

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA – UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
LUIZA CAMATTARI RESENDE

**PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS TIPO “MINAS
FRESCAL” ELABORADOS COM LEITE CRU E COMERCIALIZADOS NO
MUNICÍPIO DE FORMIGA - MG**

FORMIGA – MG
2019

LUIZA CAMATTARI RESENDE

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS TIPO “MINAS FRESCAL”
ELABORADOS COM LEITE CRU E 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

Luiza Camattari Resende

PESQUISA DE *Staphylococcus* spp. EM QUEIJOS TIPO “MINAS FRESCAL”
ELABORADOS COM LEITE CRU E 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. Dr. José Antônio Viana
UNIFOR-MG

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

Formiga, 11 de julho de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pela minha vida e minha saúde – que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus pais, Grimoaldo e Elizabeth, por todo o incentivo, apoio, amor, suporte, por acreditarem em mim sempre e por terem me dado a oportunidade de estar aqui.

Aos meus irmãos, Camila e João Gabriel, que mesmo distantes me ajudaram de alguma forma, me apoiando e incentivando.

À minha avó Florentina, por acreditar em mim e me dar todo o amor e força para continuar.

À minha amiga Giulia Pieroni por estar comigo em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Leonardo Borges Acurcio por toda a paciência em toda a trajetória, pela disposição em me orientar da melhor forma possível, sempre sanando todas as dúvidas com muita clareza e buscando ajudar a toda hora. Exemplo de profissional e pessoa.

Ao meu co-orientador Dr. José Antônio Viana pela disposição em ajudar sempre que o procurei.

A todos os professores que tive ao longo destes anos no Centro Universitário de Formiga – MG, pelos conhecimentos obtidos, que serão válidos pelo resto da minha vida como profissional.

Aos meus colegas de sala, que sempre buscaram me ajudar, em especial à Tayná e Suéllen.

Ao meu namorado Acácio Freire, que me incentivou durante toda a realização e me ajudou de todas as formas possíveis.

À equipe dos laboratórios do Centro Universitário de Formiga – MG.

A todos que fizeram parte dessa caminhada me auxiliando de alguma forma.

RESUMO

O queijo Minas Frescal, de acordo com a legislação, é definido como o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. A legislação brasileira exige que estes sejam elaborados a partir de leites pasteurizados e proíbe a comercialização quando elaborados com leite cru, pois, assim, podem ser importantes veículos de micro-organismos patogênicos. O objetivo deste trabalho foi analisar a presença de *Staphylococcus* spp. em queijos do tipo “Minas Frescal” elaborados de forma artesanal (com leite cru) e comercializados em mercados locais do município de Formiga – MG. O padrão microbiológico para este micro-organismo está definido em seu regulamento técnico de identidade e qualidade. Os resultados das amostras analisadas foram sugestivos para a presença de *Staphylococcus aureus*, ultrapassando os limites máximos permitidos estabelecidos. Pode-se concluir que os queijos não estavam aptos para consumo pela elevada contagem de *Staphylococcus* spp., que pode ser resultado destes serem elaborados a partir de leite cru.

Palavras-chave: DTAs; Contaminação; Micro-organismo Patogênico.

ABSTRACT

"Minas Frescal" cheese was defined by legislation as a fresh cheese obtained by enzymatic coagulation of the milk with rennet and/or other appropriate coagulant enzymes, supplemented or not with the action of specific lactic bacteria. Brazilian law requires cheese to be made from pasteurized milk and prohibits marketing when made with raw milk, which is an important vehicle of pathogenic microorganisms. The objective of this work was to analyze the presence of *Staphylococcus* spp. in artisanal "Minas Frescal" type cheeses made with raw milk and sold locally in the municipality of Formiga, Minas Gerais. The microbiological standard for this microorganism is defined in global technical regulation. The results obtained from analyzed samples suggest the presence of *Staphylococcus aureus* above the maximum established limits. It can be concluded that sampled cheeses were not suitable for consumption due to high counts of *Staphylococcus* spp., which could be a result of being produced with raw milk.

