



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS PROFa. CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DO QUEIJO DE
COALHO ARTESANALMENTE PRODUZIDO**

GLADIANE DOS SANTOS NUNES

Bom Jesus-PI

2017

GLADIANE DOS SANTOS NUNES

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE
RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DO QUEIJO DE
COALHO ARTESANALMENTE PRODUZIDO**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior

Dissertação apresentada ao *Campus* Profa. Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Zootecnia, na área de Produção Animal (Nutrição e produção de alimentos), para obtenção do título de Mestre.

Bom Jesus-PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial de Bom Jesus
Serviço de Processamento Técnico

N972q Nunes, Gladiane dos Santos.
Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos
antimicrobianos do queijo de coalho artesanalmente produzido.
/ Gladiane dos Santos Nunes. – 2017.
72 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Campus Prof.^a Cinobelina Elvas, Programa de Pós-Graduação
em Zootecnia, área de Produção Animal (Nutrição e produção
de alimentos), Bom Jesus-Pi, 2017.

Orientação: “Prof. Dr. Antonio Augusto Nascimento
Machado Júnior”.

1. Alimentos. 2. Enterotoxinas. 3. *Escherichia coli*.
4. Saúde pública. Título I.

CDD 637.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS PROFa. CINOBELINA ELVAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


Título: Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos do
queijo de coalho artesanalmente produzido

Autor: Gládiane dos Santos Nunes

Orientador: Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior

Aprovada em: 31 de Agosto de 2017

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Manoel Lopes da Silva Filho
CPCE/UFPI



Prof. Dra. Felicianna Clara Fonsêca Machado
CPCE/UFPI



Prof. Dr. Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior
CPCE/UFPI

Bom Jesus-PI
2017

Dedico

Ao Deus Pai, redentor de toda essa jornada.

Aos meus pais Luiz Carlos Nunes Lacerda e Eva Maria dos Santos Nunes pelo apoio incondicional de sempre, sem o qual, eu jamais teria concluído mais esse trabalho.

Aos meus irmãos, Gladinei Nunes e Ranile Nunes pelo amor e cuidados.

À minha sobrinha Lívia.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Piauí, *Campus* Professora Cinobelina Elvas pela oportunidade de realização desse curso, por meio do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Agradeço a todos os meus familiares pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior pela orientação, compreensão, amizade, confiança e paciência durante todo o decorrer do mestrado.

À Profa. Dra. Felicianna Clara Fonseca Machado, por todo o apoio, amizade, compreensão, correções e contribuição em todo o trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão de bolsa (CAPES/UFPI).

Às minhas queridas amigas, essenciais durante essa jornada Juanna D'arc Fonseca dos Santos e a Maria Santos Oliveira; sou imensamente agradecida por ter contado com suas ajudas e palavras amigas.

Aos que ajudaram nas análises laboratoriais: Neorô Rodrigues, André, Samara Castro, Vanusa Castro, Eva Lopes, Cristiano Oliveira, Kamila, Laíze Falcão, Joisiane Santos, Helga Germana e Wlignésio; a contribuição de vocês foi muito importante para a conclusão deste trabalho.

A todos os membros da banca examinadora, sou muito grata por toda contribuição.

A todos os amigos e colegas das turmas de mestrado: a companhia de todos vocês fez desta jornada, algo mais leve.

A todos os meus amigos, em especial ao Manoel Crispim, Ligiane Siqueira, João Irene Filho, Tamires Dias, Luana Saraiva, Gláucia Brandão, Renato Mendes dos Santos, André Campêlo, Elizângela Menezes, Hudblan Hudson, Homero Rocha, Morgana Santos, Marilene Maciel, Nhaira Maia, Ismael Cortêz, Andréia Rosal, Naira Moura, Raílson Santos, sou eternamente grata por poder contar com vocês.

Aos professores Manoel Lopes e Leonardo Atta, por terem concedido equipamentos durante as análises.

Agradeço em especial, à Profa. Dra. Luciana Pereira Machado, que sempre incentivou meu crescimento pessoal e profissional; por cada puxão de orelha e cada palavra de apoio, desde a graduação, durante o mestrado e para a vida.

Enfim, minha eterna gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a finalização deste trabalho.

“Até aqui nos ajudou, o Senhor”

(1 Samuel 7-12b)

BIOGRAFIA

Gladiane dos Santos Nunes nasceu na cidade de Parnaguá-PI, no dia 01 de outubro de 1989, filha de Eva Maria dos Santos Nunes e Luiz Carlos Nunes Lacerda. Em março de 2009, ingressou no *Campus* Profa. Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, quando iniciou a graduação no curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, na cidade de Bom Jesus-PI. Concluiu a graduação no segundo semestre do ano de 2013. No ano de 2015, foi aprovada no mestrado em Zootecnia, com linha de pesquisa Nutrição Animal e Produção de Alimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
ABSTRACT GENERAL	xiv
INTRODUÇÃO GERAL.....	xv
CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
Qualidade microbiológica do queijo de coalho fabricado com leite cru.....	18
1 Introdução	19
2 Histórico do queijo	20
3 Origem do queijo de coalho artesanal no Brasil	22
4 Legislação do queijo de coalho	22
5 Qualidade da matéria prima	23
6 Importância na economia	25
7 Microbiologia do queijo de coalho	26
7.1 Microrganismos benéficos	26
7.2 Microrganismos indicadores de qualidade	27
7.2.1 Bolores e leveduras	28
7.2.2 Coliformes totais e termotolerantes.....	29
7.2.3 Microrganismos aeróbios mesófilos.....	29
7.2.4 Microrganismos psicrotróficos.....	30
7.3 Microrganismos patogênicos.....	30
7.3.1 <i>Salmonella</i> spp.	30
7.3.2. <i>Escherichia coli</i>	31
7.3.3 <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
7.3.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	32
7.3.5 <i>Brucella</i> spp.....	33
7.3.6 <i>Mycobacterium bovis</i>	34
8 Controle de qualidade microbiológica do queijo de coalho	35
8.1 Quantificação de microrganismos	35
8.1.1 Contagem padrão em placas.....	36
8.1.2 Placas prontas (Petrifilm™)	36
8.1.3 Citometria de fluxo.....	37
8.2 Determinação do número mais provável.....	37
8.3 Pesquisa de patógenos	38

8.3.1 Técnicas moleculares	38
9 Importância do queijo de coalho na saúde pública	39
10 Considerações finais.....	40
Referências.....	41
CAPÍTULO 2 – Queijo de coalho artesanal como veiculador de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus coagulase positiva</i>.....	48
Introdução	50
Material e métodos.....	51
Resultados e discussão	53
Conclusão	56
Referências.....	56
CAPÍTULO 3 – Queijo de coalho artesanal como veiculador de <i>Escherichia coli</i> resistentes a antimicrobianos	59
Introdução	61
Materiais e métodos	62
Resultados	63
Discussão.....	64
Conclusão.....	67
Referências.....	67
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras em queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017 53

Tabela 2. Distribuição de amostras de queijo de coalho artesanal, segundo a faixa de contaminação por coliformes totais e termotolerantes em queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017 55

Tabela 3. Distribuição de amostras de queijo de coalho artesanal, segundo faixa de contagem de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positivo em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017..... 55

Capítulo 3

Tabela 1. Distribuição, segundo o perfil de resistência, de cepas *Escherichia coli* isoladas a partir de queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017.....63

Tabela 2. Distribuição de cepas classificadas como resistentes, intermediárias e sensíveis aos antimicrobianos, em *Escherichia coli* isoladas do queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%-Porcentagem

°C- Grau Celsius

µg- Micrograma

a. C.- Antes de Cristo

ADB- Ágar Batata Dextrose

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP- Água Peptonada

B. abortus- Brucella abortus

BAL- Bactérias Ácido Láticas

BAM- *Bacteriological Analytical Manual*

CPCE- *Campus Professora Cinobelina Elvas*

DNA- *Deoxyribonucleic Acid*

DTAs- Doenças Transmitidas pelos Alimentos

E. COLI- *Escherichia coli*

EMB – *Eosin Metilen Blue*

g- Grama

IN- Instrução Normativa

ISSN- *International Standard Serial Number*

L. monocytogenes- Listeria monocytogenes

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL- Mililitro

N- Número

NMP- Número Mais Provável

OMS- Organização Mundial da Saúde

PCR- *Polymerase Chain Reaction*

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

RNA- *Ribonucleic Acid*

spp.- Espécies

SUT- Sulfametoxazol+Trimetropim

TM- *Trademark*

UFC- Unidade Formadora de Colônia

UFPI- Universidade Federal do Piauí

RESUMO GERAL

NUNES, G. dos S. Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos do queijo de coalho artesanalmente produzido. 2017. 72fl. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2017.

O queijo de coalho é um alimento muito consumido no Nordeste do Brasil. Além do queijo de coalho industrializado, o produto genuinamente elaborado de forma artesanal conquista os consumidores por preservar características regionais, pela crença de ser mais benéfico, pelo sabor e, em alguns casos, também devido ao preço mais acessível. A fabricação artesanal do queijo de coalho é feita a partir do leite cru e sob condições insatisfatórias de higiene. Portanto, a contaminação microbiológica deste produto assume importância para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos. Assim, objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica e o perfil de resistência aos antimicrobianos do queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI. Foram adquiridas 30 amostras de queijo de coalho artesanal e encaminhadas ao laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Piauí, para às análises. Realizaram-se, contagem de bactérias aeróbias mesófilas, de bolores e leveduras; determinação do número mais provável de coliformes; confirmação de *Escherichia coli*; pesquisa de *Salmonella* spp.; detecção de *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva e; perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli*. Houve crescimento de bactérias aeróbias mesófilas em 100% das amostras analisadas e de bolores e leveduras em 73,33%. Detectaram-se a presença de coliformes totais em 100% enquanto que os coliformes termotolerantes em 60% das amostras analisadas. Confirmação de *Escherichia coli* em 46,67% das amostras analisadas. *Staphylococcus* spp. foram detectados em 100% e *Staphylococcus* coagulase positiva em 96,67% das amostras analisadas. Não foi observada a presença de *Salmonella* spp.. Os isolados de *Escherichia coli* apresentaram resistência a nitrofurantoína (64,29%), ampicilina (50%), tetraciclina (21,43%), sulfametoxazol+trimetropim (14,28%) e cloranfenicol (7,14%). O queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI apresenta qualidade microbiológica insatisfatória para o consumo e pode servir de veículo de transmissão de bactérias patogênicas resistentes a diferentes agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: alimentos, enterotoxinas, *Escherichia coli*, saúde pública

ABSTRACT GENERAL

NUNES, G. dos S. Microbiological quality and antimicrobial resistance profile of artisanal curd cheese. 2017. 72fl. Dissertation (Master in Animal Science) – Federal University of Piauí, Bom Jesus, 2017.

The curd cheese is a very consumed food in Northeast Brazil. In addition to the industrialized curd cheese, the genuinely crafted product conquers consumers by preserving regional characteristics, by the belief of being more beneficial, by the taste and in some cases also by the more affordable price. The artisanal manufacture of curd cheese is made from raw milk and under unsatisfactory hygiene conditions. Therefore, the microbiological contamination of this product assumes importance for public health because of the risk of causing foodborne diseases. Thus, the aim was to evaluate the microbiological quality and antimicrobial resistance profile of the artisanal curd cheese commercialized in Bom Jesus-PI. Thirty samples of artisanal curd cheese were collected and sent to the Food Microbiology laboratory of the Federal University of Piauí for analysis. Counts of mesophilic aerobic bacteria, mold and yeast; determination of the most probable number of coliforms; confirmation of *Escherichia coli*; search for *Salmonella* spp.; detection of *Staphylococcus* spp. and coagulase positive *Staphylococcus* and; antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli*. There was growth of aerobic mesophilic bacteria in 100% of the analyzed samples and of molds and yeasts in 73.33%. The presence of total coliforms was detected in 100% while the thermotolerant coliforms were detected in 60% of the analyzed samples. Confirmation of *Escherichia coli* in 46.67% of the samples analyzed. *Staphylococcus* spp. were detected in 100% and *Staphylococcus* coagulase positive in 96.67% of the samples analyzed. *Escherichia coli* isolates were resistant to nitrofurantoin (64.29%), ampicillin (50%), tetracycline (21.43%), sulfamethoxazole + trimethoprim (14.28%) and chloramphenicol (7.14%). The artisanal curd cheese commercialized in Bom Jesus-PI presents microbiological quality unsatisfactory for consumption and can serve as a vehicle for the transmission of pathogenic bacteria resistant to different antimicrobial agents.

Key words: food, enterotoxins, *Escherichia coli*, public health

INTRODUÇÃO GERAL

O queijo de coalho artesanal é bastante consumido na região Nordeste e representa grande importância na economia da região, principalmente para a agricultura familiar. Os queijos em geral, são produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica (AMORIM et al., 2014). Assim, especialmente os queijos frescos artesanais, têm sido frequentes veículos de agentes patogênicos de origem alimentar, pois, são comumente fabricados com leite cru sem passar por pasteurização ou processo térmico equivalente (FEITOSA et al., 2003).

Os queijos artesanais são amplamente consumidos, apesar de serem elaborados em condições inadequadas de higiene, sem apresentar padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação vigente. O consumo deste tipo de queijo, é motivado por costumes alimentares antigos, já que parte dos consumidores acreditam que esses produtos sejam mais benéficos à saúde, além de possuírem preço mais acessível (SANTOS, 2011).

Várias pesquisas relatam que a qualidade microbiológica dos queijos está atrelada à qualidade da matéria prima, à manipulação excessiva, a não adoção das boas práticas de fabricação, ao teor de umidade do queijo (ZOCHE et al., 2012; AMORIM et al., 2014). Como consequência das condições deficientes durante a obtenção e fabricação de queijos artesanais, observam-se alta contagem microbiana por bactérias patogênicas, como a *Salmonella* spp. *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. (OLIVEIRA et al., 2010; DANTAS, 2012; FAVA et al., 2012).

Além dos aspectos concernentes à precariedade da fabricação do queijo de coalho artesanal, outro entrave, é o aumento de bactérias patogênicas isoladas, que apresentam resistência aos agentes antimicrobianos, especialmente os utilizados na produção animal (GUIMARÃES et al., 2012; EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016). Como existe uma grande variedade de substâncias com atividade antimicrobiana em sistemas de produção animal, usados na prevenção, terapia e como melhoradores de crescimento, há o favorecimento de resistência das bactérias aos agentes antimicrobianos pelo uso desregrado e sem orientação técnica adequada (SANTOS, 2011; GUIMARÃES et al., 2012). Além disso, medicamentos usados para fins profiláticos ou terapêuticos em medicina veterinária, pertencem à mesma classe dos agentes antimicrobianos utilizados na medicina humana. Este é, portanto, um problema de saúde pública, pois possibilita a veiculação de bactérias resistentes para a população consumidora (EVANGELISTA-BARRETO et al., 2016).

