-estabelecidas para a realização das análises microbiológicas.

**Figura 5** - Da esquerda para direita, amostras de queijos embaladas a vácuo **(a)**, com resina **(b)** e atmosfera modificada **(c)**

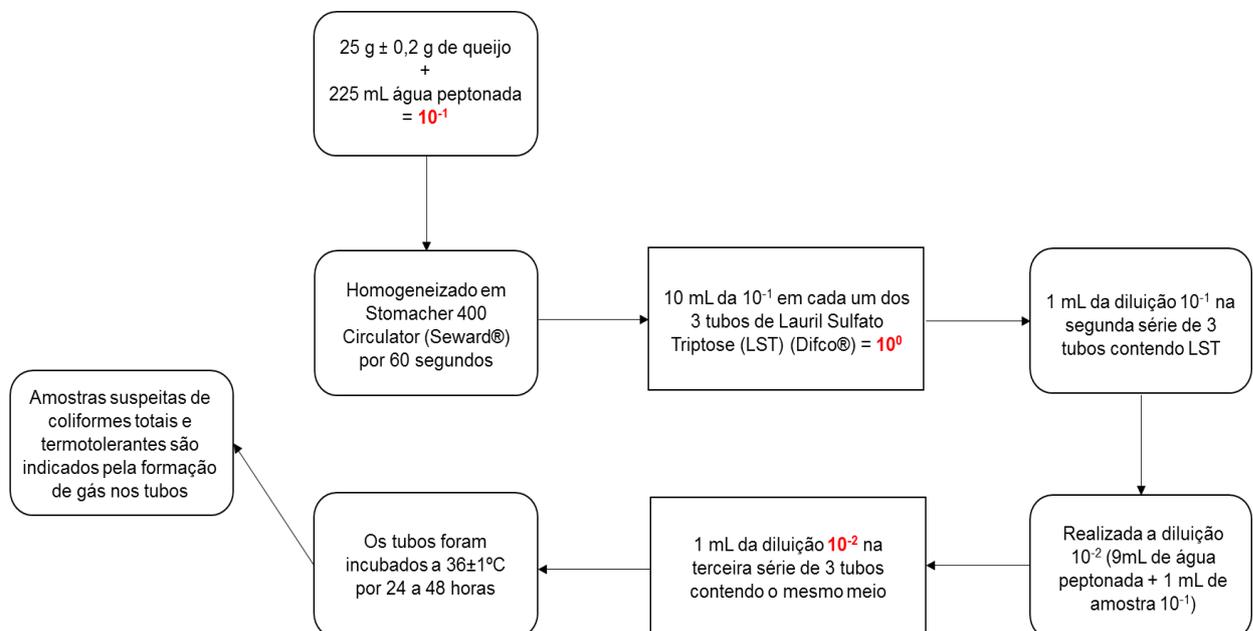


FONTE: Elaborado pela autora.

## 4.2 METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP) DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

### 4.2.1 Prova presuntiva

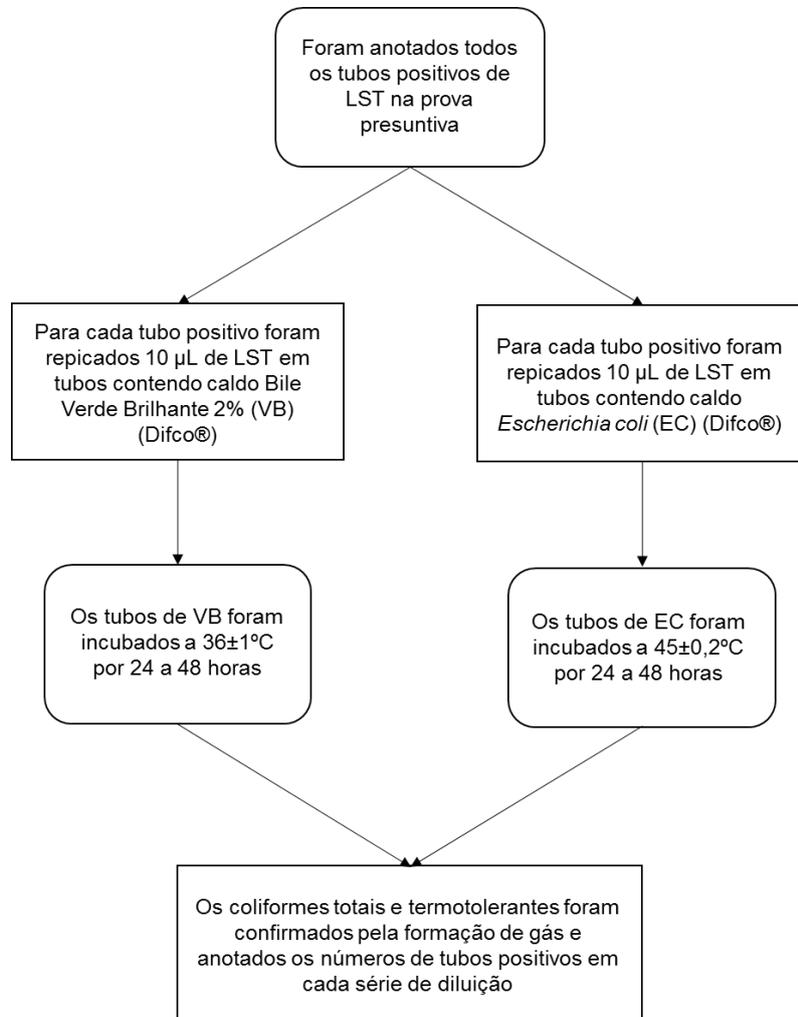
**Figura 6** - Fluxograma da metodologia de prova presuntiva para determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes



Fonte: Instrução Normativa 62 de 26/08/2003 modificada (BRASIL, 2003b).

#### 4.2.2 Prova confirmatória

**Figura 7** - Fluxograma da metodologia de prova confirmatória para determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes

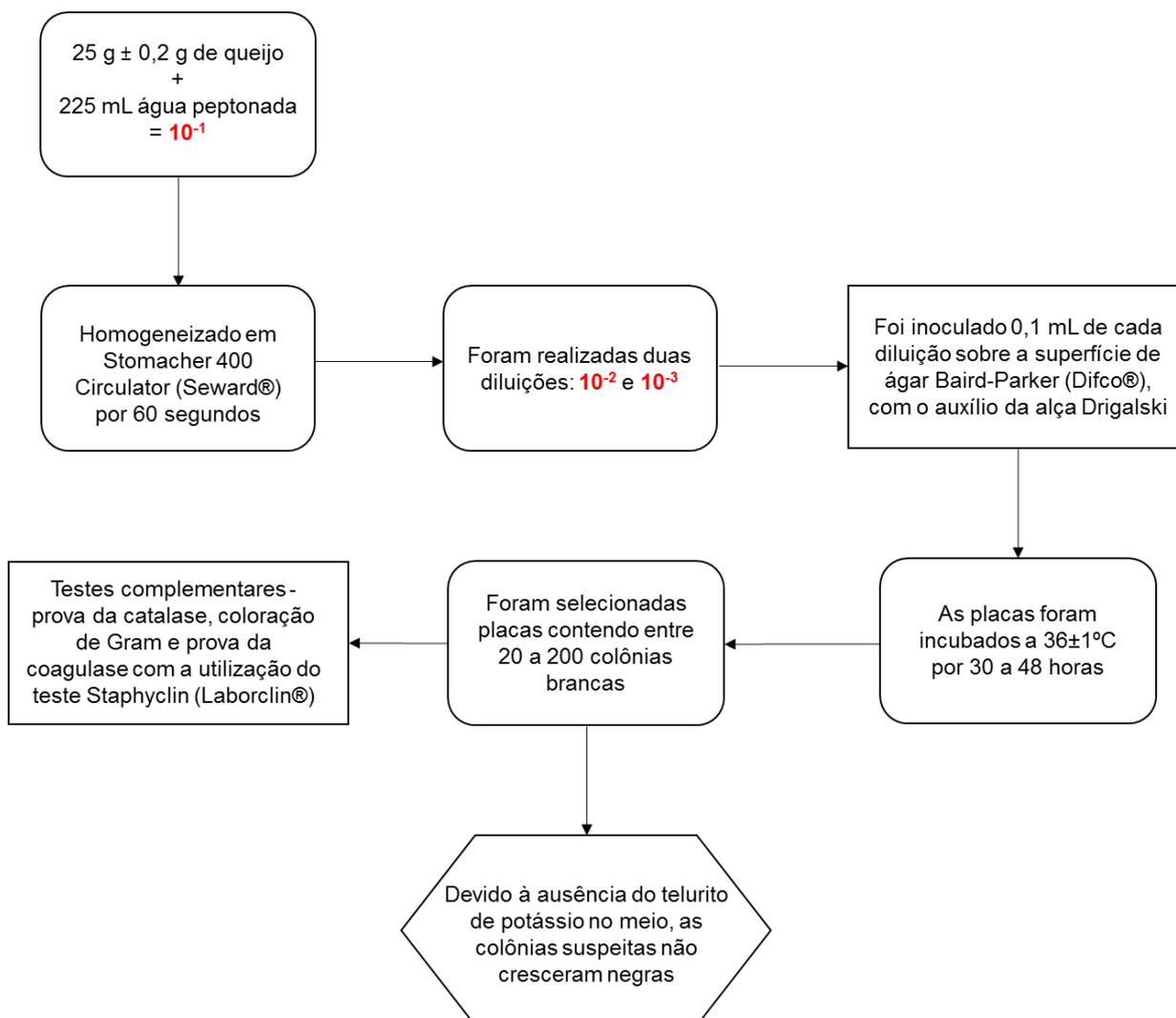


Fonte: Instrução Normativa 62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003b).

A partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos, foi verificado o NMP na Tabela de interpretação (ANEXO A) conforme Brasil (2003c).

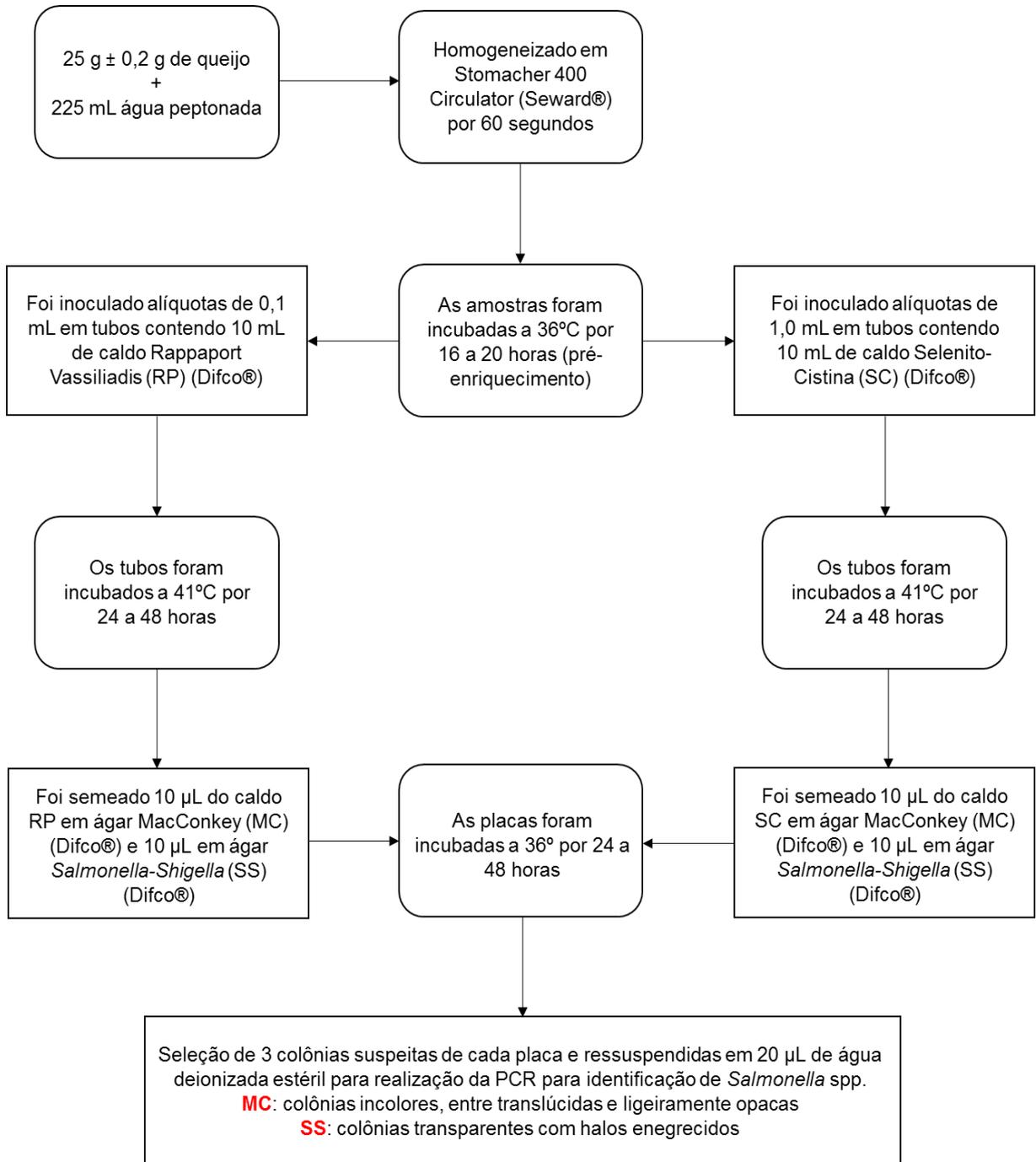
### 4.3 METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