Keywords: Foodborne illness; Contamination; Pathogenic Microorganism.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DTA – Doença transmitida por alimento

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

UAT – Ultra alta temperatura

UFC/g – Unidade formadora de colônia por grama

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Resultados médios das contagens totais de *Staphylococcus* spp. em ágar hipertônico Manitol de queijos do tipo “Minas Frescal” elaborados a partir de leite cru, comercializados em Formiga-MG.....19
- Gráfico 2 – Resultados médios das contagens totais de colônias sugestivas de *Staphylococcus aureus* em ágar hipertônico Manitol de queijos do tipo “Minas Frescal” elaborados a partir de leite cru, comercializados em Formiga – MG.....19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1	Leite cru	10
2.2	<i>Staphylococcus spp</i>	11
2.3	A importância da inspeção para a saúde pública.....	12
2.4	Fluxograma de produção do queijo Minas Frescal	13
2.4.1	Pasteurização do leite	14
2.4.2	Adição do fermento, do cloreto de cálcio e do coalho	14
2.4.3	Corte da massa.....	15
2.4.4	Agitação da massa	15
2.4.5	Enformagem da massa	15
2.4.6	Salga da massa	16
2.4.7	Embalagem	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

Um dos produtos lácteos mais populares do Brasil é o queijo Minas Frescal, sendo fabricado a partir da coagulação enzimática do leite (MARTINS, 2012). Segundo Feitosa et al. (2003), dos derivados lácteos, os queijos, em especial os frescos artesanais, são importantes veículos de micro-organismos patogênicos, isto porque, em sua maioria, são produzidos a partir de leite cru e não são maturados. Além disso, o queijo fresco artesanal é extremamente perecível pelo fato de apresentar elevado teor de umidade e passar por grande manuseio. Como consequência, cria-se um ambiente favorável para a proliferação de agentes bacterianos, que podem ser patogênicos ou não (CÂMARA et al., 2002).

A definição do queijo Minas Frescal foi determinada na portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997 (BRASIL, 1997a), que o define como o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997a).

A legislação brasileira exige que os queijos Minas Frescais sejam elaborados a partir de leites pasteurizados e, além disso, proíbe a comercialização legal destes quando elaborados com leite cru. Entretanto, esta comercialização tem sido realizada abertamente, principalmente nos estados de Minas Gerais e São Paulo (FILHO; FILHO, 2000).

Um dos grandes problemas do consumo destes queijos elaborados com leite cru está na presença de bactérias do gênero *Staphylococcus*. Isto se deve ao fato de que estes micro-organismos estão entre os mais presentes em queijos de fabricação artesanal (especialmente no que diz respeito à pasteurização) e possuem alto potencial patogênico, pois produzem enterotoxinas termorresistentes nos alimentos, o que os tornam importantes fontes de intoxicação alimentar (ROSA et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi pesquisar, quantificar e diferenciar as colônias de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. em queijos Minas Frescais elaborados a partir de leite cru e comercializados no município de Formiga – Minas Gerais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leite cru

O decreto nº 9.013 de 29 de março de 2017, define leite, sem outra especificação, apenas o oriundo de ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite que não seja exclusivamente de vaca, deve ser denominado de acordo com a espécie que proceda (BRASIL, 2017).

O leite e derivados lácteos exercem importante função nutricional para os seres humanos, principalmente aos primeiros anos de vida, visto que são compostos de proteínas, sais minerais, gorduras e carboidratos essenciais ao desenvolvimento (FAGUNDES; OLIVEIRA, 2004).

Segundo o Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969, é proibida a venda de leite cru para o consumo direto da população. Entretanto, embora seja proibido por lei a comercialização deste, de acordo com Silva (2017), ela ainda ocorre em cidades pequenas, onde os habitantes mantêm o hábito de consumir o leite cru devido à uma crença de que o produto *in natura* é mais puro e saudável, além de ter menor custo por litro e a compra ser mais cômoda. A prática de se obter o leite *in natura* é falsamente vista como inofensiva, uma vez que oferece potenciais riscos à saúde da população por não passar por um controle de qualidade na obtenção e venda, além de não ser armazenado corretamente.

A pasteurização ou o tratamento UAT eliminam por completo todos os micro-organismos patogênicos presentes no leite, porém, o calor utilizado nestes processos não é capaz de eliminar as toxinas que foram previamente produzidas (CARMO et al., 2002). Contudo, devido à uma grande quantidade do leite ser vendido sem previamente ter passado por um destes processos térmicos, há um risco microbiológico para a saúde pública, uma vez que grande quantidade de patógenos possivelmente estará presente. O leite é o meio de crescimento ideal para o desenvolvimento de diversos micro-organismos, especialmente bactérias, que são as principais causadoras de doenças transmitidas pelo leite e seus derivados no mundo inteiro (BHARATHY et al., 2015; FAGUNDES et al., 2010).

Dentre esses agentes, o que mais se destaca é o *Staphylococcus aureus*, pois causa uma grande variedade de doenças, com diferentes gravidades, que podem

variar desde uma infecção dérmica, até pneumonias, gastroenterites e septicemia (FAGUNDES et al., 2004).