Tendo em vista a grande importância socioeconômica do queijo de coalho artesanal para a região, e necessidade de que se conheçam as condições higiênicas de produção e comercialização do produto, objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica e o perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* do queijo de coalho artesanal, comercializado em Bom Jesus-PI.

Esta dissertação foi estruturada conforme as normas de elaboração de dissertações do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFPI da seguinte forma: Introdução; Capítulo 1. Revisão Bibliográfica intitulada “Qualidade microbiológica do queijo de coalho artesanalmente produzido”, elaborada de acordo com as normas da Revista *Pesquisa Agropecuária Brasileira* (<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>); Capítulo 2 - artigo científico intitulado “Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli* e *Staphylococcus coagulase positiva*”, elaborado de acordo com as normas da Revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (<http://www.abmvz.org.br/>); Capítulo 3 - artigo científico intitulado “Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos”, elaborado de acordo com as normas da Revista *Acta Scientiae Veterinariae* (<http://www.ufrgs.br/actavet/>); e Considerações Finais.

CAPÍTULO 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Elaborada de acordo com as normas da Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira
(ISSN: 1678-3921)
(<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab>)

1 **Qualidade microbiológica do queijo de coalho artesanalmente produzido**

2
3 Gladiane do Santos Nunes⁽¹⁾ e Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior⁽¹⁾

4
5 ⁽¹⁾Universidade Federal do Piauí, *Campus* Professora Cinobelina Elvas, Bom Jesus-PI, CEP 64900-000. E-mail:
6 gladianenunes@outlook.com, machadojunior@gmail.com

7
8 **Resumo** - O queijo de coalho artesanal é um alimento muito consumido na região Nordeste do
9 Brasil. Por fazer parte da alimentação de pessoas de todas as classes sociais, este queijo assume
10 grande relevância social e econômica. Além disso, a fabricação artesanal favorece a
11 manutenção das características regionais e fortalece a crença de que seja um produto mais
12 natural e benéfico à saúde. Entretanto, tem sido frequente veículo de agentes patogênicos de
13 origem alimentar pois, são comumente fabricados em condições insalubres, com leite cru sem
14 passar por pasteurização ou processo térmico equivalente. Diante disso, objetivou-se com este
15 trabalho fazer uma revisão, a partir da consulta de artigos nacionais e internacionais sobre o
16 controle de qualidade microbiológica do queijo de coalho artesanal, e sua importância para a
17 obtenção de um produto de boa qualidade e que não represente riscos à saúde. Com base nesta
18 pesquisa, considera-se que diante da elevada susceptibilidade do queijo de coalho artesanal à
19 contaminação microbiana e do grande potencial para a veiculação de agentes patogênicos
20 causadores de doenças transmitidas pelos alimentos, torna-se necessário estabelecimento de
21 medidas de controle que incluam a educação de produtores e consumidores, no sentido de
22 melhorar a qualidade do produto oferecido à população e de minimizar riscos à saúde pública.

23
24 **Termos para indexação:** queijo artesanal, contaminação microbiana, saúde pública.

25 **Microbiological quality of artisanal curd cheese**

26
27
28 **Abstract** - Artisanal curd cheese is a very consumed food in the Northeast region of Brazil.
29 Being part of the food of people of all social classes, this cheese assumes great social and
30 economic relevance. In addition, the artisanal manufacture favors the maintenance of the
31 regional characteristics and strengthens the belief that it is a more natural product and beneficial
32 to health. However, it has been a frequent vehicle for pathogens of food origin, since they are
33 commonly manufactured in unhealthy conditions, with raw milk without undergoing

34 pasteurization or equivalent thermal process. In view of this, the aim of this work was to review,
35 based on the consultation of national and international articles on the microbiological quality
36 control of artisanal curd cheese, and its importance in obtaining a good quality product that
37 does not represent health risks. Based on this research, it is considered that in view of the high
38 susceptibility of artisanal curd cheese to microbial contamination and the great potential for the
39 transmission of pathogens causing foodborne diseases, it is necessary to establish control
40 measures that include education of producers and consumers, in order to improve the quality of
41 the product offered to the population and to minimize risks to public health.

42

43 Index terms: artisanal cheese, microbial contamination, public health.

44

45 **1 Introdução**

46

47 O leite é um alimento composto por vitaminas, minerais e proteínas, e seu consumo na
48 forma fluida ou como derivados lácteos, exerce papel importante na nutrição de pessoas de
49 todas as idades.

50 Parte do leite produzido no país, não é consumida na forma fluida, mas é utilizada na
51 elaboração de derivados lácteos, dentre os quais o queijo de coalho artesanal ou industrializado
52 ocupa papel de destaque na culinária nordestina e apresenta grande importância econômica,
53 especialmente para pequenos produtores (Amarante, 2015; Dias et al., 2015).

54 O queijo apresenta características nutritivas que o tornam excelente fonte de nutrientes
55 para o crescimento de microrganismos desejáveis e indesejáveis. A microbiota presente no
56 queijo pode ser proveniente da matéria-prima, mas também é incorporada ao produto durante a
57 sua manipulação (Amorim et al., 2014). Dentre os principais contaminantes do queijo, estão:
58 os coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., bactérias mesófilas
59 aeróbicas, bolores e leveduras (Freitas Filho et al., 2009; Dantas, 2012),

60 Apesar de existir legislação específica para regular a qualidade do queijo de coalho, a
61 produção artesanal normalmente ocorre sem obedecer a padrões estabelecidos. Assim, embora

62 seja obrigatória a pasteurização do leite ou tratamento térmico equivalente, na fabricação do
63 queijo de coalho comumente se utiliza leite cru, obtido sob condições insalubres e sem boas
64 práticas de fabricação (Silva et al., 2017). A legislação determina que queijos elaborados a partir
65 de leite cru, sejam submetidos a um período mínimo de maturação de 60 dias à temperatura
66 superior aos 5°C (Brasil, 1996). O não atendimento às normas estabelecidas, acaba por
67 favorecer o crescimento de microrganismos indesejáveis, de modo a diminuir a qualidade
68 microbiológica, e viabilizar a veiculação de patógenos causadores de doenças transmitidas por
69 alimentos (DTAs) (Evangelista-Barreto et al., 2016).

70 Com base no exposto, esta revisão de literatura faz uma breve abordagem sobre o
71 controle de qualidade microbiológica do queijo de coalho artesanal, e sua importância para a
72 obtenção de um produto de boa qualidade e que não represente riscos à saúde pública.

73

74 **2 Histórico do queijo**

75

76 O período em que se iniciou a elaboração de queijos é incerto, mas acredita-se que tenha
77 sido há cerca de 8.000 anos, nos vales dos rios Tigre e Eufrates. Os primeiros registros que
78 mencionam o leite e o gado bovino aparecem nos escritos sânscritos dos sumérios (4000 a. C.),
79 dos babilônicos (2000 a. C.) e nos hinos védicos. Provavelmente o queijo e os leites fermentados
80 tenham surgido acidentalmente ao se armazenar o leite em recipientes feitos com estômagos de
81 ruminantes. No leite assim contido, horas depois, ocorria a coagulação; e se o soro fosse
82 drenado, restava uma massa compacta que podia ser consumida fresca ou ser armazenada para
83 consumo dias ou meses depois. Desse modo, a partir de uma matéria prima perecível, o leite,
84 obtinha-se um alimento muito nutritivo, com características sensoriais muito agradáveis. Com
85 o tempo, o homem observou que o extrato procedente do estômago dos ruminantes jovens era

86 o responsável pela coagulação do leite, o que levou à preparação do coalho para elaborar o
87 queijo de forma dirigida (Chalita et al., 2009).

88 O processo de fabricação de queijos se difundiu por todas as civilizações antigas
89 localizadas no Oriente Médio. É certo que os egípcios fabricavam queijos, pois eles foram
90 encontrados nas tumbas, particularmente na de Tutankamón (1500 a.C.), descoberta intacta, em
91 1924. Existem também numerosas referências ao queijo no Antigo Testamento, como no livro
92 de Jó em 1520 a.C. e de Samuel em 1990 a.C.; há ainda registros desse alimento nos escritos
93 gregos, como o de Homero em 1184 a. C.. No Império Romano, o queijo era um alimento muito
94 apreciado (Ordonez Pereda, 2005).

95 Posteriormente as grandes emigrações de povos após a queda do Império Romano
96 contribuíram para difundir o modo de fabricar o queijo, como também, na Idade Média, os
97 deslocamentos realizados nas Cruzadas e as peregrinações a outros lugares sagrados. Contudo,
98 é muito provável que os monges tenham contribuído de forma muito significativa, nos
99 monastérios, para o aperfeiçoamento da tecnologia e o desenvolvimento de novas variedades.
100 Parecem atestar isso, os nomes que ostentam algumas das variedades atuais de queijos, como:
101 Saint Paulin, Fromage de Tamie ou Maroilles (Perry, 2004).

102 A elaboração de queijo era feita de forma artesanal até recentemente, e em muitas
103 regiões, esta forma de fabricação dos queijos se mantém. A falta de estudo acerca dos aspectos
104 microbiológicos e bioquímicos dificulta o controle do processo e a padronização do produto,
105 sobretudo no que concerne às diferenças regionais (Ordonez Pereda, 2005).

106 **3 Origem do queijo de coalho artesanal no Brasil**

107

108 O queijo de coalho é de origem tipicamente brasileira, especificamente do sertão do
109 Nordeste. O início da produção deste queijo remonta à chegada do rebanho bovino trazido pelos
110 portugueses. Na história popular, relatos descrevem que seu surgimento teve origem nas longas
111 viagens realizadas pelos vaqueiros, os quais transportavam o leite em um recipiente feito do
112 estômago de animais, chamado de matulão. O leite coagulado dava origem a uma massa muito
113 saborosa, que resultou na elaboração rústica e artesanal do queijo de coalho. Ao passar do tempo
114 foram sendo desenvolvidas outras formas de fabricação, usando-se sacos feitos de pano e
115 prensas de madeira, sem perder a rusticidade e a originalidade. O queijo de coalho é um produto
116 elaborado a partir da coalhada de leite de animais, ou seja, um concentrado proteico gorduroso,
117 através da coagulação da caseína por ação de enzimas (Amarante, 2015).

118

119 **4 Legislação do queijo de coalho**

120

121 A legislação que determina a qualidade microbiológica dos queijos no Brasil é
122 regulamentada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mediante a
123 portaria nº 146, de 7 de março de 1996 que aprova os regulamentos técnicos de identidade e
124 qualidade dos produtos lácteos (Brasil, 1996), e Instrução Normativa (IN) nº 30, de 26 de junho
125 de 2001 que aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade do queijo de coalho
126 (Brasil, 2001 b), e através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), mediante a
127 Resolução de Diretoria Colegiada nº 12, de 2 de janeiro de 2001 que estabelece os padrões
128 microbiológicos para alimentos (Brasil, 2001 a).

129 O MAPA define o queijo de coalho, como o produto que se obtém por coagulação do
130 leite, por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não

131 pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de
132 fabricação (Brasil, 2001 b).

133 Como características sensoriais, o queijo de coalho deve apresentar: consistência
134 semidura e elástica; textura compacta e macia; cor branco amarelada uniforme; sabor brando,
135 ligeiramente ácido, podendo ser salgado; crosta fina, sem trinca, normalmente sem forte
136 definição de casca; presença ou não de olhaduras de tamanhos variáveis (Brasil, 2001 b).

137 O queijo de coalho é uma variedade não maturada, e é classificado como um queijo de
138 média a alta umidade, de massa semi cozida ou cozida, e semi gordo ou gordo, por apresentar
139 teor de gordura entre 35 e 60%. Esse tipo de queijo é produzido a partir de leite pasteurizado
140 integral ou padronizado a 3% de matéria gorda. A adição de fermento láctico e cloreto de cálcio
141 é opcional, ao passo que quando houver inclusão de condimentos, estes devem ser mencionados
142 no rótulo (Brasil, 2001 b).

143 Quanto à qualidade microbiológica, a ANVISA, estabelece para o queijo de coalho o
144 limite máximo de coliformes a 45°C e estafilococos coagulase positiva de 5×10^2 Número Mais
145 Provável/grama (NMP/g) e Unidade Formadora de Colônia/grama (UFC/g), respectivamente.
146 Para *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*, o limite estabelecido é a ausência em 25g
147 (Brasil, 2001 a).

148

149 **5 Qualidade da matéria prima**

150

151 A qualidade do leite é um dos maiores entraves na produção e proveito de derivados
152 (Mattos et al., 2010). O leite comercializado informalmente é uma preocupação de saúde
153 pública, pois pode veicular uma série de doenças transmitidas por alimentos, se obtido e
154 manipulado em condições inadequadas, sendo um risco potencial para quem o consome
155 diretamente ou na forma de seus derivados (Makita et al., 2012).

156 O leite é definido pela Instrução Normativa nº 62 (IN 62) do Ministério da Agricultura,
157 Pecuária e Abastecimento, como o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em
158 condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas, e quando proveniente
159 de outros animais deve ser denominado segundo a espécie de procedência. Sua classificação é
160 feita de acordo com o modo de produção, composição e requisitos físico-químicos e biológicos,
161 recebendo a denominação A. As formas de apresentação são: leite cru refrigerado e leite
162 pasteurizado, e quanto ao teor de gordura, este último recebe a classificação em integral,
163 semidesnatado ou desnatado (Brasil, 2011).

164 A portaria 146/96 do Ministério da Agricultura determina que o leite a ser usado no
165 fabrico do queijo, deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à
166 pasteurização ou tratamento térmico equivalente para assegurar a fosfatase residual negativa,
167 que garantam a inocuidade do produto. Fica excluído da obrigação de ser submetido à
168 pasteurização ou outro tratamento térmico o leite higienizado que se destine à elaboração dos
169 queijos submetidos a um processo de maturação a uma temperatura superior aos 5°C, durante
170 um tempo não inferior a 60 dias (Brasil, 1996).

171 Uma vez que a qualidade microbiológica da água constitui ponto crítico no processo de
172 obtenção e refrigeração do leite, a Instrução Normativa nº 62 determina a cloração adequada da
173 água utilizada na limpeza e sanitização do equipamento de refrigeração e utensílios em geral
174 (Brasil, 2011).

175 O controle microbiológico do leite dar-se-á a partir dos cuidados com a sanidade do
176 animal, condições higiênicas durante a ordenha, bem como em todas as etapas de seu
177 processamento. Estas medidas, visam reduzir a contaminação microbiológica final e prolongar
178 a vida útil do leite e de seus derivados (Bersot et al., 2010).

