

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
ACÁCIO FREIRE BASTOS

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS MINAS ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE FORMIGA - MG

FORMIGA – MG
2019

ACÁCIO FREIRE BASTOS

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS MINAS ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE FORMIGA - MG

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Medicina
Veterinária do Centro Universitário de
Formiga – UNIFOR-MG como requisito
parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Borges
Acurcio

FORMIGA – MG

2019

Acácio Freire Bastos

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS MINAS ARTESANAIS
COMERCIALIZADOS NO MUNICÍPIO DE FORMIGA - MG

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Formiga – UNIFOR-MG como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Borges Acurcio
Orientador

Prof^a. Ms. Priscila Mara Rodarte Lima e Pieroni
UNIFOR-MG

Prof^a. Ms. Fernanda Pinheiro Lima
UNIFOR-MG

Formiga, 11 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade concedida de cursar Medicina Veterinária.

À minha família pelo apoio e incentivos diários – em especial minha mãe Maysa Bastos Freire, meu pai Marcos Freire Bastos e meu irmão Kaíque Freire Bastos.

Ao meu orientador Leonardo Borges Acurcio, pela disposição em ajudar, pelo carinho ao sanar dúvidas e por ter acreditado em meu trabalho, mesmo quando tudo parecia perdido.

Agradeço também aos meus professores do curso de Medicina Veterinária, por todo conhecimento passado, bem como aos meus colegas de curso, que torceram por mim durante esta jornada e me ajudaram quando eu mais precisei.

E em especial à minha namorada Luiza Camattari Resende, que foi um alicerce até aqui – oferecendo amor, atenção, carinho e companheirismo.

Muito obrigado!

RESUMO

A região de Minas Gerais se destaca como a principal produtora de queijos artesanais no Brasil, sendo que, neste estado, a maioria da produção queijeira é do queijo tipo Minas Artesanal, que é produzido a partir do leite cru de vacas, sendo seu modo de produção registrado como patrimônio imaterial pelo IPHAN. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de bactérias *Staphylococcus* spp. em queijos Minas Artesanais comercializados no município de Formiga-MG. A legislação vigente preconiza a contagem máxima de 1.000 UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positivo, para queijos de média umidade. Não há uma legislação que pode fornecer diretrizes sobre a contagem máxima de *Staphylococcus* spp. no queijo Minas Artesanal. Com base nos resultados obtidos por esta pesquisa, foi constatado que, das três amostras utilizadas, nenhuma estava apta para o consumo, sugerindo presença de *Staphylococcus aureus* acima do limite permitido por lei, além de altas contagens de *Staphylococcus* spp. nas amostras.

Palavras-chave: Serra da Canastra; *Staphylococcus aureus*; Queijos maturados.

ABSTRACT

The region of Minas Gerais stands out as the main producer of artisanal cheeses in Brazil, being a largest producer of artisanal cheeses, being produced from the raw milk of cows, being its mode of production registered by IPHAN. The objective of this work is to investigate the presence of *Staphylococcus* spp. in Minas Gerais' artisanal cheeses sold in the city of Formiga-MG. Legislation recommends the maximum number of 1,000 CFU / mL of *Staphylococcus* coagulase positive per grams, for medium moisture cheeses. There is no legislation that can provide guidelines on the maximum count of *Staphylococcus* spp. in the Minas artisanal cheese. Based on the results obtained by this research, it was verified that of the three samples used, none were fit for consumption, suggesting *Staphylococcus aureus* presence above the limit allowed by law and, also, high *Staphylococcus* spp. count in samples.

Keywords: Serra da Canastra; *Staphylococcus aureus*; Ripened cheese.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa das regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal.....	14
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados médios das contagens totais de colônias sugestivas de <i>Staphylococcus aureus</i> em ágar hipertônico Manitol de queijos Minas Artesanal, comercializados em Formiga – MG.....	20
Gráfico 2 - Resultados médios das contagens totais de <i>Staphylococcus</i> spp. em ágar hipertônico Manitol de queijos Minas Artesanal comercializados em Formiga – MG.....	22

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Leite cru	11
2.2	Saúde pública	12
2.3	Queijo minas artesanal	13
2.4	<i>Staphylococcus</i> spp.....	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

É aceito que o queijo surgiu há 8.000 anos com a domesticação de animais e plantas entre os rios Eufrates e Tigres, no Iraque. O queijo possui grande variedade de sabores e é um produto lácteo produzido em todo mundo (CÉSAR; PAULA, 2009). Este apresenta ótimas características nutritivas e é um alimento duradouro, diferente do leite, que é perecível e sofre alterações físico-químicas rápidas (FIGUEIREDO, 2018).

A região de Minas Gerais se destaca como a principal produtora de queijos artesanais no Brasil, sendo que, neste estado, uma importante parcela da produção queijeira é do queijo tipo Minas Artesanal, que é produzido a partir do leite cru, sendo seu modo de produção registrado pelo IPHAN (Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional) como patrimônio imaterial da nação (IPHAN, 2008). Atualmente, dez microrregiões produzem queijos artesanais em Minas Gerais, todas reconhecidas pelo IMA, das quais sete regiões produzem o Queijo Minas Artesanal: Canastra, Araxá, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Cerrado e Campo das Vertentes (FIGUEIREDO, 2018).