O *S. aureus* é constantemente relacionado a mastites consideradas contagiosas, em vacas leiteiras, fato que leva, muitas vezes, à contaminação do leite e seus derivados. Além de causar perdas econômicas, é necessário destacar a importância das cepas produtoras de enterotoxinas e da toxina responsável pelo choque tóxico, para a saúde pública, sendo que a enterotoxina A está relacionada com maior destaque em casos de intoxicações alimentares. Estas toxinas, além da bactéria em si, podem, também, estar presentes no leite cru (JONES et al., 2006; SÁ et al., 2004). Outra forma de contaminação relatada é por meio da manipulação associada ou não a uma higiene deficiente. Portanto, há uma preocupação em relação ao consumo de leite cru ou de leite advindo de uma pasteurização incompleta (BHARATHY et al., 2015).

Assim como o *S. aureus* é capaz de causar patologias alimentares, outras espécies do gênero *Staphylococcus* também causam, pois diversas amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa produtoras de enterotoxinas já foram descritas (LAMAITA et al., 2005), tornando-se também problemas de saúde pública. No entanto, *Staphylococcus aureus*, que é coagulase positiva, é a mais preocupante (STAMFORD et al., 2006).

2.2 *Staphylococcus* spp.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* não são esporuladas e são bem resistentes às intempéries do meio ambiente (ANVISA, 2004). Sua conformação consiste em cocos em formas de cachos, o que justifica seu nome, pois, *Staphylo* significa cachos e *coccus*, indica células com formas esféricas. São bactérias Gram e catalase positivo, anaeróbias facultativas, pertencentes à família *Micrococcaceae*, junto com bactérias dos gêneros *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus* (SANTOS et al., 2007; TORTORA et al., 2012). São frequentemente observadas em pessoas saudáveis, na pele e nas fossas nasais. Podem provocar doenças de baixa gravidade, como espinhas, furúnculos e celulites, porém, causam também pneumonia, meningite, endocardite, septicemia, síndrome do choque tóxico, que são doenças mais graves e podem evoluir ao óbito. O gênero *Staphylococcus* possui mais de 30 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras humanas, pois, fazem parte da microbiota normal da pele dos seres humanos e de outras partes anatômicas.

Ainda assim, a espécie de maior interesse é a *S. aureus*, que está constantemente associada à diversas patologias em humanos. No entanto, pessoas com colonização nasal por esta espécie não apresentam sintomas, não desenvolvendo infecção. Isso tem grande importância, visto que o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser propagador da bactéria por contato com o alimento (SANTOS et al., 2007).

Os agentes desse gênero são tolerantes a concentrações altas de cloreto de sódio e podem fermentar o manitol, que é um carboidrato, para formação de ácido. O meio de cultura ágar hipertônico manitol conta com uma quantidade de 7,5% de cloreto de sódio e, pelo fato de outros micro-organismos não tolerarem esta quantidade, impede que agentes competidores cresçam e se desenvolvam, mesmo o *S. aureus* sendo considerado um mau competidor, selecionando e beneficiando o crescimento deste. Além disso, esse meio possui um indicativo de pH, que altera sua cor quando o manitol é fermentado a ácido. Assim, diferencia-se colônias de bactérias não fermentadoras de manitol, com *Staphylococcus aureus* (LOIR et al., 2003; TORTORA et al., 2012).

2.3 A importância da inspeção para a saúde pública

Diante da ilegalidade da produção do queijo Minas Frescal elaborado a partir de leite cru, destaca-se a importância da atuação do médico veterinário na inspeção deste alimento. Sendo assim, vale ressaltar que para produzir um leite ou qualquer derivado lácteo com boa qualidade e um alto nível de segurança para o consumo humano, é de extrema importância que os principais indivíduos envolvidos na cadeia produtiva efetuem seu papel, empenhando-se juntos (SANTOS; CARVALHO, 2013). Por essa razão, ao comercializar o queijo Minas Frescal elaborado com leite cru e sem devida inspeção, coloca-se em risco a segurança alimentar e, conseqüentemente, a saúde pública, devido a este alimento estar ligado à ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTAs).

As doenças transmitidas por alimentos são definidas, pela Organização Mundial de Saúde, como as doenças de natureza infecciosa ou tóxica, causada pelo consumo de água ou alimentos (LOIR et al., 2003). As DTAs podem acontecer de forma individual ou de surtos e são frequentes no Brasil e no resto do mundo. A contaminação desses alimentos, por bactérias, apresenta uma grave disfunção na segurança alimentar (PERESI et al., 2004).

De acordo com Forsythe (2013), muitos são os fatores que estão relacionados à insegurança alimentar e à origem de doenças, como: o controle errôneo da temperatura durante o cozimento, o resfriamento e/ou a estocagem; a higiene pessoal deficiente; a contaminação cruzada entre produtos crus e processados e; o monitoramento impróprio dos processos.

