

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA: HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL

LUIZ ANTONIO VIEIRA DA SILVA

Staphylococcus COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO MINAS FRESCAL

UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE

BOM JESUS DO ITABAPOANA, RJ
2008

LUIZ ANTONIO VIEIRA DA SILVA

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. ROBSON MAIA FRANCO

Co-Orientador: Prof. Dr. JORGE UBIRAJARA DIAS BOECHAT

**Bom Jesus do Itabapoana, RJ
2008**

LUIZ ANTONIO VIEIRA DA SILVA

***Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJO MINAS FRESCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Mestrado), Área de Concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária.

Aprovada em 21 de julho de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Robson Maia Franco – Orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Jorge Ubirajara Dias Boechat – Co-orientador
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Fábio Costa Henry
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Bom Jesus do Itabapoana
2008

“Porque Cristo enviou-me, não para batizar, mas para evangelizar; não em sabedoria de palavras, para que a cruz de Cristo se não faça vã.
Porque a palavra da cruz é loucura para os que perecem; mas para nós, que somos salvos, é o poder de Deus.
Porque está escrito: Destruirei a sabedoria dos sábios, e aniquilarei a inteligência dos inteligentes.
Onde está o sábio? Onde está o escriba? Onde está o inquiridor deste século? Porventura não tornou louca a sabedoria do mundo?
Visto como na sabedoria de Deus o mundo não conheceu a Deus pela sabedoria, aprouve a Deus salvar crentes pela loucura da pregação.
Porque os judeus pedem sinal, e os gregos buscam sabedoria;
Mas nós pregamos a Cristo crucificado, que é escândalo para os judeus, e loucura para os gregos.
Mas para os que são chamados, tanto judeus como gregos, lhes pregamos a Cristo, poder de Deus, e sabedoria de Deus.
Porque a loucura de Deus é mais sábia do que os homens; e a fraqueza de Deus é mais forte do que os homens.”

I Coríntios 1:17-25

À Deus e a minha família, por tudo que representa em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Robson Maia Franco, meu orientador, que prontamente aceitou a conduzir a presente pesquisa de dissertação, sempre atencioso e disponível. O reconhecimento de sua capacidade intelectual, produtiva e educadora.

Ao Prof. Dr. Jorge Ubirajara Dias Boechat, meu Co-orientador, amigo e colega, no dia-a-dia do desenvolvimento e andamento do trabalho, incansável e ajudador, meu profundo respeito.

Aos Prof. Dr. Sérgio Borges Mano, na época Coordenador do Programa da Pós-Graduação em Medicina Veterinária/UFF e ao Prof. Dr. Fernando Antonio Arantes Ferrara, Diretor do Colégio Técnico Agrícola Ildefonso Bastos Borges/UFF, que numa ação conjunta proporcionaram a realização deste curso em Bom Jesus do Itabapoana(RJ).

Ao Pró-Reitor de Assuntos Acadêmicos, PROAC, Prof.Dr. Sidney Luiz Matos Mello, tanto fez para a criação e a realização de uma turma Minter nesta Unidade de Ensino no noroeste fluminense.

Ao corpo Docente da Faculdade de Veterinária, em especial àqueles que estiveram entre nós ministrando aulas no decorrer do curso. Agradeço a Profa. Dra. Mônica Queiroz de Freitas, atual Coordenadora do Programa e sua equipe de funcionários da Secretaria da Pós-graduação na área de Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aos meus colegas e amigos, professores, funcionários e alunos do CTAIBB pela motivação e paciência no decorrer do curso.

Aos bolsistas do Projeto Jovens Talentos de iniciação científica, da CECIERJ/FAPERJ, seu carinho e ajuda sempre presente.

Aos meus colegas de curso, em particular, a Paula, a quem as palavras se tornam pequenas por tudo que fez por mim. Como também ao João Renato, que nas suas atitudes e pronto atendimento, possibilitaram alcançar os objetivos do presente trabalho. Meu ex-aluno e colega Sandro sempre disponível nas tarefas e práticas laboratoriais.