179 A qualidade do leite pode interferir negativamente na produção e rendimento do queijo
180 e outros derivados, caso não atenda aos padrões estabelecidos pela legislação (Brasil, 2011).

181 Claeys et al. (2013), reforçaram que o consumo de leite cru pode trazer sérios prejuízos a saúde
182 do consumidor, uma vez que o leite é um excelente veículo para microrganismos patogênicos,
183 responsáveis por diversas doenças de origem alimentar. Segundo Bersot et al. (2010), a cultura
184 da maioria da população brasileira em se consumir leite não pasteurizado, resulta de fatores
185 como praticidade, preços baixos, cultura regional, além da crença de que o produto vindo direto
186 do produtor é mais benéfico que o industrializado, apesar deste consumo representar perigo à
187 saúde dos consumidores.

188

189 **6 Importância na economia**

190

191 Os queijos em geral têm sido utilizados ao longo do tempo, como a forma mais antiga
192 de preservar por mais tempo os mais importantes elementos nutritivos do leite (Andrade, 2006).
193 O queijo de coalho é utilizado como meio para um maior e melhor aproveitamento do leite,
194 sendo como meio de subsistência ou como complemento da renda dos pequenos produtores,
195 que precisam garantir a venda da sua produção.

196 A produção de queijo artesanal está inserida no mercado informal, por não cumprir a
197 legislação vigente. Esse tipo de produção, dinamiza a economia em municípios de pequeno
198 porte, ao estabelecer-se como renda principal ou como complemento financeiro das famílias
199 que o produzem; contribui para o fluxo de renda no município e diminui o êxodo rural
200 (Menezes, 2011).

201 Na região Nordeste, a produção de queijo de coalho artesanal tem grande importância
202 social e econômica, tanto por ser exercida em sua maioria por mulheres, como também por ser
203 uma das principais atividades na cadeia produtiva do setor leiteiro, dentro do segmento da
204 agricultura familiar. Em vários locais dessa região, essa atividade apresenta-se como a única
205 possibilidade de renda para os produtores familiares de leite (Araújo et al., 2012).

206

207 **7 Microbiologia do queijo de coalho**

208

209 Os microrganismos que compõem a microbiota dos derivados do leite, como o queijo,
210 são em grande parte oriundos do próprio leite e sua composição qualitativa e quantitativa é
211 influenciada pelas características genéticas do animal, pelo seu estado nutricional e de saúde,
212 pela sua alimentação e manejo. Estes microrganismos podem ser adquiridos a partir de diversas
213 fontes como, a ordenha, manipuladores, utensílios ou o ambiente em geral.

214 No queijo de coalho artesanal produzido com leite cru, há uma microbiota proveniente
215 da matéria-prima, mas pode haver também bactérias não lácticas, com potencial patogênico.
216 Dentre os microrganismos encontrados como contaminantes do queijo de coalho estão:
217 *Salmonella* spp.; *Staphylococcus aureus*; bolores e leveduras; *Escherichia coli* (*E. coli*) e outros
218 coliformes; *Listeria* spp.; *Brucella* spp.; e *Mycobacterium bovis* (Borges et al., 2008; Dantas,
219 2012; Cezar et al., Fonseca et al., 2016).

220

221 **7.1 Microrganismos benéficos**

222

223 A presença de microrganismos benéficos coopera para as características organolépticas,
224 conservação e condições higiênico-sanitárias do alimento (Freitas Filho et al., 2009). Na
225 elaboração de queijos de coalho, são normalmente utilizados fermentadores biológicos, que são
226 considerados microrganismos úteis, devido ao papel que desempenham na transformação de
227 matérias primas em produtos alimentícios. O metabolismo desses microrganismos resulta na
228 produção de um metabolito não tóxico, de natureza alimentícia (Jay, 2005).

229 Devido à grande importância dos fermentadores biológicos, durante a elaboração de
230 queijos, são intencionalmente adicionadas bactérias ácido lácticas (BAL). Essas bactérias

231 conferem ao alimento sabor, textura e aroma característicos. Sua utilização como culturas
232 iniciadoras em alimentos fermentados, se dá por possuírem ação probiótica e por produzirem
233 substâncias antimicrobianas, que contribuem para a bioconservação dos alimentos. As BAL
234 representam um grande grupo de microrganismos naturalmente encontrado em alimentos,
235 inclusive em leite e derivados, como os gêneros *Lactobacillus*, *Carnobacterium*,
236 *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Microbaterium*, *Propionibacterium*,
237 *Pediococcus*, *Weisella* (Medeiros, 2016).

238 Os derivados lácteos abrigam um enorme reservatório de diversidade genética
239 microbiana, o qual pode ter potencial biotecnológico e aplicado à indústria alimentar. As BAL,
240 compõem essa microbiota de forma significativa e são apontadas como as principais
241 responsáveis pela inibição e destruição de outros microrganismos, incluindo os patogênicos
242 (Medeiros, 2016).

243

244 **7.2 Microrganismos indicadores de qualidade**

245

246 A pesquisa de microrganismos indicadores de contaminação é utilizada para determinar
247 a qualidade microbiológica dos alimentos. O termo microrganismo indicador pode ser aplicado
248 a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de microrganismos, cuja presença ou
249 ausência proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do
250 histórico da amostra (Forsythe, 2013). Assim, indicadores podem ser grupos ou espécies que,
251 quando presentes em um alimento, sinalizam a ocorrência de contaminação de origem fecal,
252 sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de
253 poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou
254 armazenamento (Franco & Landgraf, 2008).

255

256 **7.2.1 Bolores e leveduras**

257

258 Os bolores e leveduras constituem um grande grupo de microrganismos, a maioria
259 originária do solo ou do ar. Os bolores são muito versáteis, sendo a maior parte deles capaz de
260 assimilar qualquer fonte de carbono derivada de alimentos. A maioria também é indiferente em
261 relação às fontes de nitrogênio, podendo utilizar o nitrato, os íons de amônia e o nitrogênio
262 orgânico. Já as leveduras são incapazes de assimilar nitrato e carboidratos complexos; algumas
263 necessitam de vitaminas ou não conseguem utilizar a sacarose como única fonte de carbono.
264 Esses fatores limitam a quantidade de alimentos susceptíveis à deterioração por leveduras (Silva
265 et al., 2010 b)

266 O crescimento de bolores e leveduras é mais lento do que o observado para bactérias,
267 em alimentos com baixa acidez e alta atividade de água. Em alimentos ácidos e de baixa
268 atividade de água o crescimento de fungos é maior, provocando deterioração. A temperatura
269 ideal de crescimento da maioria dos fungos encontra-se na faixa de 25 a 28°C, não crescendo
270 bem nas temperaturas mesófilas (35-37°C), e raramente nas temperaturas de bactérias
271 termotolerantes (45°C). O crescimento de fungos é possível sob condições de refrigeração
272 (5°C), porém, abaixo de 10°C negativos, os alimentos podem ser considerados
273 microbiologicamente estáveis em relação a este grupo (Silva et al., 2010 b).

274 Alves et al. (2009) avaliando trinta amostras de queijo de coalho de produção artesanal
275 comercializadas informalmente, obtidas em diversos locais de São Luís - MA, isolaram bolores
276 e leveduras em dez amostras, com contagens que chegaram a 10⁶ UFC/g. Esses autores
277 afirmaram que, apesar de não haver limites estabelecidos na legislação para esses
278 microrganismos em queijo de coalho, essas contagens apontam características higiênico-
279 sanitárias indesejáveis do produto.

280

281 **7.2.2 Coliformes totais e termotolerantes**

282

283 As bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais são capazes de fermentar a
284 lactose com produção de gás, a 35-37°C, por 48 horas. O grupo de coliformes termotolerantes
285 é um subgrupo dos coliformes totais, com capacidade de fermentar lactose com produção de
286 gás, quando incubadas às temperaturas de 44-45°C (Franco & Landgraf, 2008). A identificação
287 do grupo de coliformes em queijo de coalho, em elevada contagem, indica possível presença de
288 agentes patogênicos, como algumas espécies de *E. coli* que é um coliforme termotolerante,
289 indicador de contaminação por material de origem fecal, uma vez que faz parte da microbiota
290 intestinal do homem e animais homeotérmicos (Franco & Landgraf, 2008; Alves et al., 2009).

291 Embora a presença de um grande número de coliformes em alimentos seja indesejável,
292 sua eliminação é praticamente impossível (Jay, 2005). Freitas Filho et al. (2009), no seu
293 trabalho avaliando amostras de queijo de coalho no município de Jucati-PE, 50% das amostras
294 analisadas estavam fora dos padrões microbiológicos quanto aos níveis de coliformes
295 termotolerantes. Em um estudo realizado em Parnaíba-PI, em 16 amostras de queijo de coalho
296 comercializados em mercados públicos, observaram que 75% das amostras apresentavam
297 elevadas contagens de coliformes totais. Segundo os autores, isto indica condições
298 insatisfatórias de higiene em alguma das etapas de produção ou durante o armazenamento (Dias
299 et al., 2015).

300

301 **7.2.3 Microrganismos aeróbios mesófilos**

302

303 As bactérias aeróbias mesófilas compõem um grupo com capacidade de se multiplicar
304 entre 10°C e 45°C, apresentando temperatura ótima de crescimento de 32°C e incluem a maioria

305 dos contaminantes do leite. Atingem elevadas contagens quando o alimento se mantém à
306 temperatura ambiente (Jay, 2005).

307 O número de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados em um alimento tem sido
308 um dos indicadores microbiológicos da qualidade dos alimentos mais comumente utilizados,
309 pois reflete as condições higiênico-sanitárias do alimento (Franco & Landgraf, 2008).

310

311 **7.2.4 Microrganismos psicrotróficos**

312

313 As bactérias psicrotróficas são importantes deteriorantes de leite e derivados. Estes
314 microrganismos produzem enzimas lipolíticas e proteolíticas termorresistentes que agem sobre
315 os componentes lácteos e alteram as características físico-químicas e organolépticas, além de
316 diminuírem a vida de prateleira do leite e dos seus derivados (Mattos et al., 2010).

317

318 **7.3 Microrganismos patogênicos**

319

320 **7.3.1 *Salmonella* spp.**

321

322 As infecções causadas pelas bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas as causas
323 mais importantes de doenças transmitidas por alimentos. A maior parte dessas bactérias é
324 patogênica para o homem, apesar das diferenças quanto às características e à gravidade da
325 doença que causam (Germano & Germano, 2015).

326 As salmonelas são bacilos gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios
327 facultativos, catalase positivos, oxidase negativos, redutores de nitratos a nitritos e, geralmente,
328 móveis com flagelos peritríquios. Não são organismos exigentes, podendo se multiplicar em
329 diversas condições ambientais externas aos seres vivos. Desenvolvem-se facilmente em

330 alimentos, assim como em águas contaminadas com restos de alimentos ou fezes (Germano &
331 Germano, 2015).

332 Muitos trabalhos, avaliando a qualidade microbiológica de queijos de coalho, relataram
333 a presença de *Salmonella* spp. (Santana et al., 2008; Oliveira et al., 2010; Dantas, 2012; Sousa
334 et al., 2014).

335

336 **7.3.2. *Escherichia coli***

337

338 As bactérias do gênero *Escherichia coli* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. São
339 bactérias gram-negativas, não esporuladas, anaeróbios facultativos, oxidase-negativas,
340 fermentam glicose com produção de ácido e gás, mas a maioria fermenta lactose, também com
341 produção de ácido e gás. Apresentam motilidade por meio de flagelos peritríquios, multiplicam-
342 se em temperatura ideal de 44-45,5°C (Silva et al., 2010 b).

343 Vários trabalhos avaliando a qualidade do queijo de coalho, encontraram contaminação
344 microbiana por *E. coli*, indicando condições inadequadas de processamento do queijo de coalho
345 (Santana et al., 2008; Silva et al., 2010 a; Dantas, 2012; Fonseca et al., 2016).

346

347 **7.3.3 *Staphylococcus* spp.**

348

349 A intoxicação por *Staphylococcus* é a causa mais frequente de surtos de doenças
350 microbianas transmitidas por alimentos, em muitos países. O queijo tem sido apontado como
351 um dos principais alimentos envolvidos em surtos e casos esporádicos de intoxicação
352 estafilocócica (Borges et al., 2008).

353 *Staphylococcus aureus* é a mais resistente de todas as bactérias patogênicas não
354 formadoras de esporos. É um organismo gram-positivo, coagulase positivo, catalase positivo,

355 oxidase negativo e anaeróbio facultativo. A multiplicação de *S. aureus* ocorre entre 7 e 48°C,
356 com temperatura ideal de 37°C para o desenvolvimento (Germano & Germano, 2015).

357

358 **7.3.4 *Listeria monocytogenes***

359

360 *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) agente etiológico da listeriose, é uma
361 bactéria patogênica oportunista, capaz de sobreviver e multiplicar-se fora do organismo dos
362 hospedeiros em meios contendo nutrientes simples. Nos animais e no homem, *L.*
363 *monocytogenes* multiplica-se intracelularmente (Jay, 2005).

364 A listeriose é uma zoonose de relevante importância em saúde pública, visto que reside
365 na elevada suscetibilidade de gestantes e na severidade dos danos à saúde fetal, assim como,
366 decorre também da gravidade da manifestação clínica, resultante do comprometimento do
367 sistema nervoso central. No Brasil, a doença provocada pela *L. monocytogenes* em seres
368 humanos, veiculada por alimentos, ainda é pouco relatada, talvez por causa do elevado nível de
369 subnotificação de DTAs ou das dificuldades de diagnóstico diferencial com outras infecções
370 nervosas ou decorrentes da gravidez (Germano & Germano, 2015).

371 Em 1988, a Organização Mundial da Saúde (OMS), definiu que a listeriose é uma
372 doença de origem alimentar, e entre outras conclusões e recomendações, afirmou que a *L.*
373 *monocytogenes* é um contaminante ambiental amplamente distribuído, cujo modo de
374 transmissão primário para o homem é através da contaminação dos alimentos em qualquer
375 ponto da cadeia alimentar, desde a origem até a cozinha. E complementa que, a eliminação total
376 da *L. monocytogenes* de todos os alimentos é impraticável (OMS, 1988). *L. monocytogenes*
377 pode ser isolada a partir de uma grande variedade de alimentos, dentre os quais se destacam os
378 produtos lácteos, leite cru ou pasteurizado, sorvetes e queijos (Germano & Germano, 2015).

379 Branco et al. (2003) fazendo um estudo sobre a incidência de *L. monocytogenes* em
380 amostras de queijo de coalho produzido industrialmente e comercializado sob refrigeração,
381 encontraram o agente em 19% das amostras analisadas.