Visto que esses fatores estão relacionados com a insegurança dos alimentos e, embora qualquer indivíduo esteja susceptível às doenças transmitidas por alimentos, existem alguns grupos de risco, como crianças, grávidas, bebês, indivíduos com imunossupressão relacionada ao uso de medicamentos ou enfermidades e idosos. Os grupos de risco também podem ser separados por sexo, uma vez que os hábitos de higiene entre homens e mulheres são diferentes, pois homens possuem menor tendência a lavar as mãos após o uso do sanitário (FORSYTHE, 2013).

Segundo (PERESI et al., 2004), os principais sinais clínicos associados às doenças transmitidas por alimentos incluem náuseas, vômitos, cólicas, diarreias aquosas, febre, entre outros.

Para garantir segurança alimentar no consumo de queijo Minas Frescal, a Portaria nº 146 de 7 de março de 1996, definiu como padrão para requisito microbiológico de *Staphylococcus coagulase positiva*/grama, o limite máximo de 10^3 UFC (BRASIL, 1996).

2.4 Fluxograma de produção do queijo Minas Frescal

Segundo a Portaria nº 352/97, o queijo Minas Frescal é um queijo semi-gordo, de muita alta umidade, a ser consumido fresco, ou seja, pode ser consumido ao final da sua produção, não necessitando de período de maturação (BRASIL, 1997a).

Para isso, é necessário que ele seja elaborado com leite pasteurizado, pois, somente os queijos artesanais maturados por um período de 60 dias, a temperaturas superiores a 5°C, podem ser elaborados a partir de leite cru, onde a maturação garante a segurança alimentar (PAULA et al., 2009).

Contudo, ainda são elaborados queijos do tipo “Minas Frescal” com leite cru, porém, em desacordo com a legislação. A Instrução Normativa nº 57/13 pontua que os queijos artesanais que sejam elaborados com leite cru, passem por um período de maturação de 60 dias ou menos, quando estudos técnico-científicos comprovarem que o tempo de maturação reduzido não implica em redução da qualidade e inocuidade do produto. No entanto, o único queijo fabricado de forma artesanal, com

leite cru e maturado por períodos variados, é o queijo Minas Artesanal, que tem garantia de segurança alimentar quando a maturação for realizada por tempo e forma corretos (BRASIL, 2013).

De acordo com a descrição da tecnologia da produção do queijo tipo “Minas Frescal” de Silva (2005), o fluxograma é basicamente composto por: pasteurização do leite, adição de fermento, de cloreto de cálcio e do coalho, corte da massa, agitação da massa, enformagem e dessora, salga e embalagem.

2.4.1 Pasteurização do leite

A pasteurização é um processo térmico, realizado para garantir que o leite esteja livre de micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus* spp., entretanto, não garante que as toxinas produzidas por este gênero sejam eliminadas. Ela pode ser feita por dois processos diferentes, sendo estes, o rápido e o lento. A pasteurização rápida é feita por meio do aquecimento do leite a 72-75°C por 15 a 20 segundos e a lenta, a 65°C por 30 minutos e em ambos os casos, o leite deve ser imediatamente resfriado a temperatura de 34°C, para adição dos próximos ingredientes. (RODAS, 2014).

2.4.2 Adição do fermento, do cloreto de cálcio e do coalho

Segundo Silva (2005), durante a pasteurização, também é possível que micro-organismos desejáveis para a produção do queijo sejam destruídos. Por isso, é adicionado o fermento, que é composto por bactérias da espécie *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*. Este fermento é mesofílico, portanto, deve ser adicionado quando a temperatura do leite estiver em 30-37°C, na quantidade de 1 a 1,5%, proporcionalmente à quantidade de leite utilizada para fabricar o queijo.

O queijo é obtido através de coagulação enzimática, que consiste em lise dos aminoácidos 105 e 106, das cadeias protrudentes das micelas, que são anfipáticas, pois possuem parte hidrofílica e hidrofóbica (PAULA, et al., 2009). Por retirar a parte hidrofílica das cadeias protrudentes, a lise dos aminoácidos transforma as micelas de caseína em hidrofóbicas, o que faz com que as micelas se unam, propiciando a formação de pontes de cálcio.

Quando o leite é pasteurizado, o cálcio existente torna-se indisponível, por migrar para dentro das micelas de caseína. Nesse contexto, torna-se necessária a

adição de cloreto de cálcio para garantir a formação de pontes de cálcio entre as micelas e, conseqüentemente, garantir a formação de coágulos firmes. A quantidade de cloreto de cálcio a ser adicionada pode variar entre 0,02% a 0,03% para cada litro de leite (SABOYA et al., 1998).