Para a fabricação do Queijo Minas Artesanal é utilizado um soro lácteo obtido de queijos de um lote anterior denominado pingo. O pingo é um inócuo rico em micro-organismos que atuam na fermentação dando odor, sabor e forma ao queijo. Uma variedade de micro-organismos está presente no pingo, dentre elas algumas patogênicas, como as do gênero *Staphylococcus* e bactérias desejáveis, como as bactérias ácido-láticas (BAL) (SANT'ANNA *et al.*, 2017). As bactérias do gênero *Staphylococcus* são definidas como patogênicas, pois são uma importante fonte de produção de enterotoxinas termorresistentes, o que pode levar à intoxicação alimentar de quem consome o alimento contaminado (LAPINHA *et al.*, 2015).

O Queijo Minas Artesanal passa por um processo de maturação, no qual reações bioquímicas e físico-químicas ocorrem devido à presença de micro-organismos e sua atividade sobre o queijo, que é favorecido pelo clima diferenciado da região onde é produzido. Sendo assim, a maturação aumenta a acidez dos queijos, além de promover uma diminuição da sua umidade e atividade de água. Porém, a maturação não garante a eliminação de todos os patógenos e algumas medidas como: higiene no processo de fabricação do queijo, higiene da ordenha e

boas práticas de manejo da saúde animal devem ser levadas em consideração (FIGUEIREDO, 2018).

A produção queijeira é caracterizada de modo geral por sua produção em baixa escala, pouco tecnológica, familiar e sazonal contribuindo para o questionamento em relação à inocuidade do produto para o consumo humano. (OLIVEIRA, 2014; CASTRO *et al.*, 2016).

O leite cru, principal ingrediente na produção do Queijo Minas Artesanal possui grande concentração de moléculas que o tornam ótimo meio de cultura para micro-organismos e, devido a isso, deve ser resfriado até o momento em que é transportado para indústria (MARTINS *et al.*, 2008). Porém, apenas o resfriamento não é o suficiente para garantir que este leite não esteja contaminado. Má higienização da ordenha, bem como falta de higiene dos ordenhadores e do ambiente em que o animal vive, podem em si contaminar o leite e causar mastite, aumentando a contagem bacteriana total (CBT) e de células somáticas (CCS) do leite, fatores esses que indicam más práticas de higiene e manejo nas fazendas (GUERREIRO *et al.*, 2005; KELLY *et al.*, 2009).

Sendo assim, o queijo Minas Artesanal pode veicular micro-organismos patogênicos como o *Staphylococcus aureus* devido a uma maturação inadequada ou caso haja contaminação pós-maturação. Apesar de sua representatividade para os mineiros, merece atenção, também, pelo risco que pode oferecer para a saúde pública.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de bactérias *Staphylococcus* spp. em queijos Minas Artesanais comercializados no município de Formiga – MG.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite cru

O leite cru é o principal ingrediente na produção do Queijo Minas Artesanal sendo, então, importante a sua qualidade, bem como as práticas de manejo para a produção e obtenção deste leite (FIGUEIREDO, 2018).

O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) define leite cru refrigerado como “produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, refrigerado e mantido nas temperaturas constantes com limites máximos de 7° C na propriedade rural e 10° C no estabelecimento processador” (BRASIL, 2017). O leite resfriado evita a proliferação de micro-organismos que promovem a deterioração do leite. Tais micro-organismos promovem, dentre outros prejuízos, uma queda no rendimento industrial, bem como uma produção de derivados lácteos instáveis (VINHOLIS; BRANDÃO, 2009). As baixas temperaturas também impedem a proliferação exacerbada de algumas bactérias, como o *Staphylococcus* spp., que são bactérias associadas a surtos de intoxicação alimentar, por produzirem toxinas termo-estáveis (PERESI et al., 2004).

Dentre vários fatores, o que mais causa perdas econômicas na cadeia produtiva do leite é a mastite (LARANJA & MACHADO, 1994; LESCOURRET & COULON, 1994). Em bovinos produtores de leite, a mastite é um dos principais problemas de ordem infecciosa, por possuir diversas etiologias e apresentar difícil controle no ambiente de criação dos animais e dos diversos agentes envolvidos. As mastites causadas por *Staphylococcus aureus*, são as que mais prevalecem em todo mundo e, em relação à saúde pública, leite e derivados contaminados por estes micro-organismos podem ser uma forma de infecção para o homem (BALABAN; RASOOLY., 2000).

A mastite pode se manifestar na forma subclínica ou clínica (ACOSTA et al., 2016). A forma subclínica necessita de meios de diagnóstico, sendo a CCS o mais utilizado. Já a forma clínica apresenta sinais externos visíveis pelo médico veterinário (RENEAU, 1986; HARMON, 1994; MACHADO ET AL., 2000).

O aumento da CCS no leite influencia negativamente diversos parâmetros como: produção, qualidade de derivados, tempo de coagulação e atividade enzimática (KITCHEN, 1981).

A CBT avalia a contagem bacteriana total no leite, portanto, um resfriamento rápido associado à refrigeração e boas práticas de higiene são indispensáveis para alcançar uma CBT baixa (FIGUEIREDO, 2018).