382

383 **7.3.5 *Brucella* spp.**

384

385 A brucelose é uma doença infectocontagiosa, de caráter zoonótico e tem ampla
386 distribuição mundial. O leite de vaca e os produtos lácteos contaminados por *Brucella abortus*
387 podem ocasionar brucelose no homem (Maurelio et al., 2016). Por sua vez, *Brucella melitensis*
388 podem ser veiculados ao homem e a outros animais, pelo consumo de queijos e/ou leite cru, de
389 cabra ou de ovelha infectadas (Germano & Germano, 2015). Por esse motivo, os queijos e,
390 principalmente, os queijos artesanais, são os produtos mais associados à veiculação de *Brucella*
391 spp. em países onde se elabora o produto a partir do leite não pasteurizado, pois a eliminação
392 do agente pelo leite é intermitente e persiste por meses (Zaffari et al., 2007; Germano &
393 Germano, 2015).

394 Em um estudo realizado por Mattos et al. (2010), avaliando a qualidade do leite cru
395 produzido na região agreste de Pernambuco, foram detectados animais positivos para brucelose
396 em 14 propriedades. Esse resultado evidencia o risco de consumo de leite sem tratamento
397 térmico adequado.

398 Bezerra (2014) pesquisando bactérias do gênero *Brucella* em 30 amostras de queijo de
399 coalho produzidos com leite cru, comercializados na cidade de Parnaíba-PI, confirmaram a
400 presença em seis amostras. Este autor salienta que o queijo de coalho produzido com leite cru
401 é veículo em potencial de *Brucella* spp. para os consumidores, o que evidencia a necessidade
402 de maior controle em toda a cadeia produtiva desse produto, pois a brucelose é uma das
403 principais zoonoses que acometem bovinos leiteiros.

404 O programa de controle da brucelose no Brasil, Argentina e México, países com elevada
405 produção pecuária, tem alcance limitado. Por sua vez, países de grande produção de carne
406 bovina, como Estados Unidos, Canadá, Austrália, Nova Zelândia, Grã-Bretanha e França,
407 possuem amplos programas de controle da infecção e, se ainda não erradicaram de todo a
408 infecção de seus rebanhos, estão em vias de fazê-lo (Germano & Germano, 2015).

409 Para prevenção e controle da brucelose na população humana, além de todo o controle
410 higiênico sanitário dos rebanhos, é necessário se assegurar que sejam expostos à venda apenas
411 produtos lácteos pasteurizados. Germano e Germano (2015) sugerem, que nos locais onde não
412 há pasteurização, sejam adotadas estratégias de educação sanitária, de modo que a população
413 adote o procedimento de ferver o leite cru e que seja desestimulado o consumo de queijos
414 frescos, sobretudo os de origem artesanal.

415

416 **7.3.6 *Mycobacterium bovis***

417

418 Em um estudo realizado por Cezar et al. (2016) avaliando cento e sete amostras de queijo
419 de coalho artesanal no estado de Pernambuco, três (2,8%) foram positivas para *Mycobacterium*
420 *bovis* (*M. bovis*). Eles afirmam que, a detecção de *M. bovis* em amostras de queijo artesanal
421 destinado ao consumo humano pode representar um risco para a saúde pública, e que as medidas
422 para prevenir e controlar a tuberculose em rebanhos bovinos devem ser melhoradas, afim de
423 prevenir a transmissão de *M. bovis*.

424 Castro et al. (2015) também relataram a presença de *Mycobacterium bovis*, em 10% das
425 amostras de queijo de coalho artesanal em Parnaíba, PI. Esses autores ressaltam que, essas
426 evidências moleculares do microrganismo em queijo de coalho artesanal produzido com leite
427 cru, servem como um alerta quanto a necessidade de maior controle da tuberculose bovina nos

428 rebanhos da região do baixo Parnaíba e maior vigilância quanto a tuberculose zoonótica no ser
429 humano.

430

431 **8 Controle de qualidade microbiológica do queijo de coalho**

432

433 Vários métodos laboratoriais podem ser utilizados para investigar a qualidade
434 microbiológica do queijo de coalho. Esses métodos podem ser divididos em três grupos:
435 métodos que dependem de cultivo seguido de caracterização fenotípica; métodos que dependem
436 do cultivo seguido de caracterização molecular; e métodos que dependem de apenas
437 caracterização molecular. Todos os métodos possuem vantagens e desvantagens (Beresford et
438 al., 2001). Eles fornecem informações sobre a qualidade da matéria prima utilizada, sanitização
439 da manipulação e, ao longo do processamento, adequação das técnicas utilizadas na preservação
440 dos queijos e a eficiência de transporte e armazenamento do produto final. Esses resultados
441 possibilitam ainda estimar a vida útil do produto, por meio da pesquisa de indicadores de
442 contaminação e da ocorrência de deterioração (Dias et al., 2015).

443

444 **8.1 Quantificação de microrganismos**

445

446 A quantificação de microrganismos, reflete a contaminação ambiental do próprio
447 alimento, bem como as condições de higiene e cuidados durante a produção. Existem vários
448 métodos para quantificação de microrganismos, e destes, os mais comumente utilizados são a
449 contagem padrão em placas, a contagem em placas prontas (Petrifilm™) e o método da
450 citometria de fluxo.

451

452 **8.1.1 Contagem padrão em placas**

453

454 A contagem em placas de vidro é usada principalmente para grupos de microrganismos
455 como os aeróbios mesófilos, psicrotróficos, coliformes totais e, bolores e leveduras. Essa
456 contagem representa o somatório de uma série de fatores como, o grau de contaminação da
457 matéria prima utilizada, higiene ambiental, cuidados no processamento para evitar a
458 multiplicação.

459 A contagem padrão em placas é um dos métodos disponíveis que faz a contagem
460 bacteriana total, o qual permite a visualização de colônias bacterianas formadas em placas de
461 Petri. Por este método, obtém-se o número de unidades formadoras de colônias por grama
462 (UFC/g) (Silva et al., 2010 b).

463

464 **8.1.2 Placas prontas (Petrifilm™)**

465

466 As placas prontas Petrifilm™ são sistemas prontos que consistem de meio de cultura
467 contendo diferentes tipos de nutrientes, géis hidrossolúveis a frio, corantes e indicadores
468 adequados à recuperação dos microrganismos pesquisados. A análise microbiológica realizada
469 por esse método, fica reduzida a três etapas: inoculação, incubação e leitura; dessa forma a
470 utilização das placas Petrifilm™ dispensa a preparação de vidrarias e meios de culturas. Outras
471 vantagens da utilização dessas placas é a facilidade de leitura, redução do espaço ocupado para
472 incubação e possibilidade de congelamento para leitura posterior. Além destas vantagens, essas
473 placas não quebram e não derramam, havendo assim, uma redução no risco de acidentes
474 laboratoriais (Fung, 2002).

475 Disponíveis a comercialização, são encontradas placas Petrifilm™ para contagem total
476 de bactérias aeróbias; coliformes e *Escherichia coli*; bolores e leveduras; *Staphylococcus*
477 *aureus* e *Listeria* spp. (Fung, 2002).

478

479 **8.1.3 Citometria de fluxo**

480

481 A citometria de fluxo é um método rápido para quantificar microrganismos, realizado
482 por um equipamento denominado citômetro. Essa técnica permite a quantificação de células
483 viáveis e mortas numa população de microrganismos. A suspensão celular que é injetada no
484 citômetro atravessa uma câmara, na qual encontra um feixe de radiação perpendicular ao fluxo.
485 Pelo controle da espessura de solução da amostra, o fluxo ocorre em regime laminar, com
486 passagem de uma célula por vez. Podem ser detectadas até 10.000 células por segundo. Tal
487 técnica analisa as células individualmente, permitindo a detecção de uma variedade de estados
488 fisiológicos existentes na população. A técnica gera resultados confiáveis e em um menor
489 espaço de tempo (Cassoli et al., 2007)

490

491 **8.2 Determinação do número mais provável**

492

493 A técnica do Número Mais Provável é também chamada de técnica dos tubos múltiplos,
494 utilizada para estimar a contagem de alguns tipos de microrganismos, como coliformes totais e
495 termotolerantes, *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. É considerada uma técnica de baixo custo,
496 que permite estimar a densidade da população empregando-se diferentes meios de cultivo,
497 analisando-se o crescimento celular microbiano através da leitura da turvação do meio e
498 determinação de produtos metabólicos no meio. O número mais provável por grama de produto
499 é determinado tendo como base a tabela estatística de Hoskins (Franco & Landgraf, 2008).

500 **8.3 Pesquisa de patógenos**

501

502 Os métodos convencionais para isolamento e identificação de microrganismos
503 patogênicos em alimentos incluem sementeiras em meios de cultura sólidos apropriados para o
504 isolamento de colônias e testes complementares para identificação desses patógenos. Essas
505 técnicas são baseadas nos métodos de microbiologia clássica descritos no Bacteriological
506 Analytical Manual (BAM) e, geralmente constituem-se em etapas de pré-enriquecimento e
507 enriquecimento seletivo, plaqueamentos seletivos e diferenciais e, confirmação (Mendonça,
508 2016).

509 Embora as técnicas tradicionais de pesquisa de patógenos sejam relativamente menos
510 onerosas, sensíveis, de fácil aplicação, permitirem a distinção entre células viáveis e inviáveis
511 de patógenos, apresentam a desvantagem de serem demasiadamente laboriosas e demandarem
512 muito tempo para a obtenção de resultados. Por essa razão, em alguns casos, são aplicadas
513 técnicas mais rápidas de detecção de patógenos.

514

515 **8.3.1 Técnicas moleculares**

516

517 As técnicas moleculares têm sido bastante utilizadas para a detecção, identificação e
518 caracterização de bactérias patogênicas em alimentos. Dentre essas técnicas, destacam-se as
519 fundamentadas na amplificação de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) pela reação
520 em cadeia da polimerase (PCR) (Gandra et al., 2008).

521 A técnica de reação em cadeia da polimerase é uma técnica altamente sensível, por meio
522 da qual, são obtidas milhões de cópias de sequências de ácidos nucleicos, por meio de uma
523 reação enzimática, partir de pequenas quantidades de sequências de DNA ou de ácido
524 ribonucleico (RNA) específicas. É realizada em um equipamento automatizado e

525 computadorizado, denominado termociclador, que promove a variação de temperaturas por
526 determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de
527 desnaturação e síntese do DNA (Gandra et al., 2008).

528 As vantagens que a PCR apresenta em relação aos métodos convencionais são: maior
529 poder de tipificação e discriminação; maior rapidez; bom limite de detecção; maior seletividade
530 e especificidade; maior potencial para automação; e a possibilidade de trabalhar com bactérias
531 que não são cultiváveis em meios de cultura normalmente utilizados (Gandra et al., 2008).

532 Embora essas técnicas moleculares de diagnóstico permitam a obtenção de resultados
533 rápidos, específicos e sensíveis, quando comparadas àquelas tradicionalmente utilizadas para a
534 detecção, um problema pode levar a interpretações errôneas. Em análise de microrganismos de
535 alimentos, é possível a ocorrência de resultados falso-positivos decorrentes de ampliações
536 geradas a partir de células mortas. Esta dificuldade, porém, pode ser resolvida com a adição de
537 um passo inicial de enriquecimento da cultura antes do PCR (Gandra et al., 2008; Zocche &
538 Silva, 2012).

539

540 **9 Importância do queijo de coalho na saúde pública**

541

542 Por ser elaborado basicamente de forma artesanal, o queijo de coalho está sujeito à
543 variações na maneira de elaborar o produto, segundo o costume de cada produtor. Essa
544 característica resulta na obtenção de queijos com características organolépticas distintas.

545 A sua produção é em maior parte nas pequenas queijarias ou fazendas, na maioria das
546 vezes com leite cru, sem nenhum cuidado higiênico-sanitário, expõe o produto à contaminação
547 por microrganismos patogênicos e/ou deterioradores, de modo a comprometer sua qualidade e
548 a saúde do consumidor. Evangelista-Barreto et al. (2016) avaliaram queijos artesanais e

549 relataram elevada carga microbiana no queijo de coalho, além de detectarem resistência e
550 multirresistência antimicrobiana.

551 Sousa et al. (2014) afirmaram que o consumo de queijo de coalho artesanal deve ser
552 motivo de preocupação para as autoridades da região onde são produzidos, devido possível
553 contaminação por agentes patogênicos, como estafilococos coagulase positiva e *Salmonella*
554 spp., pois esses agentes representam risco à saúde dos consumidores. De igual modo, Oliveira
555 et al. (2010), a contaminação microbiana dos queijos artesanais constitui um grave problema
556 de saúde pública pois, pode viabilizar a veiculação de agentes causadores de doenças
557 transmitidas por alimentos (DTAs), tais como *Escherichia coli*, *Samonella* spp. e
558 *Sthaphylococcus* spp..

559 A Agência Nacional de Vigilância Sanitária tem como uma das grandes preocupações,
560 os alimentos. Neste sentido, os alimentos de manipulação artesanal e os vendedores ambulantes
561 exigem uma constante e intensa fiscalização, pois muitas vezes, as matérias primas utilizadas
562 são de qualidade duvidosa e as condições de higiene são precárias. Apesar disso, grande parte
563 da população utiliza esses serviços, por praticidade ou pela falsa crença de que, por se tratar de
564 produtos artesanais, a qualidade é superior à dos estabelecimentos comerciais. Esse panorama
565 tem origem na situação econômica do país e nos altos índices de desemprego, que favorecem a
566 proliferação de vendedores informais em todas as regiões do país (Germano & Germano, 2015).

567

568 **10 Considerações finais**

569

570 Com base nesta pesquisa, considera-se que diante da elevada susceptibilidade do queijo
571 de coalho artesanal à contaminação microbiana e do grande potencial para a veiculação de
572 agentes patogênicos causadores de doenças transmitidas pelos alimentos, torna-se necessário o
573 estabelecimento de medidas de controle que incluam a educação de produtores e consumidores,

574 no sentido de melhorar a qualidade do produto oferecido à população e de minimizar riscos à
575 saúde pública.

576

577 **Referências**

578

579 ALVES, L.M.C.; AMARAL, L.A.; CORRÊA, M. do R.; SALES, S.S. Qualidade
580 microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de
581 São Luís – MA. **Pesquisa em Foco**, v.17, n.2, p. 01-13, 2009.

582 AMARANTE, J.O. do. **Queijos do Brasil e do mundo [recurso eletrônico]: para iniciantes**
583 **e apreciadores**. São Paulo, Mescla, 2015.