**Figura 8** - Fluxograma da metodologia para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva

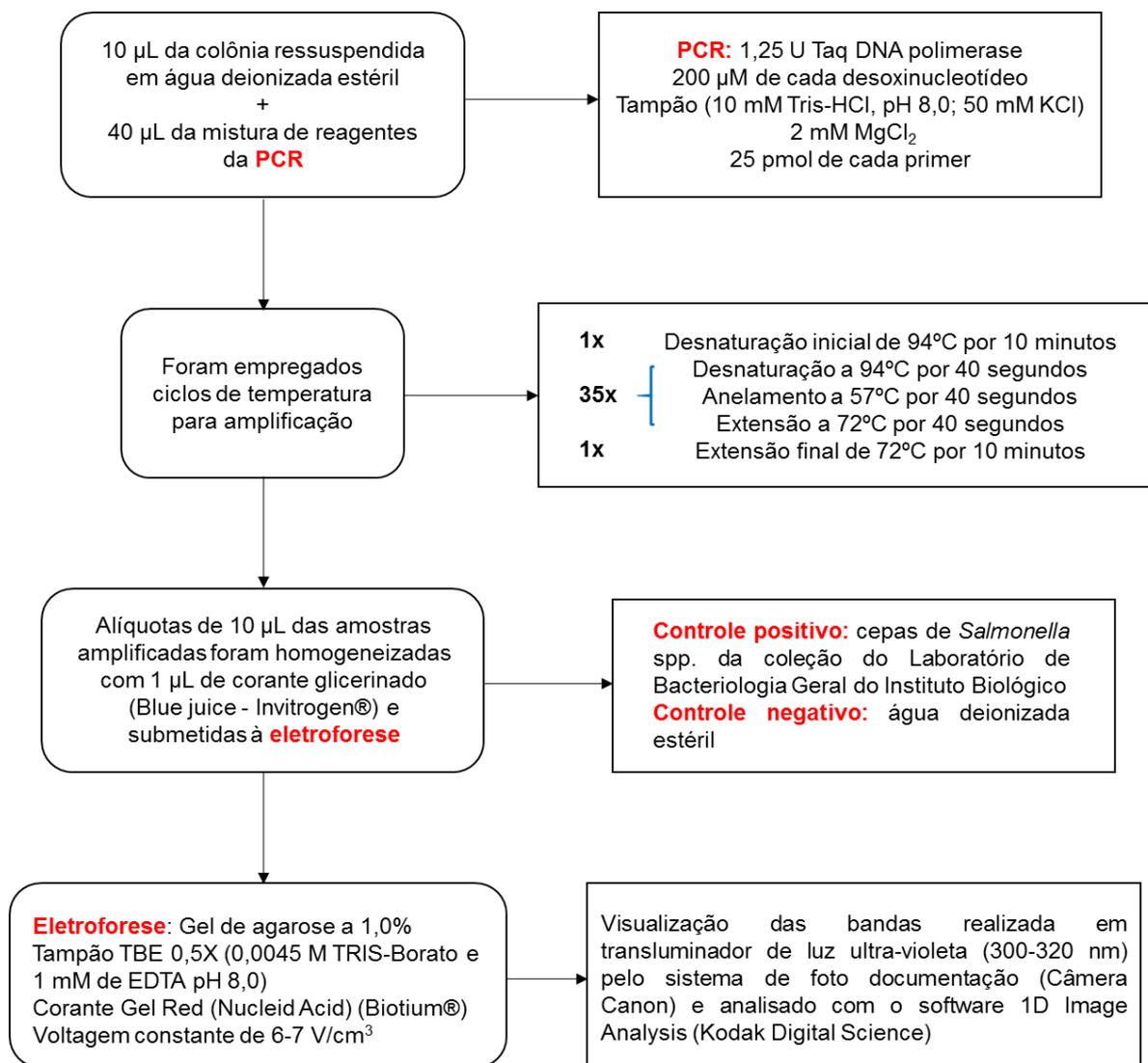


Fonte: Instrução Normativa 62 de 26/08/2003 modificada (BRASIL, 2003d).

O resultado final foi expresso considerando-se os dois primeiros algarismos representativos, separados por vírgula. Nos casos de algarismos subsequentes foram arredondados e transformados em potência de 10 (BRASIL, 2003e).

4.4 METODOLOGIA PARA ISOLAMENTO DE *Salmonella* spp.Figura 9 - Fluxograma da metodologia para isolamento de *Salmonella* spp.

FONTE: Instrução Normativa 62 de 26/08/2003 modificada (BRASIL, 2003f).

4.4.1 PCR para identificação de *Salmonella* spp.**Figura 10** - Fluxograma da PCR para identificação de *Salmonella* spp.

Fonte: Cortez et al. (2006).

**Quadro 2** - Sequência nucleotídica dos primers (Invitrogen®) que amplificam fragmento do gene *Inv A* de *Salmonella* spp.

GENE ALVO	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	TAMANHO DO AMPLICON	ESPÉCIE
<i>Inv A</i>	5' TTGTTACGGCTATTTTGACCA 3' 5' CTGACTGCTACCTTGCTGATG 3'	521 pares de bases	<i>Salmonella</i> spp.

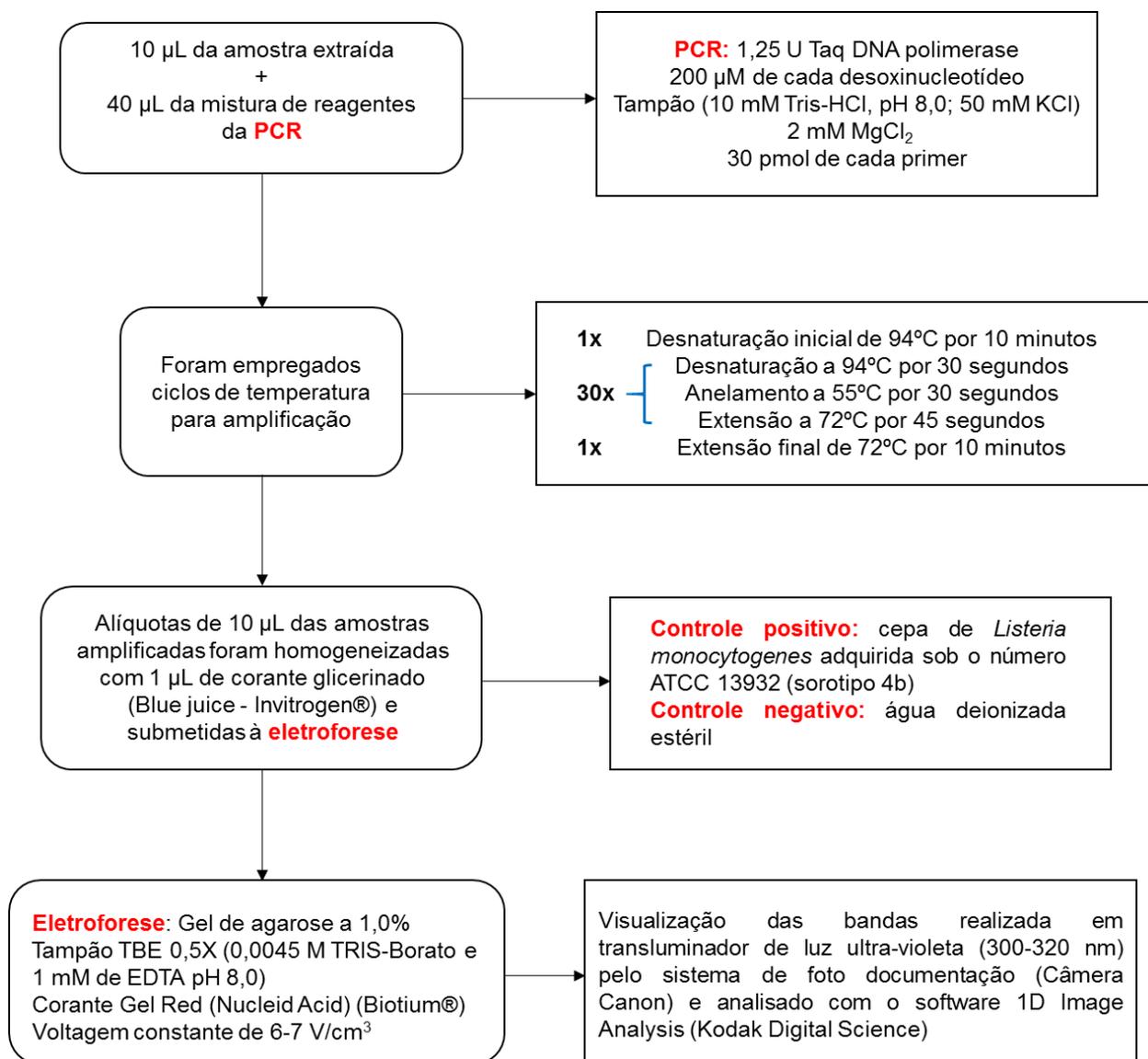
Fonte: Cortez et al. (2006).

#### 4.5 METODOLOGIA PARA DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes*

Para 25 g  $\pm$  0,2 g de queijo foram adicionados 225 mL de caldo Fraser (Difco®), para pré-enriquecimento da amostra, dentro de sacos plásticos estéreis, homogeneizado por aproximadamente 60 segundos no Stomacher 400 Circulator (Seward®) e incubado a 30°C por 24 horas (BRASIL, 2003g). Após o período de incubação, foram separados 1,5 mL da amostra para posterior extração e realização da PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*.

As suspensões de 1,5 mL das amostras de queijo foram extraídas de acordo com o protocolo de extração de DNA pelo reagente comercial DNAzol (Invitrogen®) adaptado de Chomczynski (1993):

- ❖ Centrifugação da amostra a 2000 rpm por 5 minutos;
- ❖ Transferência de 500  $\mu$ L do sobrenadante para novos tubos;
- ❖ Nova centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos;
- ❖ Descarte do sobrenadante e ressuspensão do pellet em 100  $\mu$ L de TE;
- ❖ Adição de 1 mL de DNAzol e homogeneização da amostra por inversão;
- ❖ Centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos;
- ❖ Descarte do sobrenadante e adição de 500  $\mu$ L de etanol puro ao pellet;
- ❖ Homogeneização por inversão até a formação de grumos brancos;
- ❖ Centrifugação a 4.000 rpm por 2 minutos;
- ❖ Descarte do sobrenadante por inversão;
- ❖ Adição de 850  $\mu$ L de etanol 75% e homogeneização do pellet com a pipeta;
- ❖ Centrifugação a 4.000 rpm por 2 minutos;
- ❖ Descarte do sobrenadante por inversão;
- ❖ Nova adição de 850  $\mu$ L de etanol 75% ao pellet;
- ❖ Centrifugação a 4.000 rpm por 2 minutos;
- ❖ Retirada do etanol com o auxílio da pipeta;
- ❖ Foi aguardado em média 20 segundos até a completa evaporação do etanol;
- ❖ O pellet foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de NaOH 8 mM;
- ❖ Adição de 40  $\mu$ L da solução Hepes 0,1 M para ajustar o pH para neutro (7,0);
- ❖ Medição do pH da amostra com tiras de pH para confirmação do mesmo.

4.5.1 PCR para identificação de *Listeria monocytogenes***Figura 11** - Fluxograma da PCR para identificação de *Listeria monocytogenes*

Fonte: Blais e Phillippe (1995).

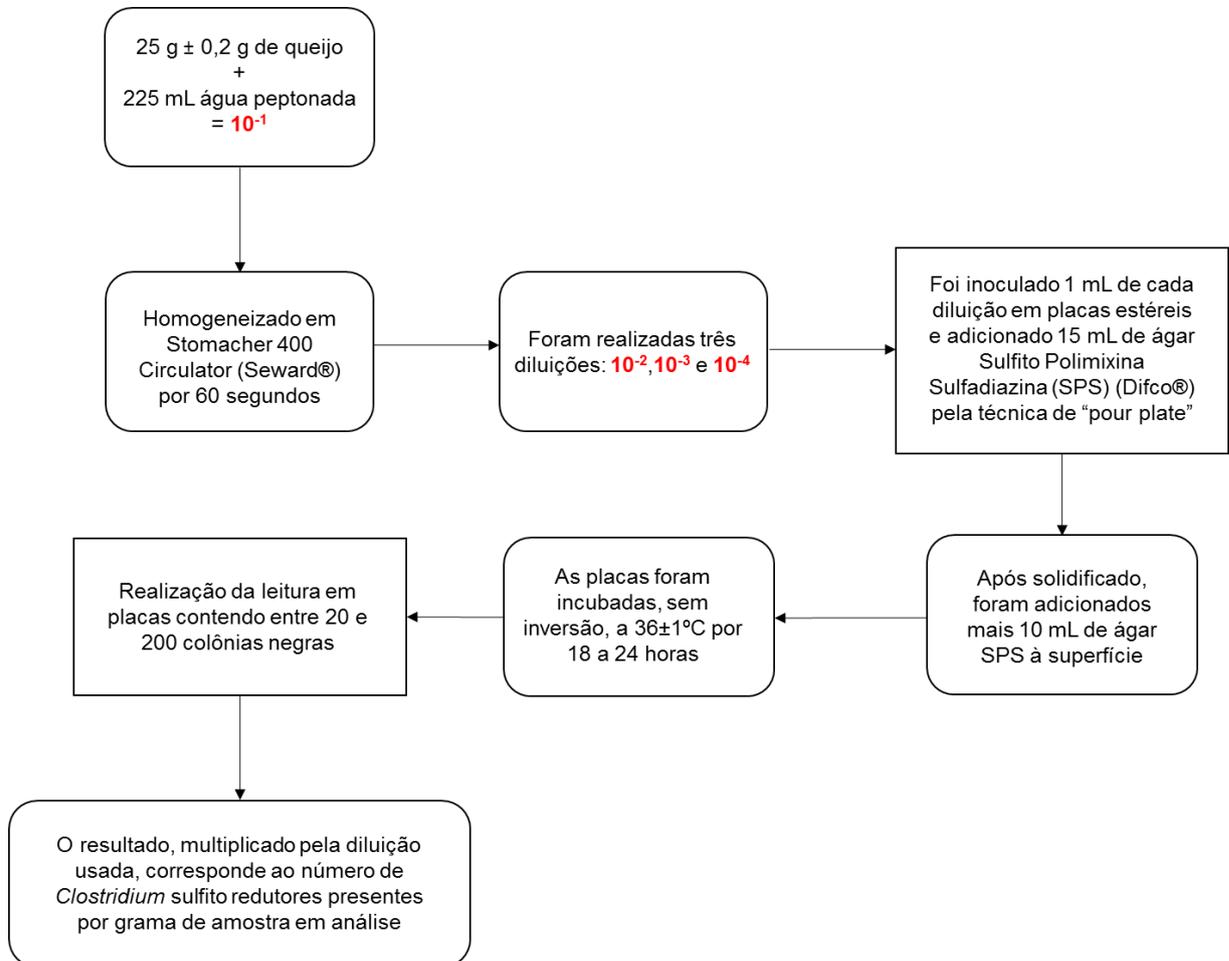
**Quadro 3** - Sequência nucleotídica dos *primers* (Invitrogen®) que amplificam fragmento do gene *Listeriolisina* de *Listeria monocytogenes*

GENE ALVO	SEQUÊNCIA DE PRIMERS	TAMANHO DO AMPLICON	ESPÉCIE
<i>Listeriolisina</i>	5' CATTAGTGGAAAGATGGAATG 3' 5' GTATCCTCCAGAGTGATCGA 3'	730 pares de bases	<i>Listeria monocytogenes</i>

Fonte: Blais e Phillippe (1995).