Desta forma, CCS e CBT são utilizadas como quesitos principais para avaliação da qualidade do leite (ROMA JÚNIOR et al., 2009). Portanto, a IN 67 do MAPA, estabelece que o leite cru refrigerado de tanque individual ou de uso comunitário deve apresentar médias geométricas trimestrais de Contagem Padrão em Placas de no máximo 300.000 UFC/mL e de Contagem de Células Somáticas de no máximo 500.000 CS/mL (BRASIL, 2018). Sendo assim, valores abaixo do estabelecido pela instrução normativa, indicam que o leite possui uma qualidade confiável, estando apto para a produção do Queijo Minas Artesanal.

2.2 Saúde pública

Atualmente um grande problema para a saúde pública mundial tem sido as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (SANTANA; BELOTI, 2010).

Em quadros de toxinfecções alimentares, as bactérias são os principais agentes (OMS,1995). Sendo assim, em intoxicações alimentares causadas por bactérias, o *Staphylococcus aureus* é um dos mais comuns, pelo fato de estar bem distribuído pela natureza, sendo na maioria das vezes, transmitidos para os alimentos pelos animais, como em rebanhos leiteiros com mastite, ou por pessoas portadoras assintomáticas que manipulam alimentos (BALABAN; RASOOLY, 2000).

A intoxicação alimentar por toxina estafilocócica é atribuída a ingestão de uma enterotoxina. Em alimentos, principalmente aqueles de origem animal, ocorre à multiplicação do micro-organismo e esta toxina é produzida, liberada e então ingerida por humanos, representando alto risco a saúde pública (MICUSAN; THIBODEAU, 1993; HENNEKINNE et al., 2012). A enterotoxina produzida por estes micro-organismos são termorresistentes, ou seja, suportam temperaturas elevadas (SANTANA et al., 2010).

As intoxicações por *Staphylococcus* spp. no Brasil geralmente não são notificadas, porém, são comuns no país (PEREIRA et al., 1994). Por possuir algumas características como, alta taxa de produção de toxinas e de multiplicação, o *Staphylococcus* spp. expõe a população em geral e, principalmente, a população consumidora de produtos de origem animal, a grande risco de intoxicação alimentar (LAPINHA; OLIVEIRA, 2012).

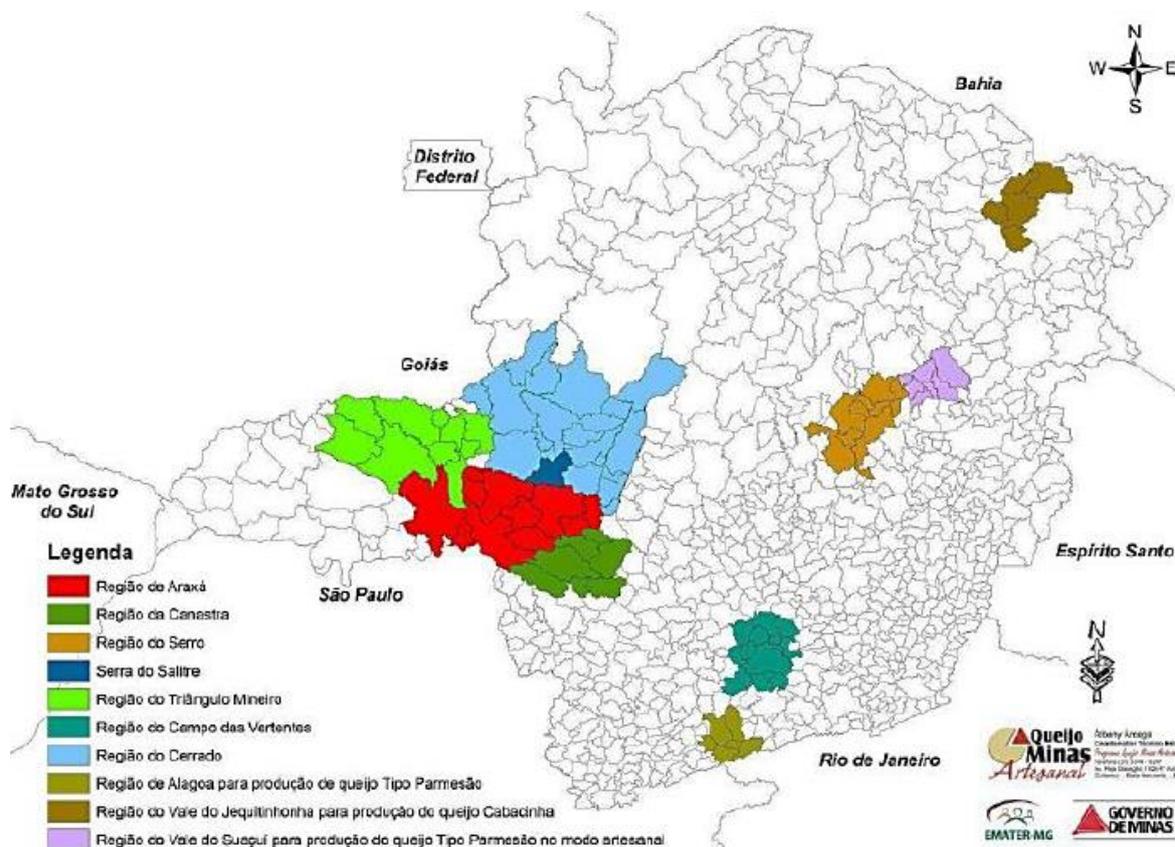
Desta forma, o Decreto número 42.645 de cinco de junho de 2002, que dispõe sobre o processo de produção de Queijo Minas Artesanal (MINAS GERAIS, 2012), preconiza que “ o leite cru obtido de um rebanho sadio e que no momento de sua utilização artesanal, atenda um padrão de até 100 UFC/mL de *Staphylococcus aureus*” para que isso não se torne um problema à saúde pública. Já a Portaria número 146, de sete de março de 1996 (BRASIL, 1996), preconiza o limite máximo de 1.000 UFC/mL de *Staphylococcus* coagulase positivo por gramas, para queijos de média umidade.