584 AMORIM, A.L.B. do C.; COUTO, E.P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M.
585 de A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção
586 industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.4, p. 364-367, 2014.

587 ANDRADE, A. A. de. **Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de**
588 **coalho produzido no estado do Ceará**. 2006. 127p. Dissertação (Mestrado) - Universidade
589 Federal do Ceará, Fortaleza.

590 ARAÚJO, J.B.C.; PIMENTEL, J.C.M.; PAIVA, F.F. de A.; MACEDO, B.A. **Produção**
591 **artesanal de queijo coalho, ricota e bebida láctea em agroindústria familiar: noções de**
592 **boas práticas de fabricação**. Brasília: Embrapa, 2012. 37p.

593 BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS, N.A.; BRENNAN, N.L.; COGAN, T.M. Recent advances
594 in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v.11, p.259-274, 2001.

595 BERSOT, L. dos S.; DAGUER, H.; MAZIERO, M.T.; PINTO, J.P. de A.N.; BARCELLOS,
596 V.C.; GALVÃO, J.A. Raw milk trade: profile of the consumers and microbiological and
597 physicochemical characterization of the product in Palotina-PR região. **Revista do Instituto de**
598 **Laticínios Cândido Tostes**, v.65, n.373, p.3-8, 2010.

599 BEZERRA, S.S. **Detecção da *Brucella* spp. em queijos de coalho produzidos com leite cru.**
600 2014. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife.

601 BORGES, M. de F.; NASSU, R.T.; PEREIRA, J.L.; ANDRADE, A.P.C. de; KUAYE, A.Y.
602 Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições
603 de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1431-
604 1438, 2008.

605 BRANCO, M.A. de A.C.; FIGUEIREDO, E.A.T. de; BORGES, M. de F.; SILVA, M.C.D. da;
606 DESTRO, M.T. Incidência de *Listeria monocytogenes* em queijo de coalho refrigerado
607 produzido industrialmente. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**,
608 v.21, n.2, p.393-408, 2003.

609 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 7 de março
610 de 1996. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos.
611 **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 1996.

612 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12,
613 de 2 de janeiro de 2001. Aprovar o Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para
614 alimentos. **Diário Oficial da União**, 10 de janeiro de 2001a.

615 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de
616 26 de junho de 2001. Aprovar os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de
617 Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga. **Diário**
618 **Oficial da União**, Brasília, 16 de julho de 2001b.

619 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de
620 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade
621 do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado,
622 o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento

623 Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. **Diário Oficial da**
624 **União**, Brasília, 30 de dezembro de 2011.

625 CASSOLI, L.D.; MACHADO, P.F.; RODRIGUES, A.C. de O.; COLDEBELLA, A.
626 Correlation study between standard plate count and flow cytometry for determination of raw
627 milk total bacterial count. **International Journal of Dairy Technology**, v.60, n.1, p.44-48,
628 2007.

629 CASTRO, K.N. de C.; SILVA, M.R.; FONSECA JÚNIOR, A.A.; LIMA, N.F.; ARAÚJO, F.R.
630 de; SOUZA, G.N. de; MOREIRA, M.A.S. ***Mycobacterium bovis* em queijo de coalho**
631 **artesanal em Parnaíba, Piauí**. I Congresso Internacional de Saúde Pública do Delta do
632 Parnaíba. 2015. Disponível em: <[https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-
633 /publicacao/1048476/mycobacterium-bovis-em-queijo-coalho-artesanal-em-parnaiba-piaui](https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/1048476/mycobacterium-bovis-em-queijo-coalho-artesanal-em-parnaiba-piaui)>.
634 Acesso em: 18 jun. 2017.

635 CEZAR, R.D.S.; LUCENA-SILVA, N.; BORGES, J.M.; SANTANA, V.L.A.; PINHEIRO
636 JÚNIOR, J.W. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of
637 Pernambuco, Brazil. **International Journal of Mycobacteriology**, v.5, p. 269-272, 2016.

638 CHALITA, M.A.N.; SILVA, R. de O.P. e; PETTI, R.H.V.; SILVA, C.R.L. da. Algumas
639 considerações sobre a fragilidade das concepções de qualidade no mercado de queijos no Brasil.
640 **Informações Econômicas**, v.39, n.6, p.77-88, 2009.

641 CLAEYS, W.L.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; BLOCK, J. de; DEWETTINCK, K.; DIERICK,
642 K.; ZUTTER, L. de; HUYGHEBAERT, A.; IMBERECHTS, H.; THIANGE, P.;
643 VANDENPLAS, Y.; HERMAN, L. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and
644 benefits. **Food Control**, v.31, n.1, p.251-262, 2013.

645 DANTAS, D.S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no**
646 **município de Patos, PB**. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de
647 Campina Grande, Patos.

648 DIAS, J. do N.; FONTINELE, L.L.; MACHADO, S.M. de O.; OLIVEIRA, J.S. de;
649 FERREIRA, G.P.; PEREIRA, A.C.T. da C. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de
650 leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. **Saúde e**
651 **Pesquisa**, v.8, n.2, p.277-284, 2015.

652 EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SANTOS, G.C. da F.; SOUZA, J. dos S.; BERNARDES,
653 F. de S.; SILVA, I.P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e
654 estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene**
655 **e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p.55-67, 2016.

656 FONSECA, B.C.P. da; REIS, J.N.; SANTOS, M.S. dos. Avaliação microbiológica de produtos
657 lácteos comercializados na cidade de Vitória da Conquista-Bahia. **Revista Saúde.Com**, v.12,
658 n.2, p.575-583, 2016.

659 FORSYTHE, S, J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
660 607p.

661 FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo:
662 Atheneu, 2008. 183p.

663 FREITAS FILHO, J.R. de; SOUZA FILHO, J.S.; OLIVEIRA, H.B. de; ANGELO, J.H.B.;
664 BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati-
665 PE. **Extensio: Revista Eletrônica de Extensão**, v.6, n.8, p.35-49, 2009.

666 FUNG, D. Rapid methods and automation in microbiology. **Comprehensive Reviews in Food**
667 **Science and Food Safety**. n.1, v.1, p.3-22, 2002.

668 GANDRA, E.A.; GANDRA, T.K.V.; MELLO, W.S. de; GODOI, H. da. Técnicas moleculares
669 aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum. Technology**, v.30, n.1, p. 109-
670 118, 2008.

671 GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 5 ed.
672 Barueri: Manole, 2015. 1077p.

673 JAY, J.M. **Microbiologia dos alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

674 MAKITA, K.; DESISSA, F.; TEKLU, A.; ZEWDE, G.; GRACE, D. Risk assessment of
675 staphylococcal poisoning due to consumption of informally-marketed milk and home-made
676 yoghurt in Debre Zeit, Ethiopia. **International Journal of food Microbiology**, v.153, n.2,
677 p.135-141, 2012.

678 MATTOS, M.R. de; BELOTI, V.; TAMANINI, R.; MAGNANI, D.F.; NERO, L.A.; BARROS,
679 M. de A. F.; PIRES, E.M.F.; PAQUEREAU, B.P.D. Qualidade do leite cru produzido na região
680 do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.1, p.173-182, 2010.

681 MAURELIO, A.P.V.; SANTAROSA, B.P.; FERREIRA, D.O.L.; MARTINS, M.T.A.; PAES,
682 A.C.; MEGID, J. Situação epidemiológica mundial da brucelose humana. **Veterinária e**
683 **Zootecnia**, v.23, n.4, p.547-560, 2016.

684 MEDEIROS, R.S. de. **Parâmetros de qualidade do queijo de coalho produzido na Paraíba:**
685 **indicadores químicos e microbiológicos**. 2016. 197p. Tese (Doutorado) - Faculdade de
686 Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

687 MENDONÇA, J.F.M. de. **Deteção de células viáveis de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus***
688 ***aureus* em queijo de coalho pela técnica de PCR em tempo real**. 2016. 70p. Dissertação
689 (Mestrado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

690 MENEZES, S. de S. M. Curd cheese: cultural tradition and social control strategy in the
691 northeast. **Revista de Geografia**, v.28, n.1, p.40-56, 2011.

692 OLIVEIRA, K.A. de; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J.E. de; MELO, L.E.H. de. Qualidade
693 microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho,
694 Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

695 OMS ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. **Groupe de travail de l'OMS sur les**
696 **listérioses alimentaires**. Genebra, 1988. Disponível em:

697 <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/226612/1/WER6309_62-63.PDF>. Acesso em: 15
698 abr. 2017.

699 ORDONEZ PEREDA, J.A. Queijos. In:_____. **Tecnologia de alimentos: alimentos de**
700 **origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.84-103.

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

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

706 SILVA, F.R. da; SANTANA, C.M. de; MELO, W.F.; TALABERA, G.G.; SARMENTO, W.E.;
707 SARMENTO SOBRINHO, W.; SÁ, J.A. de; MACHADO, A.V. Conservação e controle de
708 qualidade de queijos: Revisão. **Pubvet**, v.11, n.4, p.333-341, 2017.

709 SILVA, M.C.D. da; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J. de O. Influência dos
710 procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas
711 de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.69, n.2, p.214-221, 2010a.

712 SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS,
713 R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**.
714 4.ed. São Paulo: Varela, 2010b. 614p.

715 SOUSA, A.Z.B. de; ABRANTES, M.R., SAKAMOTO, S.M.; SILVA, J.B.A. da; LIMA, P. de
716 O.; LIMA, R. N. de; ROCHA, M. de O. C.; PASSOS, Y.D.B. Aspectos físico-químicos e
717 microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil.
718 **Arquivos do Instituto Biológico**, v.81, p.30-35, 2014.

719 ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. da. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais
720 comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.37,
721 n.3, p.862-867, 2007.

722 ZOCHE, F.; SILVA, W.P. da. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*
723 enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, v.23, n.2, p.187-193, 2012.

**CAPÍTULO 2 – Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli* e
*Staphylococcus coagulase positiva***

Elaborado de acordo com as normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia (ISSN: 1678-4162)
(<http://www.abmvz.org.br/>)

1 **Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli* e *Staphylococcus***
2 **coagulase positiva**

3
4 [Artisanal curd cheese as carrier of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* coagulase positive]

5
6 G. dos S. Nunes¹, A.A.N. Machado Júnior¹

7
8 ¹Universidade Federal do Piauí – UFPI/CPCE – Bom Jesus, PI

9
10 **RESUMO**

11
12 Objetivou-se com esta pesquisa, avaliar a qualidade microbiológica do queijo de coalho
13 artesanal comercializado no município de Bom Jesus, PI. As amostras de queijo apresentaram
14 crescimento de 100% de bactérias aeróbias mesófilas, 73,33% de bolores e leveduras, e 80%
15 de coliformes totais. Coliformes termotolerantes cresceram em 60% das amostras e confirmou-
16 se a presença de *Escherichia coli* em 46,67% das amostras analisadas. *Staphylococcus* spp.
17 foram detectados em 100% e *Staphylococcus* coagulase positiva em 96,67% das amostras
18 analisadas. Os resultados das análises do queijo de coalho artesanal comercializado em Bom
19 Jesus-PI, apontam que este produto apresenta-se em condições higiênico-sanitárias
20 insatisfatórias de acordo com a legislação brasileira vigente, pois apresentou contaminação
21 microbiana acima do limite estabelecido, incluindo uma elevada contaminação por
22 *Staphylococcus* coagulase positiva, os quais podem representar risco à saúde, pela possível
23 veiculação de enterotoxinas.

24
25 Palavras-chave: enterotoxinas, qualidade microbiológica, saúde pública.

26
27 **ABSTRACT**

28
29 *The aim of this research was to evaluate the microbiological quality of the artisanal curd cheese*
30 *commercialized in the municipality of Bom Jesus, PI. The cheese samples presented growth of*
31 *100% of mesophilic aerobic bacteria, 73.33% of molds and yeasts, and 80% of total coliforms.*
32 *Thermotolerant coliforms grew in 60% of the samples and the presence of *Escherichia coli* was*
33 *confirmed in 46.67% of the analyzed samples. *Staphylococcus* spp. were detected in 100% and*
34 **Staphylococcus* coagulase positive in 96.67% of the samples analyzed. The results of the*

35 *analysis of the artisanal curd cheese commercialized in Bom Jesus-PI indicate that this product*
36 *is presented under unsatisfactory hygienic-sanitary conditions in accordance with current*
37 *brazilian legislation, since it presented microbial contamination above the established limit,*
38 *including high contamination by Staphylococcus coagulase positive, which may represent a*
39 *health risk, due to the possible inclusion of enterotoxins.*

40

41 *Keywords: enterotoxins, microbiological quality, public health.*

42

43

INTRODUÇÃO

44

45 O queijo de coalho artesanal é um produto de grande importância na região Nordeste do
46 Brasil, pois além de possibilitar o aproveitamento do leite produzido, seu sabor peculiar tem
47 grande aceitação entre os consumidores. Por ser de fabricação artesanal, o queijo e outros
48 alimentos artesanais estão sujeitos ao modo de fabricação tradicional próprias da região onde
49 são produzidos, e isso confere a esses produtos, características sensoriais peculiares (Medeiros
50 *et al.*, 2017).

51 O processo de fabricação de queijos deve seguir normas rigorosas de higiene. Ademais,
52 a matéria prima deve ser oriunda de animais em condições sanitárias adequadas. Irregularidades
53 no controle da matéria prima, no seu beneficiamento e estocagem podem resultar em um
54 alimento de baixa qualidade e no risco de toxinfecções de origem alimentar (Zaffari *et al.*, 2007;
55 Fava *et al.*, 2012).

56 Vários trabalhos demonstram que a qualidade dos queijos está associada à qualidade da
57 matéria prima, às condições de manipulação e ao teor de umidade (Zocche *et al.*, 2012; Amorim
58 *et al.*, 2014). Em geral, a principal fonte de contaminação do queijo artesanal é o leite cru ou
59 quando submetido a tratamento térmico insuficiente. Além da contaminação proveniente da
60 matéria prima utilizada, uma grande variedade de microrganismos presentes no ambiente de
61 fabricação também é incorporada ao produto (Little *et al.*, 2008).

62 *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.* coliformes, bactérias aeróbias mesófilas, bolores
63 e leveduras estão entre os principais microrganismos isolados de queijos (Oliveira *et al.*, 2010;
64 Dantas, 2012). A manipulação, fabricação e comercialização do queijo de coalho artesanal, não
65 raro, são realizadas em condições de higiene inadequada, sobretudo em regiões em que não há
66 usina de beneficiamento de leite. Esse contexto, interfere decisivamente sobre a qualidade do
67 produto final, que chega à mesa do consumidor como possível veículo de patógenos causadores

68 de doenças transmitidas por alimentos. Assim, a contaminação microbiana do queijo, constitui-
69 se em problema de saúde pública.