#### 4.6 METODOLOGIA PARA CONTAGEM DE *Clostridium* SULFITO REDUTORES

**Figura 12** - Fluxograma da metodologia para contagem de *Clostridium* sulfito redutores



Fonte: Instrução Normativa 62 de 26/08/2003 modificada (BRASIL, 2003h).

#### 4.7 INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

As amostras foram analisadas conforme a Resolução RDC nº12 de 2001 da ANVISA (Quadro 4) (BRASIL, 2001a).

**Quadro 4** - Interpretação utilizada para plano de amostragem

GRUPO DE ALIMENTOS	MICRO-ORGANISMO	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA INDICATIVA	TOLERÂNCIA PARA AMOSTRA REPRESENTATIVA			
			n	c	m	M
Queijos de média umidade: 36%	Coliformes a 45°C/g	10 <sup>3</sup>	5	2	5x10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	Estaf.coag.positiva/g	10 <sup>3</sup>	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
	<i>Salmonella</i> spp./25g	Ausente	5	0	Ausente	-
	<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	Ausente	5	0	Ausente	-

FONTE: RDC nº12 de 2001 da ANVISA (BRASIL, 2001a).

**n:** é o número de unidades a serem colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente. Nos casos nos quais o padrão estabelecido é ausência em 25 g, como para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e outros patógenos, é possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral, respeitando-se a proporção p/v (uma parte em peso da amostra, para 10 partes em volume do meio de cultura em caldo).

**c:** é o número máximo aceitável de unidades de amostras com contagens entre os limites de m e M (plano de três classes). Nos casos em que o padrão microbiológico seja expresso por "ausência", c é igual a zero, aplica-se o plano de duas classes.

**m:** é o limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável.

**M:** é o limite que, em plano de duas classes, separa o produto aceitável do inaceitável. Em um plano de três classes, M separa o lote com qualidade intermediária aceitável do lote inaceitável. Valores acima de M são inaceitáveis.

#### 4.8 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi realizada no laticínio por 7 membros: gerente da qualidade, coordenadora da qualidade, gerente de produção, encarregado de produção, encarregado da embalagem, encarregado da expedição e encarregado do almoxarifado.

Foi anotado o lote e tempo de prateleira das amostras de queijo para avaliação dos seguintes critérios: sabor, odor, consistência e maciez.

As análises sensoriais foram realizadas apenas nos lotes 8 e 9 com 90 dias de prateleira e no lote 4, com 120 dias de prateleira. Para os demais lotes, não foi possível realizar a análise devido as alíquotas não estarem em duplicata, uma para análise sensorial e outra para análise microbiológica. Sendo assim, após aberto no laboratório de bacteriologia, as amostras eram enviadas de volta ao laticínio, mas por se localizar em Minas Gerais chegavam com tempo superior a 5 dias após aberto, tempo máximo recomendado para degustação.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a comparação da proporção de amostras impróprias entre as amostras de embalagem resinada, embalagem a vácuo e embalagem de ATM e para cada micro-organismo, foi utilizado o teste não-paramétrico de qui-quadrado ou teste G (SIEGEL; CASTELLAN JÚNIOR, 2006), com nível de significância de 5%. Todos os cálculos foram realizados com o programa BioEstat versão 5.03.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para discussão foram utilizados parâmetros com queijos de média umidade e/ou maturados, semelhantes ao Emmental, devido ao ineditismo do presente estudo.

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO NMP DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

A determinação do NMP para coliformes totais era obrigatório para alimentos pela portaria nº451 de 19 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997), entretanto foi revogada e substituída pela RDC nº12 de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001a), excluindo essa obrigatoriedade, portanto para o presente estudo foi considerado o mesmo limite de coliformes termotolerantes ( $10^3$  NMP/g).

Das 180 amostras analisadas para coliformes totais, pelo método NMP, 6 (3,33%) apresentaram população acima do máximo permitido para coliformes totais (Tabela 1).

**Tabela 1** - Porcentagem de amostras aceitáveis e não aceitáveis para coliformes totais (NMP/g) nos queijos analisados

Coliformes totais		
Aceitáveis	174	96,67%
Não aceitáveis	6	3,33%
Total de amostras	180	100%

FONTE: Elaborado pela autora.

Devido os coliformes totais não serem unicamente de origem fecal, sua presença não significa que a contaminação tenha ocorrido dessa maneira, porém sua ocorrência pode estar relacionada a processamentos ou sanitizações inadequadas ou ainda recontaminação após esses procedimentos (SOUSA, 2006), que em caso de contagens elevadas indicam a deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto (LUCAS et al., 2012).

Para os coliformes termotolerantes, apenas 1 amostra (0,56%) apresentou população acima do máximo permitido (Tabela 2).

**Tabela 2** - Porcentagem de amostras aceitáveis e não aceitáveis para coliformes termotolerantes (NMP/g) nos queijos analisados

Coliformes termotolerantes		
Aceitáveis	179	99,44%
Não aceitáveis	1	0,56%
Total de amostras	180	100%

FONTE: Elaborado pela autora.

A presença de coliformes termotolerantes em alimentos indica que o produto entrou em contato diretamente com material fecal, sugerindo que a contaminação por esses patógenos ocorra por meio de manipulação inadequada e sem condições higiênicas suficientes (DUARTE et al., 2005), fato que pode ter ocorrido na única amostra que apresentou padrão inaceitável para esses patógenos.

Das 6 amostras, 3 eram de embalagem a vácuo (duas de 45 dias e uma de 180 dias de prateleira), 2 de embalagem resinada (uma de 150 dias e uma de 180 dias) e 1 amostra de embalagem em atmosfera modificada (de 180 dias). Entre as 6 amostras, 1 (embalagem a vácuo, lote 7) também apresentou população elevada para coliformes termotolerantes, dentro da validade preconizada pelo laticínio, que de acordo com a legislação vigente é a única considerada imprópria para consumo (Quadro 5).

Diante dos resultados é possível perceber que a porcentagem de contaminação foi baixa em relação ao número de amostras, entretanto é necessário enfatizar que mesmo com todos os cuidados na fabricação do queijo, houve falhas em determinado momento, permitindo a entrada desses micro-organismos.

**Quadro 5** - Resultado dos coliformes totais e termotolerantes acima do valor máximo permitido de acordo com a embalagem, lote e tempo de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	TEMPO DE PRATELEIRA	RESULTADO COLIFORMES TOTAIS
VÁCUO	4	45 DIAS	>1100 NMP/g
VÁCUO	7	45 DIAS	>1100 NMP/g
RESINA	10	150 DIAS	>1100 NMP/g
ATM	7	180 DIAS	>1100 NMP/g
VÁCUO	9	180 DIAS	>1100 NMP/g
RESINA	9	180 DIAS	1100 NMP/g
EMBALAGEM	LOTE	TEMPO DE PRATELEIRA	RESULTADO COLIFORMES TERMOTOLERANTES
VÁCUO	7	45 DIAS	1100 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

Resultados semelhantes ao do presente estudo foram descritos por Oliveira et al. (2011) que também encontraram coliformes termotolerantes em 4 das 60 amostras analisadas de queijo prato e muçarela provenientes de laticínios da região Sul do Brasil e Castro et al. (2012), observaram que das 12 amostras comercializados no Ceasa de Vitória da Conquista na Bahia, 6 (50%) amostras de queijo muçarela estavam fora do limite aceitável pela legislação para coliformes termotolerantes. Já Salvador et al. (2001) verificaram que em 5 das 10 amostras de queijo prato, com SIF, obtidos de supermercados em Caxias do Sul, no Rio Grande do Sul, e embaladas pelo fabricante, apresentaram população de coliformes totais acima do aceitável e para coliformes termotolerantes, 4 das 10 amostras apresentaram resultados acima do permitido pela legislação vigente.

No mesmo estudo de Salvador et al. (2001) também foram analisadas 10 amostras de queijo prato obtidos dos mesmos supermercados, porém fatiados e embalados por funcionários do estabelecimento. Nesse caso, observou-se que 7 amostras para coliformes totais e 4 para coliformes termotolerantes estavam acima do permitido. Em comparação aos resultados das duas formas de embalagem, o aumento de amostras acometidas por coliformes totais em queijo prato fatiado pelos supermercados sugerem que a contaminação ocorreu por meio de equipamento com limpeza ineficiente ou funcionários com higiene inadequada.

Marinheiro et al. (2015) também encontraram coliformes termotolerantes em 2 das 20 amostras de muçarela em peça e em 3 das 20 amostras de muçarela fatiada produzidos industrialmente sob inspeção federal ou estadual no município de Pelotas no Rio Grande do

Sul, assim como Luna et al. (2009) em 1 das 30 amostras de queijo muçarela fatiado comercializado em supermercados do Distrito Sanitário IV de Recife – PE, e Santos-Koelln, Mattana e Hermes (2009) em 4 das 7 amostras de queijo colonial comercializado em supermercados da região Oeste do Paraná.

Contudo, tanto no mesmo estudo de Santos-Koelln, Mattana e Hermes (2009), porém para análise de queijo muçarela, quanto no estudo de Rodrigues et al. (2011) que analisaram 11 amostras de queijo muçarela produzidos no entorno de Goiânia, em Goiás, todas as amostras foram negativas para coliformes.

Além dos autores citados, a presença de coliformes não foi detectada em outros estudos como o de Quintana e Carneiro (2007) em pesquisa de 60 amostras de queijo muçarela analisadas adquiridas de um laticínio da cidade de Morrinhos em Goiás e Etges (2011) nas 50 amostras de queijo muçarela fatiados e embalados à vácuo adquiridas de supermercados da região noroeste do Rio Grande do Sul.

O estudo de Lucas et al. (2012), que encontraram em 1 das 8 amostras de queijo prato analisadas valores acima do permitido para coliformes totais, e nenhuma para coliformes termotolerantes, também vai de acordo com a legislação vigente, visto que os coliformes totais não são mais obrigatórios, sendo assim, todas as amostras foram consideradas próprias para o consumo.

A presença de coliformes termotolerantes, principalmente *E.coli* pode ser associada ao leite utilizado para preparo do queijo. Por serem bactérias termosensíveis, sua presença em queijos fabricados com leite pasteurizado, indica contaminação posterior ao preparo ou pasteurização ineficaz (TAVARES; GARCIA, 1993).

Fagnani et al. (2013) realizaram um estudo em 4 laticínios da região norte do Paraná para acompanhamento do processo de fabricação do queijo muçarela, com SIF, buscando identificar os focos de contaminação. Foi identificado que apesar de receber leite cru com elevadas contagens de coliformes totais e *E.coli*, após a pasteurização, esses números foram reduzidos em mais de 99%. O maior foco de contaminação ocorreu nas etapas iniciais com utensílios utilizados na coagulação, corte e desmoldagem da massa, elevando exponencialmente os números de coliformes totais e termotolerantes, entretanto a filagem, salga e maturação do produto reduziram esses números para limites aceitáveis de acordo com a legislação. Em relação às mãos dos funcionários, também avaliada no estudo, apresentou contagens elevadas para coliformes totais, porém não foi possível para os autores concluir se essa contaminação foi originada de higiene pessoal inadequada, visto que a massa já apresentava também altas contagens em algumas etapas do processamento. Para coliformes termotolerantes, os índices encontrados estavam abaixo do preconizado pela legislação. Todavia é necessário ressaltar que tanto a higiene pessoal dos funcionários quanto dos

utensílios e equipamentos utilizados nas produções alimentares são fundamentais para assegurar um produto de qualidade.

## 5.2 CONTAGEM DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA

Das 180 amostras analisadas, 17 amostras (9,44%) apresentaram população acima do máximo permitido ( $10^3$  UFC/g) (Tabela 3) para SCP.

Todas as colônias presuntivas de *Staphylococcus* spp. (100%) isoladas em ágar Baird-Parker foram confirmadas como coagulase positiva.

**Tabela 3** - Porcentagem de amostras para *Staphylococcus* coagulase positiva aceitáveis e não aceitáveis nos queijos analisados

<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva		
Aceitáveis	163	90,56%
Não aceitáveis	17	9,44%
Total de amostras	180	100%

FONTE: Elaborado pela autora.

Em relação ao tipo de embalagem, 7 amostras eram de embalagem a vácuo (três de 90 dias, três de 120 dias e uma de 150 dias), 4 de embalagem resinada (uma do dia zero, uma de 90 dias, uma de 150 dias e uma de 180 dias) e 6 de embalagem em atmosfera modificada (duas de 90 dias, duas de 120 dias, uma de 150 dias e uma de 180 dias) (Quadro 6).