2.3 Queijo minas artesanal

O Queijo Minas Artesanal tem grande representatividade para o estado de Minas Gerais e é um grande gerador de rendas em diversos municípios, sendo sua artesanabilidade registrada como patrimônio imaterial da nação (IPHAN, 2008).

Atualmente, dez microrregiões produzem queijos artesanais em Minas Gerais, todas reconhecidas pelo IMA, das quais sete regiões produzem o Queijo Minas Artesanal: Canastra, Araxá, Serra do Salitre, Serro, Triângulo Mineiro, Cerrado e Campo das Vertentes (FIGUEIREDO, 2018).

Figura 1 – Mapa das regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal



Fonte: Emater (2016) *apud* Ferraz (2016)

Segundo o decreto nº 42.645/2002 de cinco de junho de 2002 que dispõe sobre o processo de elaboração do queijo artesanal (MINAS GERAIS, 2002), devem ser observadas as seguintes fases:

I – Filtração: tem como objetivo a retirada de partículas e deve ser realizada logo após a ordenha. O coador pode ser constituído de diversos materiais como: plástico atóxico, metal, alumínio ou aço inox, devidamente higienizados e secos, com malha de 16 meshes. Pode-se utilizar mais de um filtro nessa fase, pois este deve ser trocado sempre que apresentar alto grau de sujidade. Já no tanque da queijaria, o leite deve novamente passar por uma filtração, porém esta deve ser com filtros de 60-90 meshes.

II – Adição de fermento natural e coalho: nesta etapa utiliza-se o pingão, o soro fermentado ou soro fermento natural salgado. Quimosina de bezerro, tanto em pó, quanto líquido. Essa etapa busca produzir a massa do queijo.

III – Coagulação: o coalho atua sobre leite e essa etapa refere-se ao tempo que este necessita para começar a agir.

IV – Corte da coalhada: Realiza-se o corte objetivando grãos do tamanho específico para o queijo de cada microrregião. Nesta etapa ocorre separação do soro.

V – Mexedura: Busca também a separação do soro. Se por algum motivo nesta fase houver flutuação ou decantação lenta dos grãos, a massa deve ser inteiramente descartada, pois indica que o queijo não está apto para consumo humano.

VI – Dessoragem: Nesta etapa o soro é retirado, porém, cada microrregião retira certa quantidade do soro de acordo com suas tradições e o processo deve ser regulamentado pelo Instituto Mineiro de Agropecuária.

VII – Enformagem: A massa deve ser colhida por percolador telado e através de formas higienizadas vão ganhar sua forma típica arredondada.

VIII – Prensagem manual: tem como fim aproximar os grãos dando consistência lisa ao queijo. Nesta etapa também há grande remoção de parte do soro, diminuindo a umidade e retirando lactose, dessa forma, a fermentação é interrompida e tem-se o início da maturação. Deve ser realizada utilizando as tampas das formas e o operador do processo deve utilizar luvas plásticas e descartáveis.

IX – Salga seca: Nesta fase o sal marinho devidamente apropriado para o consumo humano é utilizado para dar sabor ao queijo. A salga é realizada de ambos os lados. Nesta etapa o pingo também é separado em um total de 4litros/100 de leite.

X – Maturação: o objetivo da maturação é a desidratação do queijo e sua estabilização atingindo o ponto de consistência desejado. O tempo de maturação muda para cada microrregião.

A maturação é importante, uma vez que, aumenta a acidez dos queijos e promove uma diminuição da sua umidade e atividade de água. Na maturação também pode haver a liberação de produtos da lipólise e proteólise, promovendo alterações sensoriais do queijo e uma diminuição de micro-organismos que podem causar doenças aos seres humanos, controlando os riscos de saúde pública quanto à ingestão deste alimento (FIGUEIREDO, 2018).

A Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013, que estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal (MINAS GERAIS, 2013), define que o período de maturação seja de no mínimo 17 dias para região do Serro, 14 dias para região de Araxá e de no mínimo 22 dias para as microrregiões de Cerrado, Canastra e Campo das Vertentes até que novas pesquisas ratifiquem ou retifiquem os tempos de maturação. A mesma portaria define que a maturação deve ocorrer à temperatura ambiente e que as demais regiões produtoras do Queijo Minas Artesanal devem apresentar pesquisas atestando a eficácia da maturação em período inferior a 60 dias, sem gerar prejuízos à inocuidade a qualidade do produto.