70 Com base no exposto, objetivou-se nesta pesquisa, avaliar a qualidade microbiológica
71 do queijo de coalho artesanal comercializado no município de Bom Jesus, PI.

72

73

MATERIAL E MÉTODOS

74

75 Para este estudo, foram coletadas 30 amostras de queijo de coalho artesanal, mediante
76 compra em supermercados, padarias e na feira livre de Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e
77 fevereiro de 2017. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos de polietileno,
78 devidamente identificadas e transportadas em recipientes isotérmicos com gelo para o
79 laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Piauí - *Campus* Profa.
80 Cinobelina Elvas, em Bom Jesus-PI, onde foram realizadas as análises.

81 Com um bisturi esterilizado e flambado, retirou-se 50 gramas de cada uma das amostras
82 de queijo, transferindo-se, destas, 25 gramas para frascos de tampas rosqueáveis contendo 225
83 mL de água peptonada (AP) e outros 25 gramas para frascos contendo 225 mL de solução salina
84 peptonada a 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Em seguida, foram preparadas diluições
85 decimais até 10^{-4} em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, adicionados de
86 1 mL da diluição anterior, para formar a diluição seguinte.

87 Para contagem de bactérias aeróbias mesófilas, depositou-se 1 mL de cada diluição
88 decimal em placas de Petri vazias e esterilizadas, em duplicata. Imediatamente após a
89 inoculação, verteram-se sobre o inóculo de 15 a 20 mL do ágar padrão para contagem,
90 previamente esterilizado, fundido e resfriado a 45°C. Após a homogeneização e solidificação
91 do ágar, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas. Em seguida,
92 realizaram-se as contagens em placas contendo de 25 a 250 colônias (Brasil, 2003). Para
93 obtenção dos resultados, multiplicaram-se a média do número das colônias contadas nas placas
94 em duplicata pelo fator de diluição das placas correspondentes, fornecendo o número de
95 microrganismos aeróbios mesófilos por grama da amostra analisada.

96 A contagem de bolores e leveduras iniciou-se com o preparo das diluições decimais de
97 10^{-1} a 10^{-3} , em solução salina a 0,1%. A partir de cada diluição, foram transferidos 1 mL para
98 placas de Petri vazias e esterilizadas, em duplicata. Para o cultivo, utilizou-se o meio ágar
99 dextrose batata (ADB), que após fundido, esterilizado e resfriado a 45°C, foi adicionado ácido
100 tartárico a 10%, para inibição da microbiota bacteriana. Após a inoculação, verteram-se de 15

101 a 20 mL do meio sobre o inóculo, homogeneizando-se suavemente. Depois da solidificação, as
102 placas foram incubadas em estufa a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ por sete dias. Efetuaram-se as contagens em placas
103 contendo de 25 a 250 colônias. A média do número de colônias contadas nas placas em
104 duplicata foi multiplicada pelo fator de diluição das placas correspondentes, fornecendo o
105 número de microrganismos de bolores e leveduras por grama da amostra analisada (Brasil,
106 2003; Silva *et al.*, 2010 b).

107 Para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais, transferiu-se
108 1 mL de cada diluição decimal para 4 séries de 3 tubos de ensaio contendo 9 mL de caldo verde
109 brilhante bile lactosado 2% e um tubo de Durhan invertido para coleta de gás, após inoculação,
110 os tubos foram incubados a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Foram considerados positivos os tubos que
111 apresentaram formação de gás no tubo de Durhan. Os resultados obtidos foram analisados por
112 meio da tabela de NMP de coliformes totais por grama da amostra (Brasil, 2003).

113 Para a pesquisa de coliformes termotolerantes foi utilizado o caldo *Escherichia coli*,
114 com incubação em banho maria a $45,5\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ por 24 ± 2 horas. A partir dos tubos que
115 apresentaram formação de gás no tubo de Durhan, foram semeadas as placas com ágar Eosina
116 Azul de Metileno (EMB) e incubadas a 35°C por 24 horas (Brasil, 2003). As placas que
117 apresentaram características verde metálicas foram submetidas as provas bioquímicas de
118 produção de Indol e Citrato de Simmons descritas por Feng *et al.* (2002).

119 Para detecção de *Staphylococcus*, a partir da solução salina peptonada 0,1%, obteve-se
120 a diluição 10^{-1} . Logo após, prepararam-se as diluições decimais até 10^{-4} , em tubos de ensaio
121 contendo 9 mL de solução salina peptonada 0,1% estéril, transferindo-se sucessivamente
122 alíquotas de uma diluição para formar a diluição seguinte. Em seguida, transferiram-se
123 alíquotas de 0,1 mL das diluições para placas de Petri contendo ágar Baird Parker, e com auxílio
124 de uma alça de Drigalsky, espalhou-se o inóculo por toda a superfície do meio. As placas foram
125 incubadas a 37°C por 48 horas e, após esse período, selecionaram-se para contagem as placas
126 que continham entre 25 e 250 colônias. Consideraram-se como colônias típicas, as de coloração
127 negra brilhante, com anel opaco, rodeadas por um halo claro transparente. Estas foram
128 semeadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Infusão Cérebro-Coração, e incubadas
129 a 35°C por 24 horas. Após incubação, as colônias foram submetidas à coloração de Gram e às
130 provas de catalase e de coagulase para a identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva,
131 segundo os métodos analíticos oficiais descritos na IN nº 62 (Brasil, 2003).

132 Para a pesquisa de *Salmonella*, as amostras foram pré-enriquecidas em água peptonada
133 a 0,1% (AP) e incubadas a 42°C por 24 horas. Após esse período, iniciou-se o enriquecimento

134 seletivo, em que se transferiram alíquotas de 0,1 mL de cada amostra diluída em AP para tubos
135 de ensaio contendo 9,9 mL do caldo Rappaport-Vassiliadis, para incubação a $41\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por 24
136 h. Concluída a incubação, semearam-se placas contendo os meios ágar Hektoen Enteric, ágar
137 Mac Conkey, ágar *Salmonella-Shigella* e ágar Xilosina Lisina Desaxicolato, e estas foram
138 incubadas por 24 h a $35-37^{\circ}\text{C}$. As colônias típicas foram submetidas aos testes bioquímicos nos
139 meios Triple Sugar Iron e ágar Lisina Ferro (Brasil, 2003).

140

141

141 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

142

143 Houve crescimento de bactérias aeróbias mesófilas em todas as amostras de queijo de
144 coalho artesanal analisadas, com uma média de $2,9 \times 10^5$ UFC/g e contagens que chegaram a
145 $1,9 \times 10^6$ UFC/g (Tab. 1). Evangelista-Barreto *et al.* (2016) encontraram para o queijo de coalho
146 em Cruz das Almas-BA, a contagem média de $5,9 \times 10^8$ UFC/g, portanto mais elevada que o
147 presente estudo. Esses autores, atribuem a elevada presença desses microrganismos no queijo
148 de coalho, ao uso da matéria prima de origem não segura, má higienização de utensílios,
149 elaboração sob condições insalubres, e armazenamento e comercialização em temperaturas
150 inadequadas.

151 Embora a legislação (Brasil, 2001) não determine um padrão oficial para bactérias
152 aeróbias mesófilas, a enumeração destes, é uma indicação da qualidade higiênica de produção
153 e manipulação do queijo. Portanto, altas contagens destes microrganismos, indicam
154 deterioração e pobres condições higiênicas de produção.

155 Quanto à pesquisa de bolores e leveduras, houve crescimento em 22 (73,33%) das
156 amostras analisadas, com média de $4,9 \times 10^4$ UFC/g, com contagens de até $4,6 \times 10^5$ UFC/g
157 (Tab. 1). Resultados iguais foram encontrados por Silva *et al.* (2010 a), que avaliando queijo
158 de coalho comercializado em três laticínios do sertão de Alagoas, obteve uma média de 10^4 . A
159 legislação em vigor (Brasil, 2001) também não especifica limites microbiológicos para bolores
160 e leveduras em queijo de coalho, mas, uma vez que esses microrganismos são frequentes
161 contaminantes ambientais e deteriorantes, as contagens obtidas indicam condições higiênico-
162 sanitárias indesejáveis (Alves *et al.*, 2009). Além disso, a contaminação por bolores merece
163 atenção, pelo fato de que algumas espécies são produtoras de micotoxinas, capazes de causar
164 danos à saúde dos consumidores (Franco e Landgraf, 2008).

165 **Tabela 1.** Contagem de bactérias aeróbias mesófilas e bolores e leveduras em queijo de coalho
 166 artesanal comercializado em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017

Faixa de contagem (UFC/g)*	Número de amostras (%)	
	Bactérias aeróbias mesófilas	Bolores e leveduras
<3,0	-	8 (26,66%)
3 F 10 ²	-	7 (23,33%)
10 ² F 10 ³	4 (13,33%)	7 (23,33%)
10 ³ F 10 ⁴	7 (23,33%)	3 (10%)
10 ⁴ F 10 ⁵	18 (60%)	5 (16,66%)
10 ⁵ F 10 ⁶	1 (3,33%)	-

167 *UFC/g: Unidade Formadora de Colônias por grama
 168

169 Todas as amostras (30/30) analisadas apresentaram contaminação por coliformes totais,
 170 e destas 24 (80%) apresentaram contagem acima de 10³ NMP/g (Tab. 2). Ainda que a legislação
 171 RDC n° 12 (Brasil, 2001) não contemple a presença de coliformes totais, esses microrganismos
 172 refletem condições de elaboração do produto e esses resultados expressam a necessidade de
 173 melhorias nas práticas higiênicas de produção do queijo (Franco e Landgraf, 2008).

174 Verificou-se crescimento de coliformes termotolerantes em 60% das amostras avaliadas
 175 (Tab. 2), sendo consideradas aceitáveis, por apresentarem contaminação abaixo de 5 x 10²
 176 NMP/g, limite permitido pela legislação para queijo de coalho (Brasil, 2001). Feitosa *et al.*
 177 (2003) obtiveram resultados similares, que se situaram entre 3 e 7 NMP/g, e atribuíram o
 178 resultado às condições higiênicas, à qualidade da matéria prima utilizada e ao baixo nível de
 179 contaminação fecal. Resultados acima desse limite em 93,3% e 80,9% das amostras, foram
 180 encontrados por Santana *et al.* (2008) e por Oliveira *et al.* (2010), respectivamente. Oliveira *et*
 181 *al.* (2010), reforçam que os coliformes termotolerantes, são microrganismos pertencentes a um
 182 grupo que tem habitat no trato intestinal do homem e outros animais, e cuja presença em
 183 produtos alimentícios sugere que houve contato direto ou indireto do alimento com fezes, o que
 184 sinaliza risco para a saúde dos consumidores.

185

186 **Tabela 2.** Distribuição de amostras de queijo de coalho artesanal, segundo a faixa de
 187 contaminação por coliformes totais e termotolerantes em queijo de coalho artesanal
 188 comercializado em Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017

Faixa de contaminação	Coliformes (NMP/g)*	
	Totais (35°C)	Termotolerantes (45°C)
<3,0	-	12 (40%)
3 F 10 ²	2 (6,66%)	18 (60%)
10 ² F 10 ³	4 (13,33%)	-
>10 ³	24 (80%)	-

189 *NMP/g: Número mais provável por grama

190

191 A partir dos coliformes termotolerantes, confirmaram-se a presença de *Escherichia coli*
 192 em 14 (46,67%) das 30 amostras analisadas. Melo *et al.* (2013) confirmaram presença de *E.*
 193 *coli* em 59,26% das amostras de queijo artesanal serrano e afirmaram que esse achado indica
 194 contaminação fecal e sinaliza a ocorrência de outros enteropatógenos, devido a condições
 195 inadequadas de higiene durante ou após o processamento.

196 Das 30 amostras analisadas, em 100% houve crescimento de *Staphylococcus spp.*, com
 197 média de 3,2 x 10⁵ UFC/g e contagens que variaram de 4,1 x 10² a 6,7 x 10⁶ UFC/g (Tab. 3).
 198 Evangelista-Barreto *et al.* (2016) verificaram a presença de *Staphylococcus spp.* em todas
 199 (14/14) as amostras de queijo de coalho artesanal analisadas, na cidade de Cruz das Almas-BA,
 200 com média de contagem de 8,40 x 10⁷ UFC/g, portanto, superiores à encontrada no presente
 201 estudo. A RDC nº 12 não estabelece limite microbiológico para *Staphylococcus spp.* (Brasil,
 202 2001).

203

204 **Tabela 3.** Distribuição de amostras de queijo de coalho artesanal, segundo faixa de contagem
 205 de *Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus coagulase positivo* em Bom Jesus-PI, nos meses de
 206 janeiro e fevereiro de 2017

Faixa de contagem (UFC/g)*	Número de amostras (%)	
	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>
<3,0	-	1 (3,33%)
3 F 10 ¹	1 (3,33%)	3 (10%)
10 ¹ F 10 ²	-	6 (20%)
10 ² F 10 ³	8 (26,66%)	13 (43,33%)
10 ³ F 10 ⁴	11 (36,66%)	6 (20%)
10 ⁴ F 10 ⁵	9 (30%)	1 (3,33%)
>10 ⁵	1 (3,33%)	-

207 *UFC/g: Unidade formadora de colônias por grama

208

209 *Staphylococcus* coagulase positiva foram isolados de 96,67% (29/30) das amostras
210 analisadas, com contagens que chegaram a $1,6 \times 10^5$ UFC/g e uma média de $1,4 \times 10^4$ UFC/g
211 (Tab. 3). Um percentual de 66,6% (20/30) das amostras apresentou contagem que excedeu o
212 limite máximo estabelecido pela legislação brasileira que é de 5×10^2 UFC/g (Brasil, 2001).
213 Essa elevada contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva indica risco de consumo do
214 produto uma vez que *Staphylococcus aureus* é capaz de produzir enterotoxinas termoestáveis e
215 tem sido apontada como uma das principais bactérias associadas a surtos de doenças
216 transmitidas por alimentos (DTAs) (Oliveira *et al.*, 2010; Brasil, 2016).

217 Não foi verificada presença de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas. Assim, todas as
218 amostras apresentaram-se de acordo com a legislação brasileira vigente, que determina a
219 ausência do patógeno em 25g do produto (Brasil, 2001). Entre os fatores que poderiam ter
220 influenciado para o não isolamento de *Salmonella* spp., podem ser devido à sua baixa
221 capacidade de competição frente aos coliformes e *Staphylococcus* spp. (Brant *et al.*, 2007). De
222 igual modo, outros autores não encontraram *Salmonella* spp. nas amostras de queijo analisadas
223 (Brooks *et al.*; Fava *et al.*, 2012). Diferentemente, Santana *et al.* (2008) isolaram a presença de
224 *Salmonella* spp. em 26,7% das amostras analisadas de queijo de coalho comercializado em
225 Aracaju, SE.