De acordo com o tempo de prateleira, apenas uma amostra de embalagem resinada apresentou populações elevadas para *Staphylococcus* coagulase positiva no dia 0, sugerindo contaminação durante a produção. Entre os demais tempos de prateleira, todas as embalagens apresentaram contagens elevadas nos 90 dias, no qual exceto para embalagem resinada, os demais não deveriam apresentar contagens elevadas visto que ainda estavam dentro da validade. De modo geral, nenhuma das embalagens apresentou níveis aceitáveis para *Staphylococcus* coagulase positiva dentro do prazo de validade estipulado pelo laticínio.

**Quadro 6** - Resultado da população de *Staphylococcus* coagulase positiva acima dos limites aceitáveis nos diferentes tipos de embalagens, lote e tempo de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	TEMPO DE PRATELEIRA	RESULTADO
RESINA	3	0 DIAS	$1,1 \times 10^3$ UFC/g
VÁCUO	3	90 DIAS	$1,3 \times 10^3$ UFC/g
ATM	3	90 DIAS	$1,4 \times 10^3$ UFC/g
RESINA	4	90 DIAS	$2,6 \times 10^4$ UFC/g
VÁCUO	5	90 DIAS	$2,4 \times 10^3$ UFC/g
ATM	7	90 DIAS	$1,7 \times 10^3$ UFC/g
VÁCUO	9	90 DIAS	$1,3 \times 10^5$ UFC/g
VÁCUO	1	120 DIAS	$2,5 \times 10^3$ UFC/g
ATM	1	120 DIAS	$1,0 \times 10^3$ UFC/g
VÁCUO	6	120 DIAS	$1,3 \times 10^3$ UFC/g
VÁCUO	9	120 DIAS	$3,4 \times 10^3$ UFC/g
ATM	9	120 DIAS	$1,2 \times 10^3$ UFC/g
VÁCUO	5	150 DIAS	$3,0 \times 10^3$ UFC/g
ATM	5	150 DIAS	$5,4 \times 10^3$ UFC/g
RESINA	6	150 DIAS	$1,1 \times 10^3$ UFC/g
RESINA	5	180 DIAS	$1,2 \times 10^3$ UFC/g
ATM	5	180 DIAS	$1,6 \times 10^3$ UFC/g

FONTE: Elaborado pela autora.

Dentre os patógenos analisados, *Staphylococcus* coagulase positiva foi o grupo que demonstrou maior contaminação acima dos limites aceitáveis, com 17 amostras (9,44%).

A presença de estafilococos em alimentos é comum, porém quando encontrados em queijos que utilizam leite pasteurizado em seu preparo, a contaminação se associa ao manipulador, pois o processo de pasteurização é suficiente para eliminar esse patógeno, entretanto em queijos maturados, dificilmente são detectados, devido as alterações químicas e microbiológicas que ocorrem principalmente na maturação por mais de 60 dias (BOARI et al., 2002).

Apesar dos *Staphylococcus aureus* serem frequentemente responsáveis por intoxicações alimentares, outras espécies desse gênero são produtoras de coagulase e toxinas termorresistentes, como o *S. hyicus* e *S. intermedius*, razão pela qual é realizada a pesquisa de SCP e não apenas dos *Staphylococcus aureus* nos alimentos (ASSUMPÇÃO et al., 2003).

Em comparação a outros estudos a porcentagem de SCP encontrada em queijos é variável. As contagens para *Staphylococcus* coagulase positiva apresentaram-se acima do permitido para Pietrowski et al. (2008) com 3 (18,75%) das 16 amostras de muçarela comercializadas em Ponta Grossa no Paraná, Rodrigues et al. (2011) com 4 (36%) das 11

amostras de queijo muçarela produzidos em Goiás e região, Duarte, Barbosa e Barbosa (2011), com 1 das 4 amostras de queijo muçarela fatiada coletadas no município de Luz, em Minas Gerais, Marinheiro et al. (2015) com 4 das 20 amostras de muçarela fatiada e Santos-Koelln, Mattana e Hermes (2009) com 2 das 7 amostras de queijo colonial.

Boari et al. (2002) encontraram em 5 das 16 amostras de queijos maturados adquiridos do comércio de Lavras, em Minas Gerais, populações elevadas para *S. aureus*, ultrapassando o limite permitido. As amostras eram de queijo Gorgonzola, Saint-Paulin, Provolone, Camembert e Gruyère. Salvador et al. (2001) encontraram em 5 das 10 amostras de queijo prato embalado pelo fabricante populações de *Staphylococcus aureus* acima do permitido na legislação. Para queijo prato fatiado, 4 das 10 amostras estavam acima do permitido.

Alguns resultados são ainda mais preocupantes como os obtidos por Nascimento et al. (2009) com 27 das 30 amostras de queijo tipo muçarela fatiado adquiridos de supermercados do Distrito Sanitário IV de Recife - PE e Castro et al. (2012) das quais 12 amostras analisadas de queijo muçarela para *Staphylococcus* spp., 11 (91,66%) apresentaram contagens acima do permitido, porém conforme descrito pelos autores, apenas uma amostra estava na temperatura recomendada para comercialização (entre 4° e 8°C), a que provavelmente foi a única dentro dos limites aceitáveis. A manutenção de alimentos contaminados por horas, entre 20° e 35°C, o que ocorreu em 6 das 12 amostras, facilita a multiplicação de *Staphylococcus* coagulase positiva e a liberação de toxinas capazes de provocar intoxicação alimentar. Portanto, não apenas a manipulação deve ser adequada como também seu armazenamento.

Devido aos *Staphylococcus* spp. estarem presentes em 40% das pessoas saudáveis, especialmente nas mucosas da nasofaringe, sugere-se que a contaminação por esses microorganismos ocorra por meio dos manipuladores (FERREIRA et al., 2010), cuja suspeita já havia sido descrito por Raddi, Leite e Mendonça (1988) que realizaram um estudo com 48 manipuladores de alimentos dos principais estabelecimentos comerciais da cidade de Araraquara-SP, sendo 44,1% deles portadores de *S. aureus* nas fossas nasais e 33,8% nas mãos. Outro fator preocupante é que entre 30 e 50% da população são portadores de *Staphylococcus aureus* e um terço até metade deles carregam cepas enterotoxigênicas (WIENEKE; ROBERTS; GILBERT, 1993)

Apesar de todo risco de contaminação atribuído a este patógeno, é possível obter um alimento seguro, assim como Santos-Koelln, Mattana e Hermes (2009) na análise de queijo muçarela e Oliveira et al. (2011) nos quais todas as amostras estavam de acordo com a legislação vigente para população de *Staphylococcus* coagulase positiva. Menezes et al. (2011) também não encontraram população elevada de SCP nas 22 amostras de queijo prato e muçarela obtidos de um laticínio localizado no noroeste do Paraná assim como Lucas et al. (2012), Quintana e Carneiro (2007) e Etges (2011).

Apesar da porcentagem de contaminação ser pequena nesse estudo, houve sua ocorrência e há a necessidade de controles mais rígidos quanto ao seu processo de fabricação, pois pelo gênero *Staphylococcus* ser ubiqüitário é praticamente impossível sua total remoção no ambiente industrial, entretanto medidas preventivas como rigoroso controle da matéria-prima, processamento adequado e implementação de programas de higienização podem reduzir esse risco (LIMA, 2005).

No estudo conduzido por Fagnani et al. (2013), em laticínios localizados no Paraná, a maior população de *S. aureus* ocorreu após a fermentação do queijo muçarela, com provável início na desora da massa, etapa na qual os funcionários manipulam as massas. Assim sendo, a fermentação pode ser a etapa que apresenta maiores riscos quando considerado o potencial enterotóxico desse patógeno, visto que as demais etapas da produção de queijo, reduzem a população, porém não eliminam suas toxinas pré-formadas.

Assumpção et al. (2003) realizaram um estudo em um laticínio de Lavras em Minas Gerais, acompanhando a produção de 5 amostragens de queijo prato. Na análise realizada todas as amostras de leite cru apresentaram populações elevadas de SCP e *S. aureus*, entretanto, foram reduzidos a <1 UFC/mL após a pasteurização, evidenciando que a contaminação do produto final não está relacionada a essa fonte em casos de pasteurizações eficientes. Tanto a água de imersão quanto a salmoura não apresentaram esses patógenos. Já as mãos e os antebraços dos funcionários evidenciaram a presença desse patógeno, entretanto apenas um funcionário, com contagens acima do permitido, resultando o produto final em impróprio para o consumo. Apesar de apenas um funcionário ter apresentado populações elevadas de SCP, outras 2 amostragens chegaram ao final da produção impróprias para o consumo, sugerindo que a contaminação ocorreu por outros fatores não analisados pelos autores, comprovando que não apenas os funcionários como todo material e equipamentos envolvidos na produção dos alimentos devem ser rigorosamente monitorados afim de reduzir a contaminação por esses e outros patógenos.

### 5.3 DETECÇÃO DE *Salmonella* spp. POR ISOLAMENTO E PCR

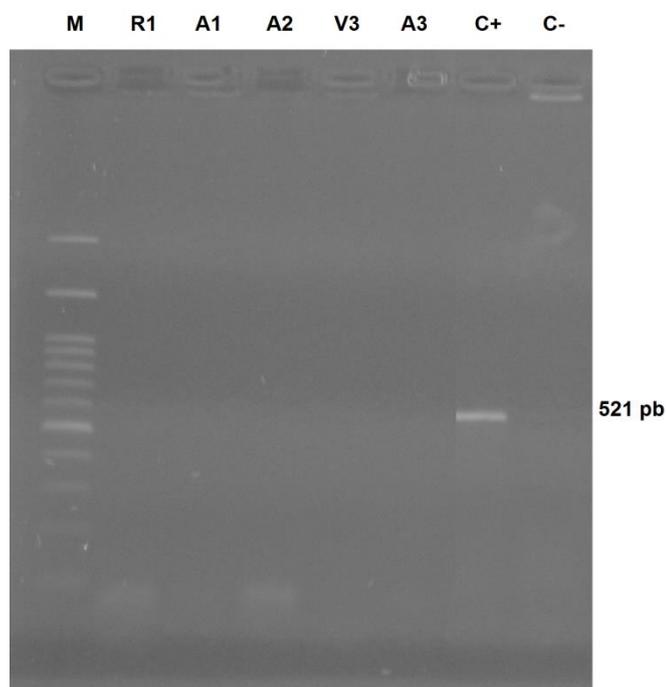
Das 180 amostras previamente enriquecidas e cultivadas em caldos (RP e SC) e ágar (MC e SS) seletivos, 55 apresentaram colônias suspeitas (Figura 13), todas em ágar MC. As colônias foram separadas e realizada a PCR para confirmação de *Salmonella* spp., entretanto todas foram negativas para o gênero (Figura 14) descartando a necessidade de diferenciação de sorovares entre *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium.

**Figura 13** - Colônias transparentes suspeitas de *Salmonella* spp. em ágar MacConkey proveniente de caldo Rappaport Vassiliadis



FONTE: Elaborado pela autora.

**Figura 14** - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Salmonella* spp.



FONTE: Elaborado pela autora.

**M:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Invitrogen®); **R1:** Resina lote 1; **A1:** ATM lote 1; **A2:** ATM lote 2; **V3:** Vácuo lote 3; **A3:** ATM lote 3 (todas as amostras referentes a 0 dias de prateleira); **C+:** controle positivo; **C-:** controle negativo; **pb:** pares de base.

Entre as 180 amostras de queijo analisadas no presente estudo, todas estavam de acordo com a RDC nº12 de 2001, que preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento. Resultado igualmente obtido por Santos-Koelln, Mattana e Hermes (2009) para queijo muçarela e colonial, Oliveira et al. (2011), Rodrigues et al. (2011), Lucas et al. (2012) e Yamaguchi et al. (2013), porém diferente do estudo de Castro et al. (2012) que isolaram o

patógeno de 4 (33,33%) das 12 amostras analisadas e Pietrowski et al. (2008) que isolaram *Salmonella* spp. de 1 amostra (6,25%) ambos de queijo muçarela. Marinheiro et al (2015) também encontraram *Salmonella* spp. em 1 das 20 amostras de muçarela fatiada e Etges (2011) encontrou o patógeno em 1 das 50 amostras de queijo muçarela.

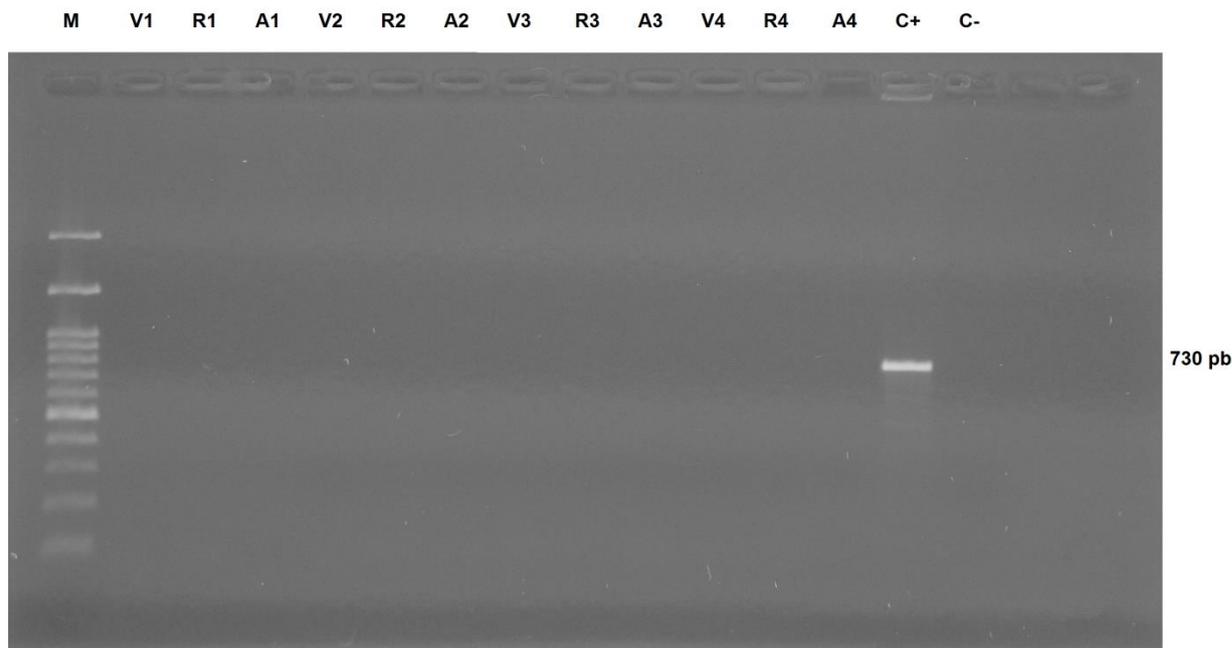
Salvador et al. (2001) também apresentaram resultados diferentes do presente estudo. Das 10 amostras de queijo prato fatiado e embalado por supermercados, 1 apresentou contaminação por *Salmonella arizonae*, diferente das 10 amostras embaladas pelo fabricante, sugerindo que a contaminação ocorreu devido a manipulação de funcionário portador do patógeno.