Ao Instituto Jorge Vaitsman, Seção de Virologia, pela concessão para o Teste da Coagulase, do plasma liofilizado de coelho.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p.7

LISTA DE TABELAS, p. 8

LISTA DE ABREVIATURAS, p. 9

RESUMO, p. 10

ABSTRACT, p. 11

1 INTRODUÇÃO, p. 12

2 REVISÃO DE LITERATURA, p. 15

2.1 *Staphylococcus* spp p. 15

2.1.1 Classificação, p. 15

2.1.2 *Staphylococcus* spp., p. 16

2.1.3 *Staphylococcus* coagulase positivo, p.19

2.1.4 *Staphylococcus* coagulase positivo e a sensibilidade aos antimicrobianos, p. 20

2.1.5 Prova da catalase, p. 21

2.1.6 Toxinas estafilocócicas e intoxicação alimentar, p. 23

2.2 QUEIJO MINAS FRESCAL, p. 23

2.2.1 Aspectos tecnológicos, p. 23

2.2.1.1 Fluxograma de produção de queijo minas frescal, p. 24

2.2.2 Aspectos físico-químicos, p. 25

2.2.2.1 Determinação de pH, p. 25

2.2.3 Aspectos microbiológicos, p. 27

3 MATERIAL E MÉTODOS, p. 28

3.1 MATERIAL PERMANENTE, p. 28

3.2 MATERIAL DE CONSUMO, p. 28

3.3 MÉTODOS, p. 29

3.3.1 Colheita das amostras, p. 29

3.3.2 Transporte das amostras, p. 30

3.3.3 Análises, p. 31

3.3.3.1 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo. p. 31

3.3.3.2 Morfologia bacteriana e método de coloração de Gram, p. 31

3.3.3.3 Teste da catalase, p. 32

3.3.3.4 Prova da coagulase, p. 32

3.3.3.5 Teste de sensibilidade antimicrobiana das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, p. 32

3.3.3.6 *Análise de pH*, p. 34

3.3.3.7 *Análise estatística*, p. 34

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 35

4.1 Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva, p. 35

4.2 Provas da catalase e da coagulase, p. 42

4.3 Morfologia Bacteriana pelo Método de Coloração de Gram, p. 46

4.4 Resistência antimicrobiana *Staphylococcus* coagulase positiva, p. 48

4.5 *Análise de pH*, p. 5d2

5 CONCLUSÕES E SUGESTÃO, p. 56

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 57

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fig 1 Valores de pH das marcas de queijo minas frescal (A a G) segundo Rocha et. al. (2006).

Figura 2. Enformagem de queijo minas frescal – procedimento de fabricação da marca A no Noroeste Fluminense em novembro de 2007

Figura 3. Curva em forma de sino, segundo DINIZ (2001).

Gráfico 1. Demonstrativo da quantidade de amostras e respectivos resultados da análise tintorial pelo método de coloração de Gram.

Gráfico 2. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas sensíveis. Fonte: própria.

Gráfico 3. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas intermediárias. Fonte: própria.

Gráfico 4. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas resistentes. Fonte: própria.

Gráfico 5. Valores médios de pH da marca A de queijo minas frescal.

Gráfico 6. Valores médios de pH da marca B de queijo minas frescal.

Gráfico 7. Valores médios de pH da marca C de queijo minas frescal.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007.

TABELA 2. Provas da catalase e coagulase no queijo frescal marca A.

TABELA 3. Provas da catalase e coagulase no queijo frescal marca B.

TABELA 4. Provas da catalase e coagulase no queijo frescal marca C.

TABELA 5. Resultados da morfologia bacteriana realizada nas marcas A, B e C de queijo minas frescal estudadas no Noroeste do Estado do Rio de Janeiro (2008). Resultados do autor.

TABELA 6. Total de amostras com resultados SENSÍVEL nas marcas A, B e C.

TABELA 7. Total de amostras com resultados INTERMEDIÁRIO nas marcas A, B e C.

TABELA 8. Total de amostras com resultados RESISTENTE nas marcas A, B e C.

TABELA 9: Antimicrobianos utilizados no experimento. Fonte: Própria

TABELA 10. Valores médios de pH das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007.

TABELA 11. Valores médios de pH das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007.