226

227

CONCLUSÃO

228

229 Os resultados das análises do queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-
230 PI, apontam que este produto apresenta-se em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de
231 acordo com a legislação brasileira vigente, pois apresentou contaminação microbiana acima do
232 limite estabelecido, demonstrando presença e quantificação de microrganismos patogênicos
233 que representam riscos à saúde pública.

234

235

REFERÊNCIAS

236

237 ALVES, L.M.C.; AMARAL, L.A.; CORRÊA, M. do R.; SALES, S.S. Qualidade
238 microbiológica do leite cru e de queijo de coalho comercializados informalmente na cidade de
239 São Luís – MA. *Pesquisa em Foco*, v.17, n.2, p.1-13, 2009.

240 AMORIM, A.L.B. do C.; COUTO, E.P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M.
241 de A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo minas padrão de produção
242 industrial, artesanal e informal. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.73, n.4, p.364-367, 2014.

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

246 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC no
247 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.
248 *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 10/01/2001. p.1-54.

249 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa IN no 62,
250 de 26/08/2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de
251 Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*,
252 Brasília, 18/09/2003.

253 BRASIL. Ministério da Saúde. Surto de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2016.
254 <<http://portaldasaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro>> Acessado em: 17 mai. 2017.

255 BROOKS, J.C.; MARTINEZ, B.; STRATTON, J.; BIANCHINI, A.; KROKSTROM, R.;
256 HUTKINS, R. Survey of raw milk cheeses for microbiological quality and prevalence of
257 foodborne pathogens. *Food Microbiology*, v.31, n.2, p.154-158, 2012.

258 DANTAS, D.S. *Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município*
259 *de Patos, PB*. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande,
260 Patos.

261 EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SANTOS, G.C. da F.; SOUZA, J. dos S.; BERNARDES,
262 F. de S.; SILVA, I.P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e
263 estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Higiene e*
264 *Sanidade Animal*, v.10, n.1, p.55-67, 2016.

265 FAVA, L.W.; HERNANDES, J.F. de M.; PINTO, A.T.; SCHMIDT, V. Características de
266 queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. *Acta Scientiae*
267 *Veterinariae*, v.40, n.4, p.1-6, 2012.

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

272 FENG, P.; WEAGANT, S.D.; GRANT, M.A. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform
273 bacteria. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 4, 2002. Disponível em:
274 <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>.
275 Acessado em: 01 mar. 2017.

276 FRANCO, B.D.G. de M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu,
277 2008. 183p.

278 LITTLE, C.L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S.K.; HARRIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI,
279 V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw,
280 thermized or pasteurized milk in the UK. *Food Microbiology*, v.25, n.2, p.304-312, 2008.

281 MEDEIROS, J.M.S. de; CÂMPELO, M.C.S.; SILVA, J.B.A. da. Good manufacturing practices
282 of artisanal products in Northeastern Brazil. *Food Research*, v.1, n.3, p.1-6, 2017.

283 MELO, F.D.; DALMINA, K.A.; PEREIRA, M.N.; RAMELLA, M.V.; THALER NETO, A.;
284 VAZ, E.K.; FERRAZ, S.M. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo
285 artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico-químicas e o período de maturação. *Acta*
286 *Scientiae Veterinariae*, v.41, p.1-7, 2013.

287 OLIVEIRA, K.A. de; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J.E. de; MELO, L.E.H. de. Qualidade
288 microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho,
289 Pernambuco, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

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

293 SILVA, M.C.D. da; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J. de O. Influência dos
294 procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas
295 de queijo de coalho. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.69, n.2, p.214-221, 2010a.

296 SILVA, N. da; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS,
297 R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água*.
298 4.ed. São Paulo: Varela, 2010b. 614p.

299 ZAFFARI, C.B.; MELLO, J.F.; COSTA, M. da. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais
300 comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, v.37,
301 n.3, p.862-867, 2007.

302 ZOCHE, F.; SILVA, W.P. da. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*
303 enterotoxigênicos em queijos minas frescal. *Alimentos e Nutrição*, v.23, n.2, p.187-193, 2012.

**CAPÍTULO 3 – Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli*
resistentes a antimicrobianos**

Elaborado de acordo com as normas da Revista Acta Scientiae Veterinariae (ISSN: 1679-9216)
(<http://www.ufrgs.br/actavet/>)

1 **Queijo de coalho artesanal como veiculador de *Escherichia coli* resistentes a**
2 **antimicrobianos**

3 Artisanal curd cheese as carrier of antimicrobial resistant *Escherichia coli*

4 **Gladiane dos Santos Nunes¹ & Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior¹**

6 **ABSTRACT**

7 Concern over the presence of antimicrobial resistant bacterial isolates in food is increasing, the
8 isolation of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in curd cheese has been frequent. The aim
9 was to evaluate the antimicrobial resistance profile of *Escherichia coli* isolates obtained from
10 samples of artisanal curd cheese commercialized in Bom Jesus-PI. Thirty samples of artisanal
11 curd cheese were evaluated in January and February 2017 by disc diffusion method in Mueller
12 Hinton agar plates. The following antimicrobials were used: nalidixic acid, ampicillin,
13 ampicillin+sulbactam, cefotaxime, ceftriaxone, ciprofloxacin, chloramphenicol, gentamycin,
14 nitrofurantoin, sulfamethoxazole/trimethoprim and tetracycline. Of the total of 30 samples of
15 artisanal curd cheese analyzed, there was growth of *Escherichia coli*, in 46.67% (14). The
16 antimicrobial agents nalidixic acid, cefotaxime, ceftriaxone and ciprofloxacin showed 100%
17 sensitivity in all strains isolated. Among the 14 *E. coli* strains, resistance to antimicrobials was
18 found: nitrofurantoin (64,29%), ampicillin (50%), tetracycline (21,43%),
19 sulfamethoxazole/trimethoprim (14,28%) and chloramphenicol (7,14%). There were also
20 strains with intermediate drug resistance nitrofurantoin (14,28%), gentamicin (14,28%),
21 ampicillin+sulbactam (7,14%) and chloramphenicol (7,14%). The results demonstrate the
22 possibility of using strains of *Escherichia coli*, including strains resistant to antimicrobial agents
23 used in the treatment of infections, to demonstrate the risk to public health through artisanal
24 curd cheese. The importance of adopting measures for the implementation of good
25 manufacturing practices for artisanal curd cheese as well as measures to control the
26 indiscriminate use of antibiotics in order to reduce the appearance of resistant bacteria is
27 emphasized.

28
29 **Keywords:** *Enterobacteriaceae*, public health, food safety, cheeses.

30 **Descritores:** *Enterobacteriaceae*, saúde pública, segurança alimentar, queijos.

31 ¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, UFPI, Bom Jesus. CORRESPONDENCE: G. dos S. Nunes
32 [gladianenunes@outlook.com].

INTRODUÇÃO

33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

No Brasil, a produção de queijo de coalho tem grande importância econômica e cultural, sobretudo para a região Nordeste, onde é bastante consumido [12]. A fabricação artesanal de queijo de coalho é comumente caracterizada pela utilização de leite cru e pela excessiva manipulação, sem o emprego de boas práticas de fabricação.

As precárias condições higiênicas de elaboração, somadas à umidade elevada e aos atributos nutricionais do produto, fazem do queijo de coalho um propenso veiculador de grande quantidade e diversidade de microrganismos deteriorantes e até patogênicos. Adicionalmente, a formação de resistência aos antimicrobianos tem demandado atenção especial em todo o mundo, devido aos inúmeros riscos gerados à saúde pública, decorrentes do surgimento de cepas bacterianas capazes de resistir aos fármacos normalmente utilizados na terapêutica de infecções [6, 18].

Um dos principais microrganismos investigados em todo o mundo, quanto a ocorrência de resistência antimicrobiana é *Escherichia coli* [2, 16, 19]. *E. coli* é um bacilo gram-negativo pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Normalmente, a bactéria é comensal e coloniza o trato gastrointestinal dos indivíduos, mas há cepas virulentas e capazes de causar infecções até mesmo em indivíduos saudáveis, podendo provocar síndromes que incluem infecções urinárias, septicemias, meningites e doenças entéricas ou diarreicas [16, 20]. Desse modo, deve-se evitar a contaminação do queijo de coalho por esses microrganismos, e isto pode ser alcançado por meio da adoção de cuidados, desde a ordenha até à comercialização [17].

A partir disso, objetivou-se avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados de *Escherichia coli* obtidos de amostras de queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI.

MATERIAIS E MÉTODOS

58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82

Para este estudo, foram coletadas 30 amostras de queijo de coalho artesanal, mediante compra, em supermercados, padarias e na feira livre de Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017. Logo após a compra, as amostras foram mantidas na embalagem de compra e encaminhadas, em caixa isotérmica contendo gelo, para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Universidade Federal do Piauí – *Campus* Profa. Cinobelina Elvas, Bom Jesus-PI, para realização das análises.

Com um bisturi esterilizado e flambado, retiraram-se 25 gramas da amostra, e transferiram-se para frascos de tampas rosqueáveis contendo 225 mL de água peptonada (AP) 0,1%, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} . Em seguida, foram preparadas diluições decimais até 10^{-4} em tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada a 0,1%, adicionados de 1 mL da diluição anterior, para formar a diluição seguinte. Alíquotas das diluições 10^{-1} a 10^{-4} foram inoculadas em séries de tubos de caldo verde brilhante bile lactose a 2%, para serem incubadas a 35°C por 24 a 48 horas. A partir dos tubos positivos, foram transferidas alçadas para tubos contendo caldo *Escherichia coli* e estes foram incubados a 45°C em banho maria, por 24 a 48 horas [7].

Dos tubos positivos para *Escherichia coli*, realizou-se o plaqueamento em estrias, no meio ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), para observação das características das colônias. Colônias típicas, com coloração verde metálica foram investigadas e confirmadas por meio das provas bioquímicas de indol (SIM) e ágar citrato de Simmons [7]. Após a confirmação, as cepas foram repicadas em ágar Triptose Soja e incubadas por 24 horas. Posteriormente, foram transferidas quatro ou cinco colônias para tubos contendo solução salina 0,85%, para obter as suspensões, incubando-se até atingir a turvação correspondente ao tubo 0,5 (10^8 UFC/mL) da escala de MacFarland.

83 A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada pelo método de difusão de disco,
84 em placas de Petri contendo meio ágar Mueller Hinton, seguindo as recomendações descritas
85 por Bauer *et al.* [3]. Utilizaram-se onze discos contendo antimicrobianos comercialmente
86 disponíveis: Ácido Nalidíxico (30µg), Ampicilina (10µg), Ampicilina + Sulbactam (10/10µg),
87 Cefotaxima (30µg), Ceftriaxona (30µg), Ciprofloxacino (5µg), Cloranfenicol (30µg),
88 Gentamicina (10µg), Nitrofurantoína (300µg), Sulfametoxazol/trimetropim (25µg),
89 Tetraciclina (30µg). Após 24 horas de incubação a 37°C, realizou-se a leitura dos halos de
90 inibição e, de acordo com o crescimento dos mesmos, as cepas foram classificadas em sensíveis
91 (a dosagem é adequada para o tratamento), intermediárias (necessitam de doses mais elevadas
92 para serem adequadas para o tratamento) e resistentes (não foram inibidas pelas concentrações
93 dos agentes antimicrobianos), conforme valores determinados por *Clinical and Laboratory*
94 *Standards Institute* [5]. Em seguida, realizaram-se os cálculos de frequências de cepas
95 resistentes, intermediárias e sensíveis aos agentes antimicrobianos testados.

96

97

RESULTADOS

98

99 Do total de 30 amostras de queijo de coalho artesanal analisadas, houve crescimento de
100 *Escherichia coli*, em 46,67% (14). Destas 14 cepas isoladas, doze (85,72%) apresentaram
101 resistência e resistência intermediária foram observadas em cinco (35,71%). Somente duas
102 (14,28%) cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Tabela 1).

103

104

105

106

107

108

Os agentes antimicrobianos ácido nalidíxico, cefotaxima, ceftriaxona e ciprofloxacino
apresentaram 100% de sensibilidade em todas as cepas isoladas (Tabela 2). A partir das 14
cepas de *E. coli*, houve resistência aos antimicrobianos: nitrofurantoína (64,29%), ampicilina
(50%), tetraciclina (21,43%), sulfametoxazol/trimetropim (14,28%) e cloranfenicol (7,14%).
Evidenciaram-se ainda, cepas com resistência intermediária aos fármacos nitrofurantoína
(14,28%), gentamicina (14,28%), ampicilina + sulbactam (7,14%) e cloranfenicol (7,14%).

109 **Tabela 1.** Distribuição, segundo o perfil de resistência, de cepas *Escherichia coli* isoladas a
 110 partir de queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus, nos meses de janeiro e
 111 fevereiro de 2017

Perfil de resistência	N*	%
Sensível	2	14,29
Resistência intermediária a um antimicrobiano	4	28,57
Resistência intermediária a dois antimicrobianos	1	7,14
Resistência a um antimicrobiano	2	14,29
Resistência a dois antimicrobianos	7	50
Resistência a três ou mais antimicrobianos	3	21,43

112 * Número de cepas resistentes ou sensíveis

113

114 **Tabela 2.** Distribuição de cepas classificadas como resistentes, intermediárias e sensíveis aos
 115 antimicrobianos, em *Escherichia coli* isoladas do queijo de coalho artesanal comercializado em
 116 Bom Jesus-PI, nos meses de janeiro e fevereiro de 2017

Antimicrobiano	Resistente		Intermediário		Sensível	
	n	%	n	%	n	%
- Ácido Nalidíxico	0	0	0	0	14	100
- Ampicilina	7	50	0	0	7	50
- Ampicilina + Sulbactam	0	0	1	7,14	13	92,86
- Cefotaxima	0	0	0	0	14	100
- Ceftriaxona	0	0	0	0	14	100
- Ciprofloxacino	0	0	0	0	14	100
- Cloranfenicol	1	7,14	1	7,14	12	85,72
- Gentamicina	0	0	2	14,28	12	85,72
- Nitrofurantoína	9	64,29	2	14,28	3	21,43
- Sulfa./Trimetropim	2	14,28	0	0	12	85,72
- Tetraciclina	3	21,43	0	0	11	78,57

117

118

DISCUSSÃO

119

120 Assim como fora evidenciado neste estudo, o isolamento de *E. coli* resistentes, em
 121 queijo de coalho tem sido referenciada por outros autores [6, 8]. A resistência a nitrofurantoína

122 foi relatada por Guimarães *et al.*, num percentual de 25% das cepas de *E. coli* isoladas do queijo
123 de coalho comercializado em Salvador-BA [8], frequência menor, a encontrada no presente
124 trabalho. Contrariamente, Spinosa *et al.* [20] consideram rara a resistência bacteriana a esse
125 fármaco. A resistência emergente a nitrofurantóina em isolados de *E. coli* é preocupante, visto
126 que este antimicrobiano é fundamental para o tratamento de infecção simples do trato urinário
127 em humanos [9] e seu uso em animais destinados à produção de alimentos é proibido [4]. Neste
128 sentido, a resistência ao fármaco pode ser indicativa do uso persistente abusivo do princípio
129 ativo.