De acordo com Santos (2010), o processo da maturação melhora a qualidade microbiológica do queijo, mesmo se o produto possuir uma contagem bacteriana alta no início, pois favorece uma junção de fatores microbiológicos, físicos e químicos que são importantes para a segurança alimentar do produto.

Porém, a maturação não garante a eliminação de todos os patógenos e algumas medidas como: higiene no processo de fabricação do queijo, higiene da ordenha e boas práticas de manejo da saúde animal, bem como o tempo correto de maturação, devem ser levadas em consideração para a produção do Queijo Minas Artesanal (FIGUEIREDO, 2018).

2.4 *Staphylococcus* spp.

O *Staphylococcus* spp. é um gênero bacteriano associado à transmissão de doenças aos seres humanos e apresenta mais de 30 espécies, entre elas, o *S. aureus*, que tem grande interesse para a saúde pública, por produzir toxinas de baixo peso molecular, podendo causar quadros de intoxicação alimentar (FORSYTHE, 2013).

Os micro-organismos deste gênero, se observados em microscopia óptica, exibem-se no formato de cocos Gram positivos, agrupados em cachos, tétrades ou pares. São halofílicos, tolerando concentrações de 15% de cloreto de sódio; mesofílicos; exprimem colônias convexas, arredondadas, de coloração que vai do branco ao alaranjado; estáticos; anaeróbios facultativos; não esporulam e sintetizam a enzima catalase (TORTORA et al., 2012).

Estas bactérias podem ser isoladas, seletiva e diferencialmente, quando utilizado meios como ágar hiperônico manitol. Desta forma, os micro-organismos fermentam o manitol, que é um tipo de carboidrato, formando ácido. Este meio

seletivo impossibilita o crescimento de outros organismos por possuir uma concentração de 7,5% de cloreto de sódio. Sendo assim, o crescimento do *S. aureus* é selecionado e diferenciado. O meio utilizado para seleção, também possui um indicador de pH e quando o manitol é fermentado, este altera sua cor, diferenciando o *S. aureus* dos demais não fermentadores de tal açúcar ali presentes (TORTORA et al., 2012).

A contagem bacteriana deste gênero em Queijo Minas Artesanal geralmente é alta (DORES et al., 2013; MARTINS, et al., 2015; CASTRO, et al., 2016). Isso ocorre devido à alta distribuição do micro-organismo no ambiente e a contaminação do leite por animais com mastite ou manipulação deste, por pessoas portadoras assintomáticas do gênero bacteriano (BALABAN; RASOOLY, 2000).

Forsythe (2013) relatou que sinais como diarreia, vômito, náusea e desconforto abdominal podem ser sinais de intoxicação por toxinas provenientes do *Staphylococcus* spp.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no município de Formiga - MG, que faz parte da região centro-oeste do estado e fica localizado a aproximadamente 200 km da capital Belo Horizonte. O experimento foi feito nas dependências do Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Formiga-MG. Para a realização deste, foram utilizados 6 queijos de procedência artesanal da região da Serra da Canastra, obtidos em mercados varejistas do município supracitado, em diferentes dias.

A metodologia utilizada no presente trabalho é uma adaptação da técnica descrita por Zurita et al. (2010)

Na ocasião, um grama das amostras dos 6 queijos, foi diluído em solução salina até a concentração de 10^{-4} . Após a diluição, foi realizado o plaqueamento da amostra em meio ágar hiperônico manitol (marca: Kasvi, São José dos Pinhais, Brasil) pela técnica "Pour plate", que consiste em adicionar 1mL do inóculo em uma placa de petri previamente esterilizada e, em seguida, o meio é adicionado.

Após incubação por 48 horas a 37 °C e multiplicação no meio, as colônias bacterianas foram contadas e diferenciadas em colônias amarelas e brancas. Posteriormente, foi realizada a coloração Gram das colônias selecionadas, para que fosse possível sua visualização por microscopia óptica (aumento de 100x, em imersão) e diferenciação por morfologia, visto que as bactérias do gênero *Staphylococcus spp.* são Gram positivas e apresentam-se, especificamente, em forma de cocos e agrupam-se em cachos.

As colônias diferenciadas foram adicionadas em meio BHI (marca: Himedia, Mumbai, Índia) e incubadas novamente por 48 horas a 37°C para crescimento e então foram novamente plaqueadas pelo método de estriamento em meio ágar hiperônico manitol, para confirmação de presença de *S. aureus*, caso houvesse mudança no pH do meio e conseqüentemente alteração de cor.

Os testes estatísticos foram feitos a partir do programa GraphPad Prism 6.0.

O experimento foi realizado em duplicata com uma repetição, no período de março a maio de 2019.