A presença de bactérias lácticas e consequente produção de ácido láctico leva à redução do pH do meio, desfavorecendo o crescimento de micro-organismos indesejáveis, além de produzirem compostos antagônicos como, por exemplo, as bacteriocinas, restringindo o crescimento de patógenos (ANDRADE, 2006) que poderiam justificar a ausência de *Salmonella* spp. nesse estudo.

#### 5.4 DETECÇÃO DE *Listeria monocytogenes* POR PCR

Das 180 amostras analisadas todas foram negativas para *Listeria monocytogenes* após extração e PCR (Figura 15) estando de acordo com a RDC nº12 de 2001, que preconiza ausência do micro-organismo em 25 g de alimento.

**Figura 15** - Resultados obtidos pela amplificação por PCR para detecção de *Listeria monocytogenes*



FONTE: Elaborado pela autora.

**M:** Marcador de peso molecular (100 bp DNA Ladder - Invitrogen®); **V1:** Vácuo lote 1; **R1:** Resina lote 1; **A1:** ATM lote 1; **V2:** Vácuo lote 2; **R2:** Resina lote 2; **A2:** ATM lote 2; **V3:** Vácuo lote 3; **R3:** Resina lote 3; **A3:** ATM lote 3; **V4:** Vácuo lote 4; **R4:** Resina lote 4; **A4:** ATM lote 4 (todas amostras referentes aos 45 dias de prateleira); **C+:** controle positivo; **C-:** controle negativo; **pb:** pares de base.

Resultados diferentes foram obtidos por Oliveira et al. (2011) que encontraram o patógeno em 4 das 60 amostras analisadas de queijo prato e muçarela na região sul do país e Silva et al. (2015) que detectaram o patógeno em 2 das 19 amostras de queijo muçarela fatiado adquirido de supermercados e padarias de Goiânia. Entre as amostras positivas, uma foi de *L. monocytogenes* e a outra de *L. innocua*.

Em um estudo conduzido por Lima et al. (2015) foram analisadas 34 amostras de queijo muçarela fatiado, adquiridos de padarias e supermercados de Goiânia, em Goiás. Das 34 amostras analisadas, 4 confirmaram presença de *Listeria monocytogenes* e 1 para *L. innocua*.

Marinheiro et al (2015) também encontraram *Listeria monocytogenes* em 1 das 20 amostras de muçarela fatiada assim como González, Salas e Phillips (2009), que das 48 amostras de queijo tipo Edam provenientes aleatoriamente de comércios, dos municípios de Maracaibo e São Francisco, no Estado de Zulia, na Venezuela, 7 amostras foram positivas para *Listeria* spp. Das 7 amostras foram isoladas 72 colônias, das quais 11 foram realizadas provas bioquímicas para identificação da espécie, resultando em: 5 colônias de *L. welshimeri*, 3 colônias de *L. grayi*, 2 colônias de *L. innocua* e 1 colônia de *L. monocytogenes*.

De acordo com Pianta et al. (2008), 2 das 3 amostras de queijo colonial obtidos no Estado do Rio Grande do Sul, fabricados de forma industrializada estavam contaminadas por *Listeria monocytogenes*, bem como no estudo conduzido por Bernardy et al. (2006) que 2 das 3 amostras de queijo colonial industrializadas obtidas também do Rio Grande do Sul, apresentaram *Listeria monocytogenes* e Silva et al. (2011) que relataram um estudo realizado por Pompermayer em 2002, no qual o autor detectou a presença de *Listeria monocytogenes* em 8 das 100 amostras analisadas de queijo de média umidade no Rio Grande do Sul.

Nem sempre a detecção de *Listeria monocytogenes* é possível devido a sua baixa concentração no leite cru, assim como sua competição entre os demais micro-organismos (MEYER-BROSETA et al., 2003), justificando a ausência do patógeno no presente estudo, mesmo após a utilização de caldo Fraser para enriquecimento do micro-organismo.

### 5.5 CONTAGEM DE *Clostridium* SULFITO REDUTORES

Das 180 amostras nenhuma apresentou placas com colônias enegrecidas suspeitas (Figura 16), portanto não foi necessário a confirmação das colônias e posterior diferenciação para *Clostridium perfringens*.

**Figura 16** - Amostra negativa para *Clostridium* sulfito redutores em ágar SPS



FONTE: Elaborado pela autora.

No presente estudo, todas as amostras foram negativas para *Clostridium* sulfite redutores. Resultados semelhantes aos obtidos por Ritter, Santos e Bergmann (2001), que analisaram 30 amostras de queijo colonial produzido e comercializado por pequenos

produtores no Rio Grande do Sul e, mesmo utilizando leite não pasteurizado, não encontraram este patógeno.

De acordo com a RDC nº12 de 2001, os *Clostridium* sulfito redutores são exigidos apenas para produtos cárneos, portanto são escassos os estudos de queijo que possuem análise para esses patógenos, entretanto sua pesquisa é importante, pois os esporos de *Clostridium* sulfito redutores nestes produtos, são indicadores de contaminação externa, provenientes do leite e do ambiente em que foi ordenhado, nos casos de leite cru, assim como as demais etapas na produção do queijo, bem como o manuseio e conservação do alimento, tendo em vista que esses micro-organismos podem resistir à pasteurização do leite vindo mais tarde a proliferar no queijo (MARQUES, 1997).

Durante o período de análises, foi observado que 21 (11,67%) das 180 amostras apresentavam pontos de bolor (Tabela 4).

**Tabela 4** - Porcentagem de amostras com presença ou ausência visual de bolores nos queijos analisados

Bolores		
Presença	21	11,67%
Ausência	159	88,33%
Totals de amostras	180	100%

FONTE: Elaborado pela autora.

Nos 45 dias de tempo de prateleira, as 2 amostras que apresentaram a contaminação por bolores eram queijos com a embalagem resinada. Nos 90 dias, 3 embalagens pertenciam a vácuo, 1 resinada e outra de ATM. Aos 120 dias, 2 eram de embalagem a vácuo, 1 de embalagem resinada e 3 de embalagem em ATM. Nos 150 dias, 1 embalagem foi a vácuo, 3 resinada e 1 de ATM. Para os 180 dias, 1 amostra foi de embalagem a vácuo, 1 resinada e 1 de ATM (Quadro 7). Dentre as embalagens, apenas a resinada apresentou bolor após o tempo de validade de 30 dias. As demais embalagens começaram a apresentar pontos de bolor ainda dentro do prazo de validade limítrofe de 90 dias.

**Quadro 7** - Amostras de queijo Emmental que apresentaram bolor por tipo de embalagem, lote e dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	TEMPO DE PRATELEIRA
RESINA	2	45 DIAS
RESINA	3	45 DIAS
RESINA	2	90 DIAS
VÁCUO	3	90 DIAS
VÁCUO	5	90 DIAS
ATM	6	90 DIAS
VÁCUO	9	90 DIAS
ATM	1	120 DIAS
RESINA	2	120 DIAS
VÁCUO	4	120 DIAS
ATM	4	120 DIAS
VÁCUO	7	120 DIAS
ATM	10	120 DIAS
RESINA	1	150 DIAS
RESINA	2	150 DIAS
RESINA	3	150 DIAS
ATM	5	150 DIAS
VÁCUO	7	150 DIAS
ATM	2	180 DIAS
RESINA	2	180 DIAS
VÁCUO	7	180 DIAS

FONTE: Elaborado pela autora.

A ocorrência desses agentes é mais comum em alimentos com baixo percentual de água e/ou elevada porção de lipídeos como amêndoas e castanhas, entretanto pode acometer outros tipos de alimentos. Seu risco maior é devido a presença de micotoxinas que algumas espécies podem produzir, pois ao serem ingeridos, acumulam-se no organismo causando diversos transtornos que vão desde ataques hepáticos até alguns tipos de câncer (FIB, 2008).

Para realização da contagem de bolores e leveduras em um alimento, deve ser utilizada a IN-62 (BRASIL, 2003i), assim como a RDC nº07 de 18 de fevereiro de 2011 da ANVISA para análise apenas das micotoxinas presentes nos alimentos (BRASIL, 2011), entretanto, de acordo com a RDC nº12 de 2001, as análises para esses micro-organismos não são mais obrigatórias para queijos, apenas para doces, purês, massas e geleias não estéreis comercialmente, além da alimentação para imunossuprimidos e imunocomprometidos.

## 5.6 ANÁLISE SENSORIAL

A embalagem resinada nos 3 lotes analisados (lotes 8 e 9 com 90 dias e lote 4 com 120 dias) apresentou sabor alterado, amargo ao invés de levemente adocicado, e intenso provavelmente devido a contaminação por bolores, que ao chegarem ao laboratório não foram observados, mas estavam presentes no momento da análise sensorial.

As embalagens a vácuo e com atmosfera modificada dos mesmos lotes não apresentaram alteração de sabor e mantiveram sua consistência firme e maciez característica do queijo tipo Emmental, apesar dos lotes 4 com 120 dias nas embalagens a vácuo e atmosfera modificada e o lote 9 com 90 dias na embalagem a vácuo terem chegado ao laboratório já com pontos de bolor.

Do aspecto visual, o que se percebeu durante as análises foi que o queijo em embalagem resinada se tornou ressecado conforme o passar dos dias, tendo sempre que estar envolto em embalagens vedadas, pois do contrário, o corte se tornava muito difícil.

Já a embalagem de atmosfera modificada se mostrou muito úmida. Ao passar dos dias, tanto a embalagem quanto o queijo ficavam excessivamente úmidos, com aspecto diferenciado do início da produção.

A embalagem a vácuo apesar de deformar o produto, conseguiu manter as características visuais do mesmo e, com o passar dos dias, não apresentou ressecamento ou excesso de umidade visível como os demais.

## 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

### 5.7.1 Coliformes totais e termotolerantes

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem a vácuo: 3/60 (5%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem resinada: 2/60 (3,33%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem de ATM: 1/60 (1,67%).

Valor de P: 0,583

Interpretação: não houve diferença significativa entre as amostras positivas de queijo nas embalagens a vácuo, resinada e ATM.

#### 5.7.2 *Staphylococcus coagulase positiva*

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem a vácuo: 7/60 (11,67%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem resinada: 4/60 (6,67%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem de ATM: 6/60 (10%).

Valor de P: 0,635

Interpretação: não houve diferença significativa entre as amostras positivas de queijo nas embalagens a vácuo, resinada e ATM.

#### 5.7.3 *Salmonella spp.*

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem a vácuo: 0/60 (0%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem resinada: 0/60 (0%).

Proporção de amostras impróprias entre as amostras com embalagem de ATM: 0/60 (0%).

Valor de P: 1,000.

Interpretação: não houve diferença significativa entre as amostras positivas de queijo nas embalagens a vácuo, resinada e ATM.

A população deve ter acesso a produtos de qualidade, tanto em valores nutritivos quanto em condições higiênicas adequadas assegurando a saúde do consumidor (CORREIA; RONCADA, 1997), portanto são necessárias diversas medidas de segurança para fabricação dos alimentos como a RDC nº275 de 2002, que visa garantir essa qualidade em indústrias alimentares (BRASIL, 2002).

Como nenhuma das embalagens apresentou diferença significativa em relação aos micro-organismos pesquisados, não pôde ser avaliada qual embalagem seria mais adequada em relação à redução dos custos de produção, em decorrência do aumento da vida de prateleira.

São necessárias medidas mais rigorosas de fabricação para o aumento da vida de prateleira do queijo tipo Emmental, tanto do ponto de vista bacteriológico como micológico, pois a presença de bolores foi observada em amostras dos lotes a partir dos 45 dias de prateleira e nos três tipos de embalagens.