A adição de coalho também está relacionada à coagulação enzimática do queijo. O coalho é composto pela enzima renina ou quimosina e é responsável por fazer a lise dos aminoácidos. Ele deve ser adicionado quando o leite atingir temperatura entre 32-34°C, que é a temperatura ótima de atuação do coalho e a quantidade a ser adicionada é fornecida pelo fabricante do coalho utilizado (PAULA et al., 2009).

2.4.3 Corte da massa

Após a adição do coalho, a coagulação da massa ocorre em aproximadamente 45 minutos, momento ideal para o corte da massa, que tem como objetivo a retirada do soro. O corte é realizado com lira, instrumento formado por lâminas ou fios cortantes, em disposição paralela e com distâncias iguais entre si, podendo ser horizontal ou vertical. Para o corte da massa do queijo “Minas Frescal”, é indispensável que os grãos sejam cortados com tamanho aproximado de 1,5 a 2 cm de ângulo (SILVA, 2005).

2.4.4 Agitação da massa

A agitação é outro processo também realizado para retirada do soro. Entretanto, pelo fato do queijo “Minas Frescal” ser de muita alta umidade, esta deve ser feita com cautela, para que essa característica seja preservada. Esta técnica consiste em agitar os grãos durante 1 minuto, deixá-los em repouso por 3 minutos e repetir a operação durante 30 minutos (ROCHA et al., 2006).

2.4.5 Enformagem da massa

A enformagem é necessária para dar forma característica ao queijo. Ela é feita com formas de plástico, com formato redondo e furos no fundo, como um coador, para permitir a saída do soro. Não é necessário o uso de dessorador, visto que o queijo “Minas Frescal” possui curto tempo de enformagem e é de muita alta umidade, além do seu peso ser suficiente para exercer a prensagem para a dessoradora (SILVA, 2005).

2.4.6 Salga da massa

Ainda de acordo com Paula et al. (2009), a salga é um processo importante para garantir o sabor, a conservação do produto e o controle da umidade. Na produção do queijo Minas Frescal, a técnica utilizada é a salga seca, que consiste na aplicação do sal na superfície do queijo, após a enformagem. Outra técnica que também pode ser utilizada, é a salga da massa, feita através da aplicação de sal após a retirada do soro.

2.4.7 Embalagem

A embalagem do queijo Minas Frescal é feita com sacos de plástico, amarrados com um barbante ou arame, à vácuo ou em bandejas de isopor com plástico filme (SILVA, 2005). É comum observar a presença de soro exsudado nessa embalagem, pelo fato deste queijo possuir muita umidade e não ser prensado (PINTO et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Centro Universitário de Formiga – Minas Gerais. Para este, foram utilizados queijos do tipo “Minas Frescal” provenientes de cinco produtores, comercializados em mercados locais (de Formiga-MG). As amostras foram compradas e mantidas sob refrigeração até a realização do experimento.

A metodologia utilizada para obtenção dos resultados foi uma adaptação da técnica descrita por Zurita et al. (2010).

A partir das amostras obtidas, um grama de cada uma delas foi pesado, em condições estéreis, para posterior diluição, em solução salina (0,9% NaCl). Foram feitas cinco diluições decimais seriadas de cada amostra e estas foram plaqueadas em placas de Petri estéreis, pelo método *pour plate*, contendo meio hipertônico ágar manitol. Esse método consiste em adicionar 1 mL das diluições selecionadas em placas de Petri, adicionar o meio de cultura e homogeneizar. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas em estufas, com temperaturas entre 35-37°C, por no mínimo 48 horas.

Após incubadas, foi feita a contagem das colônias e diferenciação destas. A diferenciação foi feita por meio da coloração das colônias e estas foram divididas em brancas e amarelas. Para a diferenciação da morfologia das colônias, estas foram visualizadas em imersão, em microscopia ótica, no aumento de 100x, após coloração de Gram.

As colônias diferenciadas foram posteriormente adicionadas em tubos de ensaio com Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI – Marca: Himedia, produzido em Mumbai, Índia) e incubadas em estufa a 35-37°C pelo período mínimo de 48 horas. A partir do cultivo em tubos contendo caldo BHI, cada tubo foi plaqueado novamente, em meio hipertônico ágar manitol (Marca: Kasvi), porém, por meio do método de estriamento, que consiste em adicionar o meio às placas de Petri e aguardar sua solidificação e, com auxílio de alças de platina, flambadas e submergidas em cada tubo, as colônias são estriadas e as placas incubadas novamente em estufa, por um período de 48 horas, em temperaturas a 35-37°C. Por fim, a diferenciação das colônias nas placas foi feita em *S. aureus* e não *aureus*, observando-se a fermentação do manitol presente no meio e mudança de coloração (ou não) para esta

diferenciação. O experimento foi feito em duplicata, com uma repetição, com o objetivo de aumentar a confiabilidade do experimento.