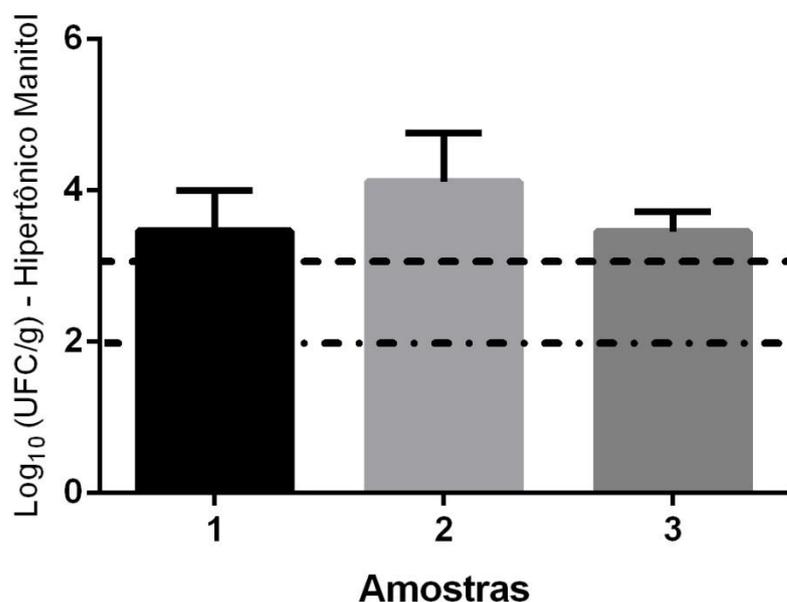
3.1 Análise estatística

A comparação entre médias foi realizada com auxílio do programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). O teste de One-way ANOVA (com pós-teste de Tukey) foi o escolhido para a comparação entre os grupos experimentais, tendo em vista a distribuição normal das amostras. Foram considerados estatisticamente significativos resultados que apresentaram significância mínima de 5% ($p < 0,05$) entre eles.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos pelo experimento em relação à contagem de *Staphylococcus aureus* podem ser observados no Gráfico 1.

Gráfico 1 – Resultados médios das contagens totais de colônias sugestivas de *Staphylococcus aureus* em ágar hipertônico Manitol de queijos Minas Artesanal, comercializados em Formiga – MG.



A fermentação do manitol do meio sugere a presença de *S. aureus* nas amostras de Queijo Minas Artesanal.

Todas as amostras ficaram acima do preconizado pela Portaria nº 146, de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996) que define o número máximo de 1.000 UFC/mL de *Staphylococcus* coagulase positiva por grama, para queijos de média umidade. Porém, as amostras I e III poderiam se enquadrar na legislação quando se observa o desvio padrão de cada uma.

Em seu trabalho, Forsythe (2002) observou a presença de *Staphylococcus aureus* em 100% de suas amostras e todas apontaram valores acima do que é permitido por lei, o que corrobora com o este trabalho.

Castro et al. (2016) relata que micro-organismos podem ser oriundos de rebanhos com baixa qualidade sanitária, mão de obra pouco qualificada (com pouco treinamento em boas práticas de fabricação), portadores assintomáticos,

equipamentos de ordenha mal higienizados e, até mesmo, água com qualidade microbiológica fora do padrão.

Sales (2015) relatou em seu experimento que a maturação não foi o suficiente para diminuir as contagens de *S. aureus* no Queijo Minas Artesanal e isto ocorre quando o tempo de maturação não é respeitado, o que nos leva a indagar se o período de maturação destes queijos está sendo mesmo adequado e suficiente.

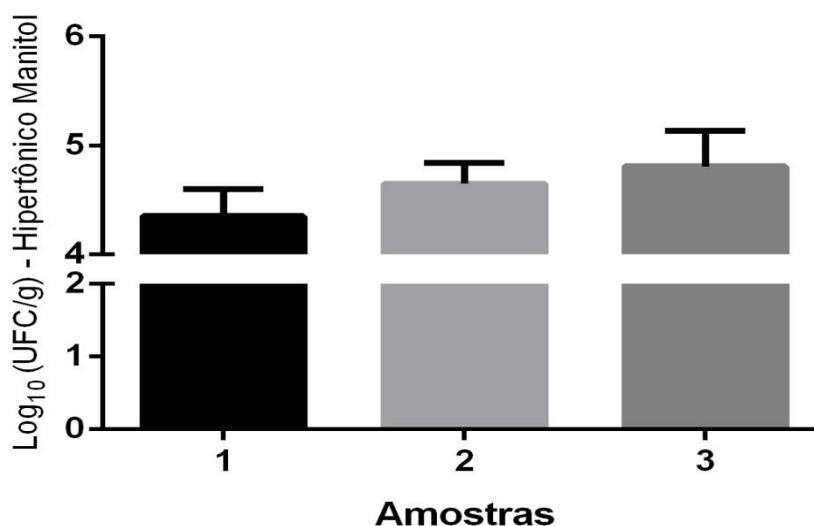
Em contrapartida, Figueiredo (2018) relata uma diminuição nos valores de contagem para *Staphylococcus aureus* em Queijos do tipo Minas Artesanal da região da Serra do Salitre – MG após 14 dias de maturação.

Franco e Landgraf (2005) descreveram que a maturação diminui a atividade de água presente no Queijo Minas Artesanal. Pelo fato do queijo ser salgado com cloreto de sódio e do *Staphylococcus aureus* ser halófilo, eles são selecionados e se multiplicam em maiores taxas, mesmo esta espécie sendo uma péssima competidora, o que entra em conformidade com o trabalho apresentado, já que foram obtidas altas contagens de *S. aureus*.