130 Quanto à ampicilina, Guimarães *et al.* [8] apontaram resistência em 58,3% das cepas,
131 oriundas do queijo de coalho comercializado em Salvador - BA, percentual acima do obtido
132 nesta pesquisa (50%). Diferentes frequências de resistência ao mesmo antimicrobiano, podem
133 ser explicadas pelos padrões de utilização de antimicrobianos nas diferentes localidades. A
134 resistência a ampicilina (50%) se dá, devido à produção de betalactamases, enzimas que
135 inativam o antimicrobiano, por quebra do anel betalactâmico [20]. Com efeito, a associação
136 ampicilina + sulbactam sofreu resistência intermediária por parte de apenas uma cepa (7,14%).
137 O sulbactam é um betalactâmico que tem a função de inibir a produção das betalactamases,
138 preservando assim, a atividade antimicrobiana da ampicilina [14]. A formação de resistência à
139 ampicilina e a outros antibióticos do grupo dos betalactâmicos é preocupante, pois são de
140 grande importância terapêutica nas medicina humana e veterinária.

141 Em um estudo com leite materno na Coreia do Sul, entre 2012 e 2015, verificou-se
142 23,3% de resistência à tetraciclina, percentual que foi considerado o maior entre os fármacos
143 testados [21]. Os autores atribuem o achado, a falhas no tratamento dos animais nas fazendas
144 leiteiras e reforçam que como consequências, pode haver transmissão de bactérias resistentes
145 para os consumidores. Ribeiro *et al.* [16] avaliando resistência antimicrobiana e fatores de
146 virulência de *Escherichia coli* em queijos fabricados com leite não pasteurizado, encontraram

147 resistência à tetraciclina em 38,5%, 45,5% e 28,6% das amostras oriundas das cidades de
148 Uberaba - MG, Ribeirão Preto - SP e Aracaju – SE, respectivamente e classificaram o fármaco
149 como de terceira categoria de importância na resistência antimicrobiana na medicina humana.
150 As tetraciclinas são os antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções no rebanho
151 leiteiro do estado do Paraná [15].

152 Os principais mecanismos de resistência as tetraciclinas são: o efluxo dessas drogas por
153 mecanismo dependente de energia, reduzindo sua concentração no interior da bactéria; e a
154 proteção ribossômica que impede a ligação entre o antibiótico e o ribossomo bacteriano [22].

155 Diferente do resultado encontrado nesta pesquisa em relação à resistência ao
156 sulfametoxazol+trimetopim (SUT), com frequência de 14,28%, Nagy *et al.* [11] na Europa
157 encontraram 50% de resistência ao SUT em produtos de origem animal. Este resultado
158 encontrado é insatisfatório, visto que estes antibióticos são utilizados na medicina humana e
159 animal no combate às infecções.

160 Resistência ao cloranfenicol também foi relatada em Aracaju – SE, em queijos
161 fabricados com leite não pasteurizado, porém com frequência mais baixa, de 3, 6% [16]. Este
162 fato desperta atenção para o provável uso indiscriminado e inadequado deste antibiótico na
163 região. Na União Europeia, Estados Unidos, Canadá e Brasil, o uso do cloranfenicol é proibido
164 em animais utilizados para consumo humano, devido a possibilidade da ocorrência de anemia
165 aplástica [4, 20].

166 O principal mecanismo de resistência bacteriana ao cloranfenicol é a inativação do
167 antibiótico, decorrente da acetilação promovida pela enzima cloranfenicol-acetiltransferase. A
168 acetilação dos grupos hidroxila do cloranfenicol impedem que ele se ligue à subunidade 50 S
169 do ribossomo [22].

170 Diferente dos resultados encontrados neste estudo, Paneto *et al.* [13] avaliando
171 a sensibilidade a antimicrobianos em queijo produzido com leite não pasteurizado, na região

172 Centro Oeste do Brasil, não encontraram resistência bacteriana a gentamicina. Este
173 antimicrobiano altera a função dos ribossomos bacterianos. Em hospitais, a ocorrência de
174 resistência de enterobactérias à gentamicina é frequente [10]. Os mecanismos de resistência a
175 este antibiótico são: alterações de permeabilidade, modificações ribossômicas e produção de
176 enzimas inativantes [1].

177 Reitera-se, por fim, que a resistência bacteriana causa preocupação, pois no trato
178 gastrointestinal humano, bactérias podem carrear genes de resistência a outras bactérias de
179 diferentes ou mesma espécie, patogênicas ou não. O desenvolvimento de resistência
180 antimicrobiana resulta em aumento de morbidade, mortalidade e custos à saúde, sendo
181 consonância global que o uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos contribuiu
182 substancialmente para o aumento desta resistência [8].

183 Deste modo, há muito o que se fazer em termos de prevenção, controle e monitoramento
184 do desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. As ações preventivas necessárias
185 demandam esforço contínuo, discernimento e colaboração multidisciplinar dos setores público
186 e privado, envolvendo a população como um todo e, mais intensamente, os médicos
187 veterinários, os pecuaristas e as lideranças governamentais [20].

188

189

CONCLUSÃO

190

191 Com base nos resultados, conclui-se que através do queijo de coalho artesanal há a
192 possibilidade da veiculação de cepas de *Escherichia coli*, incluindo cepas resistentes a agentes
193 antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções, demonstrando risco à saúde pública.

REFERÊNCIAS

- 194
195
- 196 **1 Alterthum F. 2008.** Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In:
197 Trabulsi L.R. & Alterthum F.(Ed). *Microbiologia*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, pp.79-85.
- 198 **2 Ahmed A.M. & Shimamoto T. 2015.** Molecular analysis of multdrug resistance in Shiga
199 toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *International*
200 *Journal of Food Microbiology*. 193: 68-73.
- 201 **3 Bauer A.W., Kirby W.M., Sherris J.C. & Turck M. 1966.** Antibiotics susceptibility testing
202 by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45(4): 493-496.
- 203 **4 Brasil. 2003.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Proibir a fabricação, a
204 manipulação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que
205 contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação
206 de todos os animais e insetos. Instrução Normativa Nº 9, de 27 de junho de 2003. Disponível
207 em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/>>. Acessado em 06/2017.
- 208 **5 Clinical Laboratory Standards Institute. 2013.** *Publication M100-S23*. Suggested
209 Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial. Agents That Should Be Considered for Routine
210 Testing and Reporting on Nonfastidious. Organisms by Clinical Laboratories. 33(1): 205.
- 211 **6 Evangelista-Barreto N.S., Santos G.C. da F., Souza J. dos S., Bernardes F. de S. & Silva**
212 **I.P. 2016.** Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos
213 coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade*
214 *Animal*. 10(1): 55-67.
- 215 **7 Feng P., Weagant S.D. & Grant M.A. 2002.** Enumeration of *Escherichia coli* and the
216 coliform bacteria. *Bacteriological Analytical Manual*, Chapter 4. Disponível em:
217 <<https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>>.
218 Acessado em: 03/2017.

219 **8 Guimarães A.G., Cardoso R. de C.V., Azevêdo P.F. & Meneses R. de. 2012.** Perfil de
220 susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijo de coalho. *Revista do Instituto*
221 *Adolfo Lutz.* 71(2): 259-265.

222 **9 Ho P-L., Ng K-Y., Lo W-U., Law P.Y., Lai E.L-Y., Wang Y. & Chow K-H. 2016.** Plasmid-
223 mediated OqxAB is na important mechanism for nitrofurantoin resistance in *Escherichia coli*.
224 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 60(1): 537-543.

225 **10 Nagelkerke M.M.B., Sikwewa K., Makowa D., Vries I. de, Chisi S. & Dorigo-Zetsma**
226 **J.W. 2017.** Prevalence of antimicrobial drug resistant bacteria carried by in-and outpatients
227 attending a secondary care hospital in Zambia. *BioMed Central Research Notes,* 10(1): 1-6.

228 **11 Nagy B., Szmolka A., Somole Mozina S., Kovac J., Strauss A., Schlager S., Beutlich J.,**
229 **Appel B., Lusicky M., Aprikian P., Pászti J., Tóth I., Kugler R. & Wagner M. 2015.**
230 Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC)
231 and f multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by
232 flight passengers. *International Journal of Food Microbiology.* 209: 52-59.

233 **12 Oliveira K.A. de, Evêncio Neto J., Paiva J.E. de & Melo L.E.H. de. 2010.** Qualidade
234 microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho,
235 Pernambuco, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico.* 77(3): 435-440.

236 **13 Paneto B.R., Shocken-Iturrino R.P., Macedo C., Santo E. & Marrin J.M. 2007.**
237 Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Arquivo Brasileiro de*
238 *Medicina Veterinária e Zootecnia.* 59(2): 508-512.

239 **14 Petri Júnior W.A. 2012.** Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β-lactâmicos. In:
240 Brunton L.L., Chabner B.A. & Knollmam B.C. *As bases farmacológicas da terapêutica de*
241 *Goodman & Gilman.* 12.ed. Porto Alegre: AMGH, pp.1477-1503.

242 **15 Pontes Netto D., Lopes M.O., Oliveira M.C.S. de, Nunes M.P., Machinski Junior M.,**
243 **Bosquioli S.L., Benatto A., Benini A., Bombardelli A.L. de C., Vedovello Filho D.,**

- 244 **Machado E., Belmonte I.L., Alberton M., Pedroso P.P. & Scucato E. da S. 2005.**
245 Levantamento dos principais fármacos utilizados no rebanho leiteiro do Estado do Paraná. *Acta*
246 *Scientiarum. Animal Sciences.* 27(1): 145-51.
- 247 **16 Ribeiro L.F., Barbosa M.M.C, Pinto F.R., Maluta R.P., Oliveira M.C., Souza V. de,**
248 **Medeiros M.I.M. de, Borges L.A., Amaral L.A. do & Fairbrother J.M. 2016.** Antimicrobial
249 resistance and virulence factors of *Escherichia coli* in cheese made from unpasteurized milk in
250 the three cities in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease.* 13(9): 469-476.
- 251 **17 Santana R.F., Santos D.M., Martinez A.C.C. & Lima Á.S. 2008.** Qualidade
252 microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de*
253 *Medicina Veterinária e Zootecnia.* 60(6): 1517-1522.
- 254 **18 Santos N. de Q. 2004.** A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto e*
255 *Contexto – Enfermagem.* 13(n.esp): 64-70.
- 256 **19 Solomakos N., Govaris A., Angelidis A.S., Pournaras S., Burriel A.R., Kritas S.K. &**
257 **Papageorgiou D.K. 2009.** Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia*
258 *coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. *Food Microbiology.*
259 26(8): 865-871.
- 260 **20 Spinosa H. de S., Górnaiak S.L. & Bernardi M.M. 2011.** *Farmacologia Aplicada à*
261 *Medicina Veterinária.* 5.ed. Rio de Janeiro: Koogan, 824p.
- 262 **21 Tark D-S., Moon D.C., Kang H.Y., Kim S-R., Nam H-M., Lee H-S., Jung S-C. & Lim**
263 **S-K. 2017.** Antimicrobial susceptibility and characterization of extended spectrum β -
264 lactamases in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk in South Korea from 2012 to
265 2015. *Journal of Dairy Science.* 100(5): 1-7.
- 266 **22 Winn Júnior W., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schereckenberger P. &**
267 **Woods G. 2012.** Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Antibiograma). In: *Koneman,*
268 *Diagnóstico Microbiológico.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.940-1014.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A qualidade do queijo de coalho artesanal comercializado em Bom Jesus-PI resulta de um conjunto de falhas na aplicação de boas práticas de fabricação desde à obtenção da matéria prima até à comercialização do produto. Além disso, a ocorrência de cepas de *Escherichia coli* resistentes a antimicrobianos, reforça a preocupação quanto à formação de resistência bacteriana, como um grave problema de saúde pública.

Desse modo, fazem-se necessários: o uso da matéria prima que atenda à legislação; a implantação de boas práticas de fabricação; medidas para o controle da utilização indiscriminada de antibióticos e a fiscalização por parte dos órgãos regulamentadores, para que seja evitada a transmissão de doenças por esses alimentos e o aparecimento de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos.

Sugere-se ainda, a introdução de programas de qualificação na produção artesanal, que viabilizem a elaboração higiênica e inócua do produto, assim como a preservação de seus atributos nutricionais e sensoriais.

Ademais, faz-se necessária a realização de estudos adicionais que busquem identificar os pontos de contaminação ao longo da cadeia produtiva, a fim de fornecer subsídios aos órgãos fiscalizadores, para que estes possam atuar com mais pontualidade e rigor e garantir a segurança alimentar.

REFERÊNCIAS

AMORIM, A.L.B. do C.; COUTO, E.P.; SANTANA, A.P.; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M. de A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.73, n.4, p. 364-367, 2014.

DANTAS, D.S. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, PB**. 2012. 79p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SANTOS, G.C. da F.; SOUZA, J. dos S.; BERNARDES, F. de S.; SILVA, I.P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.10, n.1, p.55-67, 2016.

FAVA, L.W.; HERNANDES, J.F. de M.; PINTO, A.T.; SCHMIDT, V. Características de queijos artesanais tipo colonial comercializados em uma feira agropecuária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, p.1-6, 2012.

FEITOSA, T.; BORGES, M. de F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F. de; MUNIZ, C.R. Pesquisa de *Samonella* 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.

GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R. de C.V.; AZEVÊDO, P.F.; MENESES, R. de. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijo de coalho. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.71, n.2, p.259-265, 2012.

OLIVEIRA, K.A. de; EVÊNCIO NETO, J.; PAIVA, J.E. de; MELO, L.E.H. de. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n.3, p.435-440, 2010.

SANTOS, G.C. da F. **Leite in natura e queijos artesanais comercializados em Cruz das Almas – Bahia: qualidade microbiológica e susceptibilidade antimicrobiana.** 2011. 95p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.

ZOCCHÉ, F.; SILVA, W.P. da. PCR para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em queijos minas frescal. **Alimentos e Nutrição**, v.23, n.2, p.187-193, 2012.