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

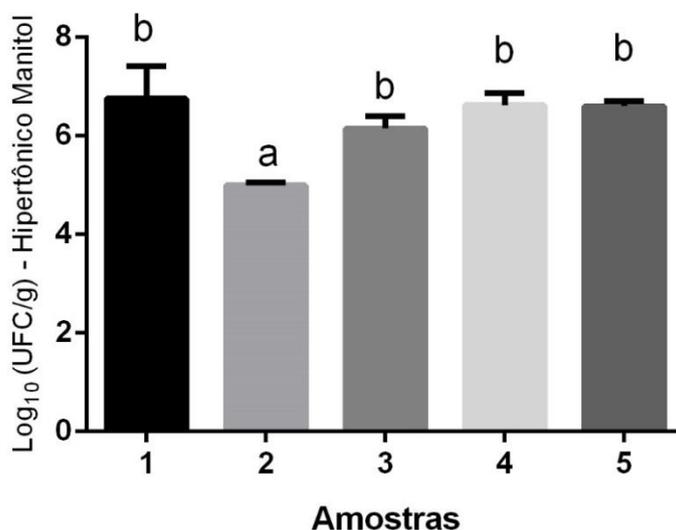
Os resultados das amostras de queijo tipo “Minas Frescal” da região de Formiga – Minas Gerais podem ser visualizados nos Gráficos 1 e 2.

O Gráfico 1 mostra os resultados da contagem total de *Staphylococcus* spp. e é possível observar que todas as amostras obtiveram uma contagem muito elevada dessa bactéria, fato preocupante, visto que esse gênero de bactérias pode ser veiculado através das mãos de manipuladores e se tornar importante fonte de contaminação alimentar. Além disso, várias espécies deste gênero podem causar patologias alimentares em seres humanos (SANTANA et al., 2010).

No gráfico 2, os resultados obtidos são sugestivos de *Staphylococcus aureus*, que em sua totalidade são coagulase positiva, uma vez que houve fermentação do manitol do meio ágar hipertônico manitol e mudança de coloração para amarelo. É possível observar que 100% das amostras, além de obterem uma contagem elevada de *S. aureus*, estão fora do padrão microbiológico previsto pela Portaria nº 146/96, do MAPA, que preconiza que as amostras obtenham contagem máxima de 1000 UFC/g ou 1×10^3 UFC/g ou 3 Log_{10} UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva. Resultado preocupante, já que contagens elevadas deste micro-organismo sugerem falhas no processamento, como ausência ou deficiência na pasteurização, condições de higiene inadequadas, assim como temperatura de conservação incorreta (PINTO et al., 2011).

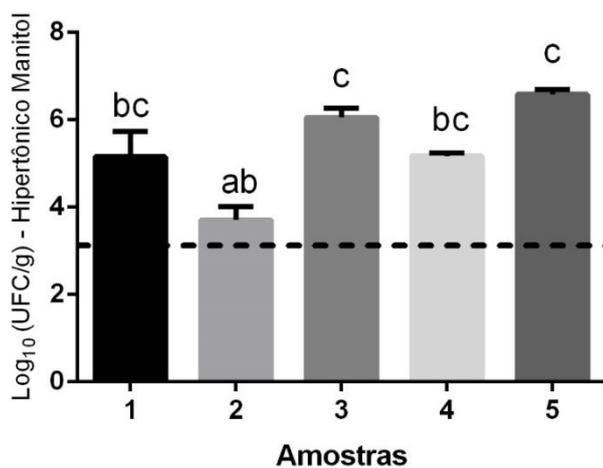
Outro fator preocupante é que este agente pode produzir toxinas estafilocócicas, causadoras de intoxicações alimentares. Para que a toxina seja capaz de se acumular a níveis que provocam intoxicações alimentares, são necessárias aproximadamente 10^6 UFC/g de alimento (FORSYTHE, 2013; RODRIGUES et al., 2004). Isso demonstra que duas das amostras analisadas têm potencial em causar intoxicações alimentares.

Gráfico 1 – Resultados médios das contagens totais de *Staphylococcus* spp. em ágar hipertônico Manitol de queijos “Minas Frescal” elaborados a partir de leite cru, comercializados em Formiga-MG



Legenda: letras diferentes representam resultados diferentes ($p < 0,05$) pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Turkey.