A alta contagem de *S. aureus* no presente trabalho, indica que houve uma contaminação do Queijo Minas Artesanal por esta bactéria. Rosa et al. (2015) relatam que *Lactobacillus* spp. isolados de Queijo Minas Artesanal demonstraram antagonismo frente a *S. aureus* e que mesmo não inibindo seu crescimento, os *Lactobacillus* spp, inibiram potencialmente a produção de toxinas estafilocócicas.

O Gráfico 2, mostra as contagens de *Staphylococcus* spp. obtidas após o experimento. A legislação não impõe limites para o gênero *Staphylococcus* spp., porém, neste gráfico é possível observar que há elevadas contagens destes micro-organismos.

Gráfico 2 – Resultados médios das contagens totais de *Staphylococcus* spp. em ágar hipertônico Manitol de queijos Minas Artesanal comercializados em Formiga – MG.



Segundo Figueiredo. (2018), a falta de legislação impondo limites para contagem de *Staphylococcus* spp. demonstra contradição, pois micro-organismos que pertencem a este gênero e não são caracterizados como coagulase positivas, podem produzir toxinas e causar prejuízos a saúde pública. Desta forma, os micro-organismos em altas contagens observados neste trabalho podem ser associados à contaminação de queijos do tipo Minas Artesanal.

Staphylococcus coagulase negativa podem produzir toxinas patogênicas ao ser humano (CARMO et al., 2002; LAMAITA et al., 2005). Algumas espécies como *S. chromogenes*, *S. xylosum*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* foram estudadas em laboratório e observou-se a produção de enterotoxinas por estas (BORGES et al., 2008). Entre as toxinas produzidas por estes micro-organismos, destacam-se TSST -1, da Síndrome do Choque Tóxico, com quadro agudo que pode ser fatal, além das toxinas esfoliativas A e B (LUZ, 2008).

Figueiredo (2018) relata um aumento da contagem de *Staphylococcus* spp. após a maturação em queijos Minas Artesanal da região da Serra do Salitre – MG, condizendo com o presente trabalho. Lamaita (2005) cita que aumento de *Staphylococcus* spp. em alimentos pode provocar contaminação destes e causar doenças aos seres humanos. Sales (2015), também relatou aumento nas contagens de *Staphylococcus* spp. totais, assim como apresentado neste trabalho e ainda relatou que a maturação não foi o suficiente para a diminuição das contagens deste micro-organismo.

O aumento da contagem total destes micro-organismos é preocupante, logo, seria necessária uma legislação que pudesse fornecer diretrizes sobre a contagem máxima de *Staphylococcus* spp. no queijo Minas Artesanal.

Apesar de ter sido feita comparação de médias pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Turkey, não houve diferenças estatísticas em ambos os gráficos.

5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos por esta pesquisa, foi constatado que das três amostras utilizadas, nenhuma estava apta para o consumo, no que diz respeito à presença sugestiva de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva) acima do limite permitido por lei, além de altas contagens de *Staphylococcus* spp. nas amostras.

A contagem alta de *Staphylococcus* spp. nas amostras é preocupante, logo, seria necessária uma legislação que pudesse fornecer diretrizes sobre a contagem máxima destes micro-organismos no Queijo Minas Artesanal.

Apesar das amostras analisadas no presente estudo estarem impróprias para o consumo, o Queijo Minas Artesanal vem ganhando cada vez mais destaque nacional e seus padrões microbiológicos e de boas práticas de fabricação vêm sendo continuamente aprimorados.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C. *et al.* Mastites em ruminantes no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 7, p. 565–573, 2016.
- BALABAN, N.; RASOOLY, A. Review Staphylococcal enterotoxins. **International journal of food microbiology**, v. 61, p. 1–10, 2000.
- BERESFORD, T. P. *et al.* Recent advances in cheese microbiology. **Int. Dairy J.**, v. 11, n. 4-7, p. 259-274, 2001.
- BORGES, M. de F. *et al.* Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v. 38, n. 5, p. 1431–1438, 2008.
- BRASIL. **Decreto de lei nº 9.013**. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 29 de março de 2017. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/D9013.htm>
- BRASIL. **Decreto de lei nº 42.645**. Processo de produção de Queijo Minas Artesanal. Instituto Mineiro de Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 5 de junho de 2002. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=140273>>.
- BRASIL. **Portaria nº 146**. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 7 de março de 1996. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-mapa-146-de-07-03-1996,669.html>>. Acesso em: 30 de maio de 2019.
- BRASIL. **Portaria nº 1.305**. Estabelece diretrizes para a produção do Queijo Minas Artesanal. Instituto Mineiro de Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 30 de abril de 2013. Disponível em: <http://www.ima.mg.gov.br/material-curso-cfo-cfoc/doc_details/1159-portaria-1305>. Acesso em: 30 de maio de 2019.
- CARMO, L. S. *et al.* Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.
- CASTRO, R. D. *et al.* Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6086–6096. 2016.
- CÉSAR, J.; PAULA, J. de. Princípios básicos de fabricação de queijo : do histórico à salga. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367, p. 19–25, 2009.

Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus* spp . isolados de queijos artesanais Evaluation of toxicity genes , antimicrobial susceptibility , and in vitro antagonism of *Staphylococcus* spp . isolated from artisanal cheese. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 37–42, 2015.