## 6 CONCLUSÕES

Após avaliação dos parâmetros estudados, pode-se concluir que:

- As amostras com coliformes totais e termotolerantes acima dos valores aceitáveis para consumo foram inferiores a 5%.
- *Staphylococcus* coagulase positiva foram os mais frequentemente encontrados com 9,44% (17 amostras).
- Ausência de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium* sulfito redutores em todas as amostras.
- Nenhuma das embalagens apresentou diferença significativa em relação aos micro-organismos pesquisados.
- Das três embalagens a que apresentou melhor aspecto visual após os 180 dias de prateleira foi a embalagem a vácuo.
- São necessárias medidas mais rigorosas de fabricação para o aumento da vida de prateleira do queijo tipo Emmental e conseqüente redução em seus custos de produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). **Pesquisa sobre consumo e hábitos de compras de queijos no Brasil**. 2013. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Resumo%20final%20pesquisa%20Intel%20Cheese%20Brazil%202013%20\\_1\\_.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Resumo%20final%20pesquisa%20Intel%20Cheese%20Brazil%202013%20_1_.pdf)>. Acesso em: 8 set. 2015.
- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). Produção nacional de queijos. In: **Evolução do mercado brasileiro de queijos de 2010 a 2014**. 2014. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Mercado\\_2010a2014.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Mercado_2010a2014.pdf)>. Acesso em: 14 set. 2015.
- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). **Importação de queijos**. 2015a. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos\\_Importacao.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos_Importacao.pdf)>. Acesso em: 14 set. 2015.
- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). **Exportação de queijos**. 2015b. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos\\_Exportacao.pdf](http://www.abiq.com.br/associados/mercado/Graficos_Exportacao.pdf)>. Acesso em: 14 set. 2015.
- Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ). Irã, Quênia e Brasil: três mercados a serem acompanhados no segmento do queijo. In: **Mercado internacional de lácteos**. 2015c. Disponível em: <[http://www.abiq.com.br/noticias\\_ler.asp?codigo=1648&codigo\\_categoria=6&codigo\\_subcategoria=5](http://www.abiq.com.br/noticias_ler.asp?codigo=1648&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=5)>. Acesso em: 14 set. 2015.
- Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). **Análise Sensorial – Vocabulário**. NBR ISO 5492:2014. 2014. Disponível em: <<http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=315357>>. Acesso em: 02. Abr. 2016.
- ALLERBERGER, F., WAGNER, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v.16, n.1, p.16-23, 2010.
- ANDRADE, C.C.P., MANDELLI, F., DELAMARE, A.P.L., ECHEVERRIGARAY, S. Estudo de bactérias lácticas na produção de queijo serrano. In: 58<sup>o</sup> Reunião Anual da SBPC, 2006, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: 2006. Disponível em: <[http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo\\_3563.html](http://www.sbpcnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_3563.html)>. Acesso em: 22 mar. 2016.
- ASSUMPÇÃO, E.G., PICOLLI-VALLE, R.H., HIRSCH, D., ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.55, n.3, p.366-370, 2003.
- BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, 2011.

BERNARDY, R., TOCHETTO, L.G., FONSECA, S.H., PIANTA, C. Isolamento e classificação de espécies de *Listeria* em queijo tipo colonial da região Centro-Serra do Estado do Rio Grande do Sul. **Veterinária em Foco**, Canoas, v.4, n.1, p.45-52, 2006.

BLAIS, B.W.; PHILLIPPE, L.M. Identification of presumptive positive *Listeria monocytogenes* from foods by the polymerase chain reaction. In: **Compendium of Analytical Methods**. v.3. Morin Heights: Polyscience Publications, 1995.

BOARI, C.A., PICCOLI-VALLE, R.H., NASCIMENTO, A.R., ALCÂNTARA, E.M.C. Ocorrência de cepas de estafilococos coagulase positiva formadoras de colônias atípicas em ágar Baird-Parker em queijos maturados. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.20, n.2, p.347-354, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Portaria nº146, de 07/03/1996 Anexo I – Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos**. 1996. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=4344>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº451, de 19/09/1997. **Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos**. 1997. Disponível em: <<http://www.ipef.br/legislacao/bdlegislacao/detalhes.asp?ld=9643>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº12, de 02/01/2001. **Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos**, 2001a. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC\\_12\\_2001.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 08 nov. 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº124, de 19/06/2001. **Regulamento Técnico sobre Preparados Formadores de Películas a base de Polímeros e/ou Resinas destinados ao revestimento de Alimentos**, 2001b. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f50a0e004d8b6bc5aa48ebc116238c3b/ALIMENTOS+RESOLU%C3%87%C3%83O+N%C2%BA+124%2C+DE+19+DE+JUNHO+DE+2001.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 24 set. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº275, de 21/10/2002. **Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de Verificação das Boas Práticas de Fabricação em Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos**, 2002. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/df7a900474576fa84cfd43fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+275,+DE+21+DE+OUTUBRO+DE+2002.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003**. 2003a. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo VI**. 2003b. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo III – Procedimentos básicos de contagem**. 2003c. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2400>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo V**. 2003d. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo IV – Procedimentos para contagem de colônias**. 2003e. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2401>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo XV**. 2003f. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo XIV**. 2003g. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo IV**. 2003h. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 11 nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 62, de 26/08/2003 Anexo I – Capítulo II**. 2003i. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=6078>>. Acesso em: 07 abr. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Brasília, ano 5, n.6, 2005. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim\\_eletronico\\_epi\\_ano05\\_n06.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano05_n06.pdf)>. Acesso em: 13 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa 68, de 12/12/2006 Anexo III – Características sensoriais e preparo de amostras**. 2006.

Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=12396>>. Acesso em: 23 set. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**, São Paulo, 2010.

Disponível em:

<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf)>. Acesso em: 08 mar. 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº07, de 18/02/2011. **Regulamento Técnico sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**, 2011. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-GGALI.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos**, São Paulo, 2014. Disponível em:

<[http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3\\_PAINEL\\_1\\_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto\\_2014\\_PDF.pdf](http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf)>. Acesso em: 12 set. 2015.

CARMOS, L.S.; DIAS, R.S.; ANUNCIACÃO, L.L.C.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State (Brazil). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.47, n.2, p.113-122, 1995.

CARVALHO, M.P.; VENTURINI, E.E.P.; GALAN, V.B. **As grandes oportunidades do mercado de queijos no Brasil**. Portal MilkPoint. Piracicaba, 2015. Disponível em:

<<http://www.milkpoint.com.br/industria/radar-tecnico/mercado/as-grandes-oportunidades-do-mercado-de-queijos-no-brasil-93301n.aspx>>. Acesso em: 22 set. 2015.

CASTRO, A.C.S.; PINTO JÚNIOR, W.R.; TAPIA, D.M.T.; CARDOSO, L.G.V. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo mussarela comercializados no CEASA de Vitória da Conquista – BA. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.23, n.3, p.407-413, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Protecting people from deadly *Listeria* food poisoning. In: **Recipe for Food Safety**. 2013. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/vitalsigns/listeria/>>. Acesso em: 9 set. 2015.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). ***Clostridium perfringens***. 2014.

Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/>>. Acesso em: 15 set. 2015.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). ***Salmonella***. 2015. Disponível em:

<<http://www.cdc.gov/foodsafety/clostridium-perfringens.html>>. Acesso em: 11 maio 2016.

Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (CEPEA-ESALQ). **Disputa acirrada por matéria-prima volta a elevar preço ao produtor**. São Paulo, 2011. Disponível em:

<<http://www.cepea.esalq.usp.br/leite/boletim/201.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2013.

CHOMCZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, Londres, v.15, n.3, p.532-534, 536-7, 1993.

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

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C.F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Identification of *Salmonella* spp. in isolates from chicken abattoirs by multiplex – PCR. **Research in Veterinary Science**, Philadelphia, v.81, n.3, p.340-344, 2006.

COSTA, A.P.R. **Caracterização molecular de cepas de *Listeria monocytogenes* isoladas de casos clínicos e alimentos no Brasil**. 2013. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v.2, n.1, p.105-114, 2007.

DELIZA, R., ROSENTHAL, A., SILVA, A.L.S. Consumer attitude towards information on non conventional technology. **Trends in Food Science & Technology**, Norwich, v.14, n.1-2, p.43-49, 2003.

DEN BAKKER, H.C.; WARCHOCKI, S.; WRIGHT, E.M.; ALLRED, A.F.; AHLSTROM, C.; MANUEL, C.S.; STASIEWICZ, M.J.; BURREL, A.; ROOF, S.; STRAWN, L.K.; FORTES, E.; NIGHTINGALE, K.K.; KEPHART, D.; WIEDMANN, M. Five new species of *Listeria* (*L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. 2 nov. *L. riparia* sp. nov., and *L. grandensis* sp. nov.) from agricultural and natural 3 environments in the United States. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v.64, p.1882-1889, 2014.

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

DOYLE, M.P. **Foodborne bacterial pathogens**. New York: Marcel Dekker, 1989. 797p. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=qbAguo2yYuAC&oi=fnd&pg=PR3&dq=FOODBORNE+bacterial+pathogens&ots=9-cqO5C34S&sig=RQlcqz\\_RjjCLp3q7KBDyLXg0gPI#v=onepage&q=100%20%C2%BAC&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=qbAguo2yYuAC&oi=fnd&pg=PR3&dq=FOODBORNE+bacterial+pathogens&ots=9-cqO5C34S&sig=RQlcqz_RjjCLp3q7KBDyLXg0gPI#v=onepage&q=100%20%C2%BAC&f=false)>. Acesso em: 30 mar. 2016.

DRUBI, A.J. **Estudo microbiológico de matérias-primas processadas de origem animal utilizadas na fabricação de alimentos na região de Ribeirão Preto/SP**. 2005. 33f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

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. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos

indicadores higiênico-sanitários em queijo de coalho produzido e comercializado no Estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.297-302, 2005.

DUARTE, T.S., BARBOSA, L.P.J.L., BARBOSA, F.H.F. Avaliação microbiológica para detecção de *Staphylococcus aureus* em quatro marcas de queijo tipo mussarela comercializadas no município de Luz, Minas Gerais. **Ciência Equatorial**, Macapá, v.1, n.1, p.65-73, 2011.

EILERT, S.J. New packaging technologies for the 21<sup>st</sup> century. **Meat Science**, Philadelphia, v.71, n.1, p.122-127, 2005.

ETGES, J.C. **Qualidade microbiológica e físico-química de queijo mussarela fatiado à granel e embalado a vácuo**. 2011. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2011.

ETIEL. Equipamentos para Queijos Artesanais. **Impermeabilização da casca do queijo**. 2014. Disponível em: <<http://www.etiel.net/#!impermeabilizacao-da-casca/c60a>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

FAGNANI, R., BATTAGLINI, A.P.P., BELOTI, V., DUNGA, K.S. Pontos de contaminação microbiológica em indústrias de queijo muçarela. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.35, n.3, p.217-223, 2013.

Food and Agriculture Organization (FAO). **Surge in diseases of animal origin necessitates new approach to health - report**. 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/news/story/pt/item/210621/icode/>>. Acesso em: 02 mar. 2016.

FERREIRA, G.B.; OLIVEIRA, A.C.S.; 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.

Food Ingredients Brasil (FIB). Segurança Alimentar. **Revista FIB**, n.4. 2008. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/54.pdf>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

FOEGEDING, E.A., BROWN, J., DRAKE, M., DAUBERT, C.R. Sensory and mechanical aspects of cheese texture. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.13, n.8, p.585-591, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

FRIEDMANN, H.C. Escherich and *Escherichia*. **Advances in Applied Microbiology**, New Jersey, v.60, p.133-196, 2006.

FURTADO, M.M. O estufamento tardio dos queijos: características e prevenção, uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.40, n.242, p.3-39, 1985.

FURTADO, M.M.; LOURENÇO NETO, J.P.M. Tecnologia de queijos. In: **Manual técnico para produção industrial de queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GERMANO, P.M.L. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.7, n.27, p.6-11, 1993.

GONZÁLEZ, E.R., SALAS, L.C., PHILLIPS, G.C. *Listeria monocytogenes* en queso Amarillo madurado tipo Edam y su resistência al pH y salinidad. **Nova – Publicación Científica em Ciencias Biomédicas**, Bogotá, v.7, n.11, p.71-79, 2009.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v.161, n.1, p.26-29, 2010.

GUIMARÃES, T.F.; CARVALHO, G.R.; CARNEIRO, A.V.; DUARTE, M.M. Exportações Mundiais de Queijos: 2003 a 2007. In: X MINAS LEITE. SUSTENTABILIDADE DA PRODUÇÃO DE LEITE NA AGRICULTURA FAMILIAR, 2008, Juiz de Fora. **Anais**. Juiz de Fora: 2008.

HINTLIAN, C.B.; HOTCHKISS, J.H. The safety of modified atmosphere packaging, a review. **Food technology**, Chicago, v.40, p.70-76, 1986.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.

HUNT, J. **Produção de queijo sofre desafios na Suíça**. Swissinfo. Berna, 2012. Disponível em:  
<[http://www.swissinfo.ch/por/economia/Producao\\_de\\_queijo\\_sofre\\_desafios\\_na\\_Suica.html?cid=33444664](http://www.swissinfo.ch/por/economia/Producao_de_queijo_sofre_desafios_na_Suica.html?cid=33444664)>. Acesso em: 10 nov. 2013.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

KONEMAN, E.; WINN JUNIOR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565p.

LACONHA, I.; BAGESSEN, D.L.; REMENTERIA, A.; GARAIJAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.75, n.2, p.155-165, 2000.

LIMA, A.F. **Staphylococcus coagulase positiva e enterotoxinas em queijo de coalho**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LIMA, A.C.M., TOUBAS, L.C., PEREIRA, A.N., SILVA, G.B.H.C., TORRES, I.M.S., ALVES, V.F. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em queijo muçarela fatiado comercializado em

estabelecimentos varejistas na cidade de Goiânia-GO. **Electronic Journal of Pharmacy**, Goiânia, v.12, n.4, p.87-92, 2015.

LOPALCO, P.L.; GERMINARIO, C.; DI MARTINO, V.; FRISOLI, L.; PAGANO, A.; QUARTO, M.; BARBUTI, S. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella enteritidis* epidemic. **Annali di Igiene**, Roma, v.12, n.4, p.279-285, 2000.

LOSITO, F.; ARIENZO, A.; BOTTINI, G.; PRIOLISI, F.R.; MARI, A.; ANTONINI, G. Microbiological safety and quality of Mozzarella cheese assessed by the microbiological survey method. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.97, p.46-55, 2013.

LUCAS, S.D.M., SCALCO, A., FELDHAUS, S., DRUNKLER, D.A., COLLA, E. Padrão de identidade e qualidade de queijos colonial e prato, comercializados na cidade de Medianeira-PR. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.67, n.386, p.38-44, 2012.

LUNA, R. O., NASCIMENTO, D.L., CAVALCANTI, T.B., CONSERVA, J.C., LIRA, L.B., MENDES, E.S. **Coliformes em queijo tipo mussarela fatiado comercializado em supermercados do distrito sanitário IV do Recife-PE**. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1386-1.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

MAGALHÃES, F.A.R.; COSTA JÚNIOR, L.C.G.; COSTA, R.G.B., PEREIRA, D.A.; SAITO, M.M. Avaliação da viabilidade técnica do emprego de resina para tratamento da casca de queijos artesanais da canastra. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.64, n.370, p.39-43, 2009.

MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; SANTOS, E.B.; GOUVÊA, R. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.180-192, 2007.

MANTILLA, S.P.S.; MANO, S.B.; VITAL, H.C.; FRANCO, R. M. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias e Ambientais**, Paraná, v.8, n.4, p.437-448, 2010.

MARINHEIRO, M.F., GHIZZI, L.G., CERESER, N.D., LIMA, H.G., TIMM, C.D. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.36, n.3, p.1329-1334, 2015.

MARQUES, J.M.C. **Avaliação da qualidade microbiológica de leite pasteurizado como matéria-prima e de queijo flamengo como produto final**. Universidade de Porto. Porto, 1997. Disponível em: <[https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/64251/4/67533\\_97-25T\\_TL\\_01\\_C.pdf](https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/64251/4/67533_97-25T_TL_01_C.pdf)>. Acesso em: 07 abr. 2016.

MARTINS, P.C. **O Futuro é leite em excesso**. Portal MilkPoint. Piracicaba, 2007. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/?noticialID=33524&actA=7&areaID=50&secaoID=120>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

MASSOLI, M.C.B. **Prevalência de clostrídios sulfito redutores e *Clostridium perfringens* na mucosa intestinal de frangos de corte**. 2014. 59 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

MENEZES, L.A.A., FUZINATTO, M.M., STEFANONI, F., LIMA, E., LIMA, D.P. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em quatro variedades de queijos produzidos em um laticínio na região noroeste do Paraná. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, Campo Mourão, v.2, n.1, p.66-68, 2011.

MESQUITA, A.J.; OLIVEIRA, A.N.; BORGES, G.T.; NICOLAU, E.S.; SOUZA, A.A.G.D. Estudo quali-quantitativo da microbiota anaeróbica em amostras de queijos provolone, parmesão e prato. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.2, n.1, p.27-34, 2001.

MEYER-BROSETA, S.; DIOT, A.; BASTIAN, S.; RIVIÈRE, J.; CERF, O. Estimation of low bacterial concentration: *Listeria monocytogenes* in raw milk. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v.80, n.1, p.1-15, 2003.

MOTTA, M.R.A.; BELMONT, M.A. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializadas em supermercados da região Oeste de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.78-79, p.59-62, 2000.

NASCIMENTO, D.L., LUNA, R.O., CONSERVA, J.C., CAVALCANTI, T.B., LIRA, L.B.L., FAGUNDES, R.H.S., CARVALHO NETO, P.M., MENDES, E.S. ***Staphylococcus spp.* em queijo tipo mussarela fatiado comercializado em supermercados do distrito sanitário IV do Recife-PE**. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1494-1.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

NORMANO, G.; FIRINU, A.; VIRGILIO, S. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketes in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Philadelphia, v.98, n.1, p.73-79, 2005.

OKURA, M.H.; ARAÚJO, P.F.; JARDIM, F.B.B.; SILVA, R.R.; FINZER, J.R.D. Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo minas frescal. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.143, p.84-91, 2006.

OLIVEIRA, A.B.A., PAULA, C.M.D., CAPALONGA, R., CARDOSO, M.R.I., TONDO, E.C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v.30, n.3, p.279-285, 2010.

OLIVEIRA, A.P., SOUZA, G.G., TRENHAGO, G., OLIVEIRA, J., RODRIGUES, L.B., NUNES, E.A.F. Avaliação microbiológica de queijos tipo prato e mussarela provenientes do sul do Brasil. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.25, n.194-195, 2011.

OLIVEIRA, A.P.; SOLA, M.C.; FEISTEL, J.C.; MOREIRA, N.M.; OLIVEIRA, J.J. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.9, n.16, p.1947-1972, 2013.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Zoonoses and veterinary public health. Fact sheets**. Programmes and projects, 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/entity/en/>>. Acesso em: 13 nov. 2013.

Organização Mundial da Saúde (OMS). **Food safety**. 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/en/>>. Acesso em: 10 set. 2015.

OTUKI, A.K. **Avaliação da diversidade genética e potencial toxigênico de cepas de *Clostridium perfringens* isoladas de alimentos, solo e animais**. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos – Área de Bromatologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PARK, S.I.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M. D. Risk factors for *L.monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicine**, Philadelphia, v.53, n.1-2, p.55-65, 2002.

PARRY, R.T. **Envasado de los alimentos en atmósfera modificada**. 1. ed. Madrid: A. Madrid Vicente, 1995. 350p.

PAULA J.C.J.; CARVALHO A.F.; ALMEIDA F.A.; COSTA R.G.B.; SOBRAL D. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e seus efeitos tecnológicos no leite e em produtos lácteos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.67, n.384, p.11-21, 2012.

PEIXOTO, D.; WECKWERH, P.H.; SIMIONATO, E.M.R.S. Avaliação da qualidade microbiológica de produtos de confeitaria comercializados na cidade de Ribeirão Preto/SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.20, n.4, p.611-615, 2009.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.2, p.293-300, 2004.

PIANTA, C., OLIVEIRA, S.J., FALLAVENA, L.C.B., ESMERALDINO, A.T. Presença de *Listeria sp.* em queijo tipo colonial no Brasil: risco potencial para a saúde pública. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.7, n.1, p.85-90, 2008.

PICOLI, S.U.; BESSA, M.C.; CASTAGNA, S.M.F.; GOTTARDI, C.P.T.; SCHMIDT, V.; CARDOSO, M. Quantificação de coliformes, *Staphylococcus aureus* e mesófilos presentes em diferentes etapas da produção de queijo fresco de leite de cabra em laticínios. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v.1, n.26, p.64-69, 2006.

PIETROWSKI, G.A.M.; RANTHUM, M.; CROZETA, T.; JONGE, V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo tipo mussarela comercializado na cidade de Ponta Grossa, Paraná. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.2, n.2, p.25-31, 2008.

PINHEIRO, C.; MACHADO, G.; BETTENCOURT, C.; MATOS, C. Avaliação sensorial do queijo: definição dos atributos de qualidade. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v.30, n.1, p.350-357, 2007.

PINTO, M.S., FERREIRA, C.L.L.F., MARTINS, J.M., TEODORO, V.A.M., PIRES, A.C.S., FONTES, L.B.A., VARGAS, P.I.R. Segurança alimentar do queijo minas artesanal do Serro,

Minas Gerais, em função da adoção de boas práticas de fabricação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v.39, n.4, p.342-347, 2009.

PIRES, P.S.; SILVA, R.O.S.; LOBATO, F.C.F. Clostridiose alimentar (*C. perfringens*). In: **Manual de zoonoses**, v.2, 1ed., p.18-24, 2011. Disponível em: <[http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos\\_1330091770/2061\\_manual\\_de\\_zoonoses\\_02\\_01.pdf](http://www.zoonoses.org.br/absoluto/midia/imagens/zoonoses/arquivos_1330091770/2061_manual_de_zoonoses_02_01.pdf)>. Acesso em: 13 set. 2015.

PUAH, S.M., CHUA, K.H., TAN, J.A.M.A. Virulence factors and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates in ready-to-eat foods: detection of *S. aureus* contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v.13, n.199, article number.19, 2016.

QUINTANA, R.C., CARNEIRO, L.C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos queijos minas frescal e mussarela produzidos na cidade de Morrinhos-GO. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v.8, n.3, p.205-211, 2007.

RADDI, M.S.G., LEITE, C.Q.F., MENDONÇA, C.P. *Staphylococcus aureus*: portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.1, p.36-40, 1988.

RITTER, R., SANTOS, D., BERGMANN, G.P. Análise da qualidade microbiológica de queijo colonial, não pasteurizado, produzido e comercializado por pequenos produtores, no Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.15, n.87, p.51-55, 2001.

ROBLES, S.; RODRÍGUEZ, J.M.; GRANADOS, I.; GUERRERO, M.C. Sulfite-reducing clostridia in the sediment of a high mountain lake (Laguna Grande, Gredos, Spain) as indicators of fecal pollution. **International Microbiology**, Barcelona, v.3, n.3, p.187-191, 2000.

RODRIGUES, J., FARIAS, H.L.F., BARBOSA, B.F.F., GARCIA, T.A., ISSY, P.N., ARMONDES, M.P.O. Levantamento das características físico-químicas e microbiológicas de queijo minas frescal e mussarela produzidos no entorno de Goiânia-GO. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.9, supl.1, p.30-34, 2011.

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

SALOTTI, B.M., CARVALHO, A.C.F.B., AMARAL, L.A., VIDAL-MARTINS, A.M.C., CORTEZ, A.L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, 2006.

SALVADOR, M.; CAMASSOLA, M.; MOSCHEN, E.S.; ZANROSSO, A.V. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo prato e parmesão ralado. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.19, n.1, p.65-74, 2001.

SANTANA, E.H.W.; BELOTI, V.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; MENDONÇA, M.B.O.C. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.3, p.545-554, 2010.

SANTOS-KOELLN, F.T.; 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.3, n.2, 2009.

SARANTOPOULOS, C.I.G.L.; ALVES, R.M.V.; MORI, E.E.M. Efeitos da embalagem com atmosfera modificada na preservação de queijo parmesão ralado. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.67-79, 1995.

SENYK, G.F.; SCHEIB, J.A.; BROWN, J.M.; LEDFORD, R.A. Evaluation of methods for determination of spore-formers responsible for the late gas-blowing defect in cheese. **Journal of Dairy Science**, Philadelphia, v.72, n.2, p.360-366, 1989.

SHELOBOLINA, E.S., SULLIVAN, S.A., O'NEILL, K.R., NEVIN, K.P., LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.5, p.2959-2965, 2004.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.13, n.5, p.1675-1683, 2008.

SIEGEL, S.; CASTELLAN JÚNIOR, N.J. **Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 448p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, I.M.M.; ALMEIDA, R.C.C.; ALMEIDA, P.F.; FONSECA, V.M. Presença de *Listeria* spp. no processamento de queijo minas frescal em um laticínio da Bahia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1999, Salvador. **Anais**. Salvador: 1999. p.369.

SILVA, L.A.V. ***Staphylococcus coagulase positiva em queijo minas frescal***. 2008. 51f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

SILVA, A.S., ARAGON, C.C., SANTANA, E.H.W., DESTRO, M.T., COSTA, M.R., ALEGRO, L.C.A. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: uma revisão. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.13, n.1, p.59-67, 2011.

SILVA, C.S.A. **Avaliação microbiológica de enchidos de ovino e caprino**. 2012. 38f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Escola Superior Agrária de Bragança, Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, 2012.

SILVA, G.O. **Estudo genotípico e fenotípico de estafilococos coagulase positiva potencialmente enterotoxigênicos isolados de linhas de produção de queijo minas frescal no Estado de São Paulo**. 2013. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVA, G.B.H.C., CHAUL, L.T., PEREIRA, A.N., GARCIA, T.A., TORRES, I.M.S., ALVES, V.F. Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus* coagulase-positivos em queijo muçarela fatiado adquirido em padarias e supermercados de Goiânia-GO. **Revista de Biotecnologia & Ciência**, Anápolis, v.4, n.1, 2015.

SMITH, J.P.; RAMASWAMY, H.S.; SIMPSON, B.K. Developments in food packaging technology. Part II. Storage aspects. **Trends in Food Science and Technology**, Philadelphia, v.1, p.111-118, 1990.

SOUSA, C.P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista APS**, Juiz de Fora, v.9, n.1, p.83-88, 2006.

TAVARES, L.B.B., GARCIA, J.A. Ocorrência de coliformes fecais e *Escherichia coli* em queijo colonial comercializado no município de Blumenau, Estado de Santa Catarina. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v.11, n.2, p.139-146, 1993.

TEIXEIRA, L.V. Análise sensorial na indústria de alimentos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.64, n.366, p.12-21, 2009.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.14, n.3, p.584-640, 2001.

VIEITES, R.S.D. **Boas práticas de fabricação (BPF), análise de tomate e água em restaurantes da cidade de Botucatu-SP**. 2013. 78f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2013.

VON SYDOW, A.C.M.G. **Avaliação da ocorrência de fatores de virulência em estirpes de *Escherichia coli* em fezes de cães errantes**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

WEGENER, H.C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY E CONTROL OF *Salmonella* IN PORK, 2., 1997, Copenhagen, Dinamarca. **Proceedings**. Copenhagen: 1997. p.3-8.

WIENEKE, A.A., ROBERTS, D., GILBERT, R.J. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-90. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v.110, n.3, p.519-531, 1993.

WILKINSON, J.; MIRA, E.C.; MASCARENHAS, G.C.C.; PEREIRA, P.R.F.; FUNCKE, A.; PIGATTO, G.; MORAIS, E.; BELIK, W.; LIMA, L.C.O. Perspectivas do investimento em agronegócio. In: **Perspectivas do investimento no Brasil**. Rio de Janeiro, 2009. Disponível em:

<[http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes\\_pt/Galerias/Arquivos/empresa/pesquisa/pib/pib\\_agronegocio.pdf](http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/empresa/pesquisa/pib/pib_agronegocio.pdf)>. Acesso em: 10 nov. 2013.

YAMAGUCHI, M.U., ZANQUETA, E.B., MOARAI, J.F., FRAUSTO, H.S.E.G., SILVÉRIO, K.I. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: pesquisa *Salmonella* e *Listeria*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, Maringá, v.6, n.3, p.417-434, 2013.