Gráfico 2 – Resultados médios das contagens totais de colônias sugestivas de *Staphylococcus aureus* em ágar hipertônico Manitol de queijos do tipo “Minas Frescal” elaborados a partir de leite cru, comercializados em Formiga – MG



Legenda: letras diferentes representam resultados diferentes ($p < 0,05$) pelo teste One-way ANOVA com pós-teste de Turkey. A linha tracejada representa o limite máximo definido pela legislação (3 Log₁₀ UFC/g).

A partir da visualização dos dois gráficos, foi possível observar que a amostra 2 teve menor ($p < 0,05$) contagem de micro-organismos, quando comparada as amostras 3 e 5, estando ainda em inconformidade com a legislação. Esse resultado possivelmente foi devido ao fato de ter sido elaborado a partir de um leite de melhor qualidade, com menor carga de micro-organismos e/ou em melhores condições higiênicas, que são pontos intimamente ligados à qualidade do queijo “Minas Frescal” (FILHO; FILHO, 2000).

Leite et al. (2005), analisaram 15 amostras e constataram a presença de *Staphylococcus* spp. em 86,7% delas. A legislação não tem padrões microbiológicos para outras espécies do gênero *Staphylococcus*, como as coagulase negativa. Isso demonstra que não existe um acordo com o que já foi descrito sobre a produção de enterotoxinas por *Staphylococcus* coagulase negativa, por Lamaita et al. (2005), que encontraram produção de toxinas capazes de causar intoxicações de origem alimentar por *Staphylococcus* coagulase negativa.

Após dois casos de intoxicação alimentar em Manhuaçu – MG e Passa-Quatro – MG, envolvendo o total de 378 pessoas que se alimentaram de queijo Minas Frescal artesanal de leite cru, três pedaços de uma amostra de queijo Minas Frescal, feito de forma artesanal, foram analisadas por Carmo et al. (2002), que detectaram contagem de $1,0 \times 10^5$ UFC/g em um pedaço, $1,0 \times 10^8$ UFC/g em outro e mais de $2,0 \times 10^8$ UFC/g no último, resultados semelhantes ao do presente trabalho, que constatou, no mínimo, presença de $1,0 \times 10^4$ UFC/g nas amostras utilizadas.

De acordo com a Portaria nº 451 de 1997 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 1997b), os produtos que apresentarem *S. aureus* em um valor de até 10 vezes o limite máximo estabelecido nos padrões microbiológicos, são considerados “Produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias” e, quando apresentarem *S. aureus* em valor maior que 10 vezes o limite máximo estabelecido, são considerados “Produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos”. Sendo assim, quase todas as amostras se aproximaram de 1×10^5 (5 Log_{10}) ou 1×10^6 (6 Log_{10}) UFC/g, ou até mesmo passaram, excetuando a amostra 2, mostrando que são produtos potencialmente capazes de causar enfermidades transmitidas por alimentos. A amostra 2, mesmo sendo de melhor qualidade, é considerada um produto em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, pois se aproxima de 1×10^4 (4 Log_{10}) UFC/g na contagem de *Staphylococcus aureus*, o que se assemelha aos resultados de Loguercio e Aleixo

(2001), que analisaram 30 amostras e encontraram cinco (16,67%) com contagem de até 10 vezes o limite máximo e 13 (43,33%) amostras com contagens superiores a 10 vezes o limite máximo. Resultados preocupantes, visto que o *S. aureus* causa diversas patologias, como pústulas, furúnculos e está relacionado à produção de toxinas estáveis a temperaturas altas, denominadas termoenterotoxinas, responsáveis por causar doenças transmitidas por alimentos (FORSYTHE, 2013).

Isso reforça mais ainda a importância da inspeção dos produtos lácteos, para que se tenha um processo seguro desde o início, começando com a higiene do rebanho e dos manipuladores, passando pelo uso do leite pasteurizado, do armazenamento em temperaturas ideais, para que assim se obtenha segurança alimentar, evitando casos de surtos de intoxicação (BUSNELLO, 2008).