DORES, M. T. DAS; NOBREGA, J. E. da; FERREIRA, C. L. de L. F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of Brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 1, p. 180–185, 2013.

FERRAZ, W. M. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: Influência do ambiente sobre a maturação**. Dissertação apresentada ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Rio Pomba. 2016.

FIGUEIREDO, R. C. **Caracterização produtiva, microbiológica e físico-química de queijo minas artesanal da serra do salitre em diferentes períodos de maturação e épocas do ano**. 2018.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. Artmed Editora. 2013.

FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GHEQUIRE, M. G. K.; DE MOT, R. Turning Over a New Leaf: Bacteriocins Going Green. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 1–2, 2017.

GUERREIRO, P. K. *et al.* Qualidade microbiológica de leite em função de técnicas profiláticas no manejo de produção. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 216-222, 2005.

HENNEKINNE, J. A.; BUYSER, M. L.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

IPHAN – INSTITUTO DO PATRIMÔNIO HISTÓRICO E ARTÍSTICO NACIONAL. **Livro de Registro de Saberes**. Brasília, DF. v. 1, n. 4. 2008. Disponível em: <<http://www.iphan.gov.br/bcrE/pages/folProcessoRegistroE.jsf>>

ISO, H. R. N. **ISO 9622**: Milk and liquid milk products. *Guidelines for the application of mid-infrared spectrometry*. 2013.

KELLY, P. T. *et al.* Farm management factors associated with bulk tank total bacterial count in Irish dairy herds during 2006/07. **Irish Veterinary Journal**, v. 62, n. 1, p. 36-42, 2009.

KITCHEN, B. J. Review of the progress of dairy science: bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. **Journal of Dairy Research**, London, v.48, n.1, p.167-188, 1981.

LAMAITA, H. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; CARMO, L. S. *et al.* Contagem de *Staphylococcus* sp. e detecção de enterotoxinas estafilocócicas e toxina da síndrome do choque tóxico em amostras de leite cru refrigerado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, n. 5, p. 702-709, 2005

LAPINHA, D. *et al.* Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2015.

LAPINHA, D.; OLIVEIRA, S. **Staphylococcus spp. isolados de queijo artesanal da Serra da Canastra**: identificação bioquímica e molecular, detecção de genes para produção de toxinas, susceptibilidade a antimicrobianos e atividade antagonista in vitro frente a *Lactobacillus* spp. 2012.

LARANJA, L. F.; MACHADO, P. F. Ocorrência de mastite bovina em fazendas produtoras de leite B no Estado de São Paulo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 578-585, 1994.

LUZ, I. S. **Caracterização molecular das toxinas em Staphylococcus aureus isolados de leite e queijo de coalho em municípios da região Agreste de Pernambuco**. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife. 126p., 2008.

MARTINS, M. E. P. *et al.* Qualidade de leite cru produzido e armazenado em tanques de expansão no Estado de Goiás. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 9, p. 7, 2008.

MARTINS, J. M. *et al.* Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

MICUSAN, V. V.; THIBODEAU, J. Superantigens of microbiol origin. **Immunol.**, v. 5, p. 3-11. 1993.

OLIVEIRA, L. G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 111p., 2014.

OMS. **Emerging and other communicable diseases, surveillance and control**: Report of a WHO consultation of public health implications of consumption of raw milk and meat and their products, Germany, 17-20, December, 1995 (WHO/EMC/ZOO/96.7). Disponível em: <www.who.int/hq/1996/WHO_emc_zoo96.7.pdf>.

PEREIRA, M. L. *et al.* Staphylococcal food poisoning from cream filled cake in a metropolitan area of South-Eastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 6, p. 406-409, 1994.

PERESI, J. T. M. *et al.* Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 2, p. 232-237, 2004.

RENEAU, J. K. Effective use of dairy herd improvement somatic cell counts in mastitis control. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 6, p. 1708-1720, 1986.

ROMA JÚNIOR, L. C. *et al.* Sazonalidade do teor de proteína e outros componentes do leite e sua relação com programa de pagamento por qualidade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 6, p. 1411-1418, 2009.

ROSA, D. L. S. O. *et al.* Detecção de genes toxigênicos, susceptibilidade antimicrobiana e antagonismo in vitro de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos artesanais. **Vigilância Sanitária Em Debate**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2015.

SALES, G. de A. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá-MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** Dissertação (Mestrado em Ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SANTANA, E. H. W. DE; BELOTI, V. Estafilococos em Alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, p. 545-554, 2010.

SANT'ANNA, F. M. *et al.* Assessment of the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Minas artisanal cheese produced in the Campo das Vertentes region, Brazil. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, n. 4, p. 592-601. 2017.

SANTOS, A. S. **Queijo Minas artesanal da microrregião do Serro-MG: Efeito da sazonalidade sobre a microbiota do leite cru e comportamento microbiológico durante a maturação.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina. 2010.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VINHOLIS, M. D. M. B.; BRANDÃO, H. D. M. Economia de escala no processo de resfriamento do leite. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 245-251, 2009.

ZURITA, J.; MEJÍA, C.; BLANCO, M. G. Diagnóstico e teste de sensibilidade para *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina na América Latina. **Braz J Infect Dis**, v. 14, n. 2, p. 97-107, 2010.