## APÊNDICES

**Apêndice A** - Resultado de coliformes totais e termotolerantes pelo método do NMP/g, nos 3 tipos de embalagem (vácuo, resina e atmosfera modificada), nos diferentes lotes e dias avaliados

Lote 1 ao 10 com 0 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
VÁCUO	1	0 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	1	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	0 DIAS	93 NMP/g	7,4 NMP/g
VÁCUO	2	0 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	2	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	3	0 DIAS	9,2 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	3	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	3	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	4	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	4	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	4	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	5	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	5	0 DIAS	93 NMP/g	7,4 NMP/g
ATM	5	0 DIAS	28 NMP/g	7,4 NMP/g
VÁCUO	6	0 DIAS	3,6 NMP/g	9,2 NMP/g
RESINA	6	0 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	6	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	7	0 DIAS	9,2 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	7	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	7	0 DIAS	3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	8	0 DIAS	240 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	8	0 DIAS	9,2 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	8	0 DIAS	43 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	9	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	9	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	9	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	10	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	10	0 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	10	0 DIAS	15 NMP/g	<3,0 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

## Continuação Apêndice A - Lote 1 ao 10 com 45 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
VÁCUO	1	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	1	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	2	45 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	2	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	45 DIAS	15 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	3	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	3	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	3	45 DIAS	9,2 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	4	45 DIAS	>1100 NMP/g	11 NMP/g
RESINA	4	45 DIAS	23 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	4	45 DIAS	43 NMP/g	3,0 NMP/g
VÁCUO	5	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	5	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	5	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	6	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	6	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	6	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	7	45 DIAS	>1100 NMP/g	1100 NMP/g
RESINA	7	45 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	7	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	8	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	8	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	8	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	9	45 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	9	45 DIAS	<3,0 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	9	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	10	45 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	10	45 DIAS	15 NMP/g	9,2 NMP/g
ATM	10	45 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA.

## Continuação Apêndice A - Lote 1 ao 10 com 90 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
VÁCUO	1	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	1	90 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	2	90 DIAS	9,2 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	2	90 DIAS	3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	90 DIAS	<3,0 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	3	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	3	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	3	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	4	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	4	90 DIAS	9,2 NMP/g	21 NMP/g
ATM	4	90 DIAS	15 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	5	90 DIAS	3,6 NMP/g	23 NMP/g
RESINA	5	90 DIAS	<3,0 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	5	90 DIAS	<3,0 NMP/g	93 NMP/g
VÁCUO	6	90 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	6	90 DIAS	3,6 NMP/g	9,2 NMP/g
ATM	6	90 DIAS	9,2 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	7	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	7	90 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	7	90 DIAS	<3,0 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	8	90 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	8	90 DIAS	21 NMP/g	7,4 NMP/g
ATM	8	90 DIAS	9,2 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	9	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	9	90 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	9	90 DIAS	23 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	10	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	10	90 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	10	90 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

## Continuação Apêndice A - Lote 1 ao 10 com 120 dias de prateleira

<b>EMBALAGEM</b>	<b>LOTE</b>	<b>DIAS</b>	<b>Coliformes Totais</b>	<b>Coliformes Termotolerantes</b>
VÁCUO	1	120 DIAS	3,6 NMP/g	9,2 NMP/g
RESINA	1	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	120 DIAS	3,6 NMP/g	93 NMP/g
VÁCUO	2	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	2	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	120 DIAS	7,4 NMP/g	7,4 NMP/g
VÁCUO	3	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	3	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	3	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	4	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	4	120 DIAS	9,2 NMP/g	9,2 NMP/g
ATM	4	120 DIAS	9,2 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	5	120 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	5	120 DIAS	43 NMP/g	23 NMP/g
ATM	5	120 DIAS	7,4 NMP/g	3,0 NMP/g
VÁCUO	6	120 DIAS	23 NMP/g	23 NMP/g
RESINA	6	120 DIAS	15 NMP/g	15 NMP/g
ATM	6	120 DIAS	240 NMP/g	240 NMP/g
VÁCUO	7	120 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	7	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	7	120 DIAS	240 NMP/g	93 NMP/g
VÁCUO	8	120 DIAS	150 NMP/g	43 NMP/g
RESINA	8	120 DIAS	43 NMP/g	43 NMP/g
ATM	8	120 DIAS	9,2 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	9	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	9	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	9	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	10	120 DIAS	23 NMP/g	23 NMP/g
RESINA	10	120 DIAS	23 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	10	120 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

## Continuação Apêndice A - Lote 1 ao 10 com 150 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
VÁCUO	1	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	1	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	150 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	2	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	2	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	150 DIAS	23 NMP/g	9,2 NMP/g
VÁCUO	3	150 DIAS	23 NMP/g	3,6 NMP/g
RESINA	3	150 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
ATM	3	150 DIAS	93 NMP/g	43 NMP/g
VÁCUO	4	150 DIAS	150 NMP/g	9,2 NMP/g
RESINA	4	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	4	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	5	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	5	150 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	5	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	6	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	6	150 DIAS	7,4 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	6	150 DIAS	43 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	7	150 DIAS	93 NMP/g	93 NMP/g
RESINA	7	150 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	7	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	8	150 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	8	150 DIAS	43 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	8	150 DIAS	150 NMP/g	150 NMP/g
VÁCUO	9	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	9	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	9	150 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	10	150 DIAS	21 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	10	150 DIAS	>1100 NMP/g	6,1 NMP/g
ATM	10	150 DIAS	240 NMP/g	9,4 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA.

## Continuação Apêndice A - Lote 1 ao 10 com 180 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
VÁCUO	1	180 DIAS	23 NMP/g	23 NMP/g
RESINA	1	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	1	180 DIAS	3,6 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	2	180 DIAS	240 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	2	180 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	2	180 DIAS	15 NMP/g	3,0 NMP/g
VÁCUO	3	180 DIAS	43 NMP/g	3,0 NMP/g
RESINA	3	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	3	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	4	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	4	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	4	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	5	180 DIAS	9,2 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	5	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	5	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	6	180 DIAS	460 NMP/g	36 NMP/g
RESINA	6	180 DIAS	460 NMP/g	29 NMP/g
ATM	6	180 DIAS	23 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	7	180 DIAS	240 NMP/g	6,2 NMP/g
RESINA	7	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
ATM	7	180 DIAS	>1100 NMP/g	<3,0 NMP/g
VÁCUO	8	180 DIAS	460 NMP/g	93 NMP/g
RESINA	8	180 DIAS	240 NMP/g	3,0 NMP/g
ATM	8	180 DIAS	460 NMP/g	7,4 NMP/g
VÁCUO	9	180 DIAS	>1100 NMP/g	3,0 NMP/g
RESINA	9	180 DIAS	1100 NMP/g	23 NMP/g
ATM	9	180 DIAS	23 NMP/g	3,6 NMP/g
VÁCUO	10	180 DIAS	<3,0 NMP/g	<3,0 NMP/g
RESINA	10	180 DIAS	43 NMP/g	9,2 NMP/g
ATM	10	180 DIAS	3,6 NMP/g	<3,0 NMP/g

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA.

**Apêndice B** - Resultado das análises microbiológicas para *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* sulfito redutores e aspecto visual de bolores

Lote 1 ao 10 com 0 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	0 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	0 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	1	0 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	2	0 DIAS	7,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	0 DIAS	3,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	2	0 DIAS	2,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	3	0 DIAS	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	3	0 DIAS	1,1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	3	0 DIAS	9,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	0 DIAS	9,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	4	0 DIAS	2,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	0 DIAS	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	5	0 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	5	0 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	0 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	6	0 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	0 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	0 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	7	0 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	7	0 DIAS	1,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	0 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	0 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	0 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	0 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	0 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	9	0 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	0 DIAS	1,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	0 DIAS	3,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	0 DIAS	6,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	0 DIAS	1,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA.  
**S.A.:** Sem alteração.

## Continuação Apêndice B - Lote 1 ao 10 com 45 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	45 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	45 DIAS	3,9 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	1	45 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	2	45 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	45 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	2	45 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	3	45 DIAS	1,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	3	45 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	3	45 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	45 DIAS	5,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	4	45 DIAS	3,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	45 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	5	45 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	5	45 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	45 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	6	45 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	45 DIAS	8,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	45 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	7	45 DIAS	1,4 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	7	45 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	45 DIAS	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	45 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	45 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	45 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	45 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	9	45 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	45 DIAS	1,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	45 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	45 DIAS	4,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	45 DIAS	3,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** indicação visual de bolores.  
**S.A.:** Sem alteração.

## Continuação Apêndice B - Lote 1 ao 10 com 90 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	90 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	90 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	1	90 DIAS	6,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	2	90 DIAS	5,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	90 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	2	90 DIAS	1,8 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	3	90 DIAS	1,3 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	3	90 DIAS	5,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	3	90 DIAS	1,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	90 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	4	90 DIAS	2,6 x 10 <sup>4</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	90 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	5	90 DIAS	2,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	5	90 DIAS	1,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	90 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	6	90 DIAS	2,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	90 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	90 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
VÁCUO	7	90 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	7	90 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	90 DIAS	1,7 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	90 DIAS	2,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	90 DIAS	1,7 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	90 DIAS	7,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	90 DIAS	1,3 x 10 <sup>5</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	9	90 DIAS	8,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	90 DIAS	8,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	90 DIAS	7,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	90 DIAS	6,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	90 DIAS	2,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA e indicação visual de bolores.

**S.A.:** Sem alteração.

## Continuação Apêndice B - Lote 1 ao 10 com 120 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	120 DIAS	2,5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	120 DIAS	2,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	1	120 DIAS	1,0 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
VÁCUO	2	120 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	120 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	2	120 DIAS	9,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	3	120 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	3	120 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	3	120 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	120 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	4	120 DIAS	1,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	120 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
VÁCUO	5	120 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	5	120 DIAS	5,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	120 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	6	120 DIAS	1,3 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	120 DIAS	6,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	120 DIAS	3,8 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	7	120 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	7	120 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	120 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	120 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	120 DIAS	2,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	120 DIAS	1,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	120 DIAS	3,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	9	120 DIAS	1,0 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	120 DIAS	1,2 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	120 DIAS	1,9 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	120 DIAS	2,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	120 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA e indicação visual de bolores.

**S.A.:** Sem alteração.

## Continuação Apêndice B - Lote 1 ao 10 com 150 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	150 DIAS	1,7 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	150 DIAS	4,9 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	1	150 DIAS	2,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	2	150 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	150 DIAS	6,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	2	150 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	3	150 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	3	150 DIAS	2,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	3	150 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	150 DIAS	2,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	4	150 DIAS	3,7 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	150 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	5	150 DIAS	3,0 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	5	150 DIAS	3,2 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	150 DIAS	5,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
VÁCUO	6	150 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	150 DIAS	1,1 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	150 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	7	150 DIAS	8,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	7	150 DIAS	2,4 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	150 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	150 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	150 DIAS	5,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	150 DIAS	1,4 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	150 DIAS	3,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	9	150 DIAS	2,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	150 DIAS	2,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	150 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	150 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	150 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA e indicação visual de bolores.

**S.A.:** Sem alteração.

## Continuação Apêndice B - Lote 1 ao 10 com 180 dias de prateleira

EMBALAGEM	LOTE	DIAS	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva	<i>Salmonella</i> spp. (25g)	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> (25g)	<i>Clostridium</i> Sulfito Redutores (25g)	BOLORES (ASPECTO VISUAL)
VÁCUO	1	180 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	1	180 DIAS	2,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	1	180 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	2	180 DIAS	4,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	2	180 DIAS	2,3 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
ATM	2	180 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
VÁCUO	3	180 DIAS	7,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	3	180 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	3	180 DIAS	9,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	4	180 DIAS	6,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	4	180 DIAS	1,1 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	4	180 DIAS	9,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	5	180 DIAS	6,0 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	5	180 DIAS	1,2 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	5	180 DIAS	1,6 x 10 <sup>3</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	6	180 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	6	180 DIAS	5,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	6	180 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	7	180 DIAS	1,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	Alterado
RESINA	7	180 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	7	180 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	8	180 DIAS	2,6 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	8	180 DIAS	1,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	8	180 DIAS	4,8 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	9	180 DIAS	3,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	9	180 DIAS	1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	9	180 DIAS	2,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
VÁCUO	10	180 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
RESINA	10	180 DIAS	1,8 x 10 <sup>2</sup> UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.
ATM	10	180 DIAS	<1,0 x 10 UFC/g est.	Ausência	Ausência	Ausência	S.A.

FONTE: Elaborado pela autora.

**Preenchimento em vermelho:** amostras acima dos limites aceitáveis pela ANVISA e indicação visual de bolores.

**S.A.:** Sem alteração.

## ANEXOS

## Anexo A - Interpretação de Números Mais Prováveis (NMP/g ou mL) para coliformes totais e termotolerantes

Número de Tubos Positivos			NMP/g ou mL	Intervalo Confiança (95%)	
0,1	0,01	0,001		Inferior	Superior
0	0	0	<3,0	.-	9,5
0	0	1	3,0	0,15	9,6
0	1	0	3,0	0,15	11
0	1	1	6,1	1,2	18
0	2	0	6,2	1,2	18
0	3	0	9,4	3,6	38
1	0	0	3,6	0,17	18
1	0	1	7,2	1,3	18
1	0	2	11	3,6	38
1	1	0	7,4	1,3	20
1	1	1	11	3,6	38
1	2	0	11	3,6	42
1	2	1	15	4,5	42
1	3	0	16	4,5	42
2	0	0	9,2	1,4	38
2	0	1	14	3,6	42
2	0	2	20	4,5	42
2	1	0	15	3,7	42
2	1	1	20	4,5	42
2	1	2	27	8,7	94
2	2	0	21	4,5	42
2	2	1	28	8,7	94
2	2	2	35	8,7	94
2	3	0	29	8,7	94
2	3	1	36	8,7	94
3	0	0	23	4,6	94
3	0	1	38	8,7	110
3	0	2	64	17	180
3	1	0	43	9	180
3	1	1	75	17	200
3	1	2	120	37	420
3	1	3	160	40	420
3	2	0	93	18	420
3	2	1	150	37	420
3	2	2	210	40	430
3	2	3	290	90	1000
3	3	0	240	42	1000
3	3	1	460	90	2000
3	3	2	1100	180	4100
3	3	3	>1100	420	.-

FONTE: Instrução normativa 62 de 26/08/2003 (BRASIL, 2003c).



SECRETARIA DE  
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE  
**SÃO PAULO**  
TRABALHANDO POR VOCÊ