5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos após a realização da pesquisa em amostras de queijo do tipo “Minas Frescal” em Formiga – MG, constatou-se que todas as amostras estavam com contagens elevadas de *Staphylococcus coagulase positiva (aureus)*, muito acima do estabelecido pela legislação, sendo assim, impróprias para consumo. Isso representa uma preocupação para a saúde pública, visto que estes queijos não são inspecionados e sua matéria-prima não passa por tratamento térmico.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 451. **Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços na área da Alimentação**. de 19 de setembro de 1997. Disponível em: <<https://sogi8.sogi.com.br/Arquivo/Modulo113.MRID109/Registro13499/documento%201.pdf>>.
- BHARATHY, S. *et al.* Prevalence of Staphylococcus aureus in raw milk: Can it be a potential public health threat? **International Journal of Advanced Research**, v. 3, n. 2, p. 801–806, 2015.
- BRASIL. **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Módulo 5, p. 1–95. 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf>.
- 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 923**. Comercialização do leite. Ministério da Marinha de Guerra, do exército e da Aeronáutica Militar. 31 de agosto de 1969. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1960-1969/decreto-lei-923-10-outubro-1969-375274-publicacaooriginal-1-pe.html>>.
- BRASIL. **Instrução normativa nº 57**. Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 11 de dezembro de 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/arquivos-credenciamento/instrucao-normativa-no-57-de-11-12-2013-criterios-e-requisitos-para-o-credenciamento-e-monitoramento-de-laboratorios-nova-redacao-nr.pdf>>.
- 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>>.
- BRASIL. **Portaria nº 352**. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 4 de setembro de 1997a. Disponível em: <<https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/legislacoes/portaria-ma-352-de-04-09-1997,644.html>>.
- BRASIL. **Portaria nº 451**. Boas Práticas de Produção de Alimentos e Prestação de Serviços na área da Alimentação. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. 19 de setembro de 1997b. Disponível em: <<http://oads.org.br/leis/1337.pdf>>.

BUSNELLO, S. R. **Aspectos da qualidade do leite e produção do queijo minas frescal**. Centro das Faculdades Metropolitanas Unidas. 2008

CÂMARA, S. A. V. *et al.* Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.32-36, 2002.

CARMO, L. S. do *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.

FAGUNDES, H. *et al.* Occurrence of *Staphylococcus aureus* in raw milk produced in dairy farms in São Paulo state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 376–380, 2010.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F. Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1315–1320, 2004.

FEITOSA, T. *et al.* Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 162–165, 2003.

FILHO, E. S. de A.; FILHO, A. N. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal.” **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 578–580, 2000.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Artmed: 2013.

JONES, T. F. *et al.* Family Outbreaks of Invasive Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, n. 9, p. 76–78, 2006.

LAMAITA, H. C. *et al.* *Staphylococcus* sp counting and detection of staphylococcal enterotoxins and toxic shock toxin syndrome from cooled raw milk. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 702–709, 2005.

LEITE, M. M.; LIMA, M. G.; REIS, R. B. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo minas tipo frescal. **Higiene Alimentar**. 2005.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063–1067, 2001.

LOIR, Y. Le; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 7–28, 2003.

MARTINS, E. **Associação de bacteriocinas e bactérias lácticas para inibição de *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal**. Universidade Federal de Viçosa. 2012.

PAULA, J. C. J. de; CARVALHO, A. F. de; FURTADO, M. M. Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à saga. **Revista Do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 367/368, p. 19–25, 2009.

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.

PINTO, F. G. S. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arquivos Do Instituto Biológico**, v. 78, n. 2, p. 191–198, 2011.

ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n. 2, p. 263-272, 2006.

RODAS, M. A. de B. *et al.* Leite pasteurizado e ultra-alta temperatura (UAT): Avaliação do índice crisoscópico e valor de pH. **Bol Inst Adolfo Lutz**, v.24, n. 1, p. 57-59, 2014.

RODRIGUES, K. L. *et al.* Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 297-299, 2004.

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.

SÁ, M. E. P. de *et al.* Importância do *Staphylococcus aureus* nas mastites subclínicas: pesquisa de enterotoxinas e toxina do choque tóxico, e a relação com a contagem de células somáticas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 5, p. 320–326, 2004.

SABOYA, L. V. *et al.* Efeitos Físico-Químicos Da Adição De Leite Reconstituído Na Fabricação De Queijo Minas Frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 4, p. 368–378, 1998.

SANTANA, E. H. W. *et al.* Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.

SANTOS, A. L. dos *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Bras. Patol. Med Lab**, v. 43, n. 6, p. 413–423, 2007.

SANTOS, T. S.; CARVALHO, D. de A. Atuação e importância do médico veterinário na cadeia produtiva do leite. **Veterinária Em Foco**, v. 10, n. 2, p. 149–158, 2013.

SILVA, T. T. da. **Análise microbiológica e físico-química do leite cru comercializado sem inspeção no município de Candeias - MG. Centro Universitário de Formiga.** 2017.

SILVA, F. T. Queijo Minas Frescal. **EMBRAPA**, v. 1, n. 1, p. 1–50, 2005.

STAMFORD, T. L. M. *et al.* Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 41–45, 2006.

TORTORA, G. J. *et al.* **Microbiologia**. 10 ed. Artmed: 2012.

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