LISTA DE ABREVIATURAS

UFF - Universidade Federal Fluminense

CTAIBB – Colégio Técnico Agrícola Ildefonso Bastos Borges

APC – Agar Padrão para Contagem

UFC – Unidade Formadora de Colônia

BPF – Boas Práticas de Fabricação

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade higiênico-sanitária do queijo tipo Minas Frescal processado e comercializado na região noroeste fluminense. Verificar a presença neste produto de origem animal, de bactérias indicadoras de contaminação, por meio de análise bacteriológica para *Staphylococcus* Coagulase Positivo, que possuam o registro ou selo da Inspeção ou Vigilância Sanitária Municipal. A metodologia consistiu em utilizar a Instrução Normativa nº 62, SDA, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, como referencial de trabalho. O pH manteve-se na média de 6,92 para a marca A, 6,29 para a marca B e 5,75 para a marca C, estando relativamente dentro dos padrões, com exceção da marca C, permitidos pela legislação RDC nº12, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA e da Portaria 352/1997, o Regulamento Técnico e Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Tipo Minas Frescal, do MAPA. A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva esteve, em 6,40 UFC/g⁻¹/log das amostras da marca A, 6,58 UFC/g⁻¹/log das amostras da marca B e 6,76 UFC/g⁻¹/log das amostras da marca C, acima do permitido pela legislação RDC nº12, da ANVISA. A sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva aos antimicrobianos foi a condição de resistência ao cefepime, clindamicina, oxaciclina e penicilina. Conclui-se, com base nos resultados obtidos que as três marcas analisadas no presente trabalho tinham valores de contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo bem acima daqueles descritos na legislação, o que leva a crer na inobservância dos cuidados higiênicos durante o processamento do queijo minas frescal.

Palavra-chave: queijo minas frescal; *Staphylococcus* spp; *Staphylococcus* coagulase positiva.

ABSTRACT

The purpose of study was to examine evaluate the sanitary-hygienic quality of cheese type Frescal Minas processed and marketed in the northwest fluminense. Check the presence in this product of animal origin, indicators the bacteria of contamination, through bacteriological examination for *Staphylococcus coagulase positive*, that have the record or seal of Inspection or Municipal Health Surveillance. The methodology consisted in use Normative Instruction N°62, Secretary Defense Health, SDA, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, MAPA (BRAZIL), as reference work. The pH remained in the middle 6,92 of the mark A, 6,29 for mark B and 5,75 for mark C, are within the standards allowed by legislation, RDC, N° 12, the National Agency of Sanitary Surveillance, ANVISA, and the Order N°352/1997, the Regulation Technical and holding identity and quality of the cheese type Frescal Minas, MAPA (BRAZIL). The counting of *Staphylococcus coagulase positive* was in 6,40 UFC/g⁻¹/log of the samples of mark A, 6,58 UFC/g⁻¹/log of the samples mark B and mark C, 6,76 UFC/g⁻¹/log, above permitted by RDC N°12, ANVISA (BRAZIL). The sensitivity of strains *Staphylococcus coagulase positive* to antimicrobial was resistance to cefepime, clindamicina, oxaciclina and penicillin. It is based on the results that the three marks examined in this study had values of counts of *Staphylococcus coagulase positive* and above those described in the legislation, which leads to believe the failure of the hygienic care during the processing of the cheese type Minas Frescal .

Key-words: "minas frescal" cheese; *Staphylococcus* spp.; *Staphylococcus coagulase positive*.

1 INTRODUÇÃO

A região noroeste fluminense é composta por 13 municípios destacando-se, entre outros, os de Itaperuna e Santo Antonio de Pádua. Esta região está localizada entre os Estados de Minas Gerais e Espírito Santo, tradicionalmente caracterizada pela produção leiteira, constituída essencialmente por pequenos produtores. Os derivados de leite produzidos nesta região nem sempre possuem o registro da Vigilância Sanitária ou do Serviço de Inspeção Municipal.

Grande parte da produção leiteira nesta região é usado na produção de queijo minas tipo frescal. O leite se constitui um dos alimentos mais completos da natureza, a sua importância é baseada em seu elevado valor nutritivo, como riqueza de proteínas, vitaminas, gordura, sais minerais e sua alta digestibilidade; esses fatores são relevantes para considerá-lo um excelente meio de cultura para a maioria dos microrganismos.

O queijo minas frescal é um alimento altamente consumido pela população brasileira. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 2005, apontam uma produção de 31.456.424 kg e um consumo de 28.379.932 Kg.

O queijo tipo Minas Frescal é produzido a partir do leite pasteurizado de vacas saudáveis e tem como características a massa branca, consistência mole, fresco, sem acidez e com alto teor de umidade. Não sofre nenhuma maturação ou processo de secagem, sendo embalado e vendido assim que é produzido. Sua validade pode chegar a 20 dias, desde que sob refrigeração adequada. Após a abertura da embalagem, o queijo frescal deve ser consumido em até cinco dias (ABIQ, 2006).

Sendo a matéria prima essencial para o processamento do queijo, a pasteurização do leite faz-se necessária a fim de diminuir ao máximo o número de microrganismos visto que alguma microbiota pode sobreviver a este tipo de tratamento térmico. Apesar da legislação brasileira exigir a utilização do leite pasteurizado na fabricação do queijo minas frescal, é comum observar sua comercialização sem que seja atendida esta disposição legal.

A contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva pode acontecer em decorrência da manipulação inadequada da matéria-prima e/ou do produto. A higiene pessoal e as condições do ambiente contribuem para esta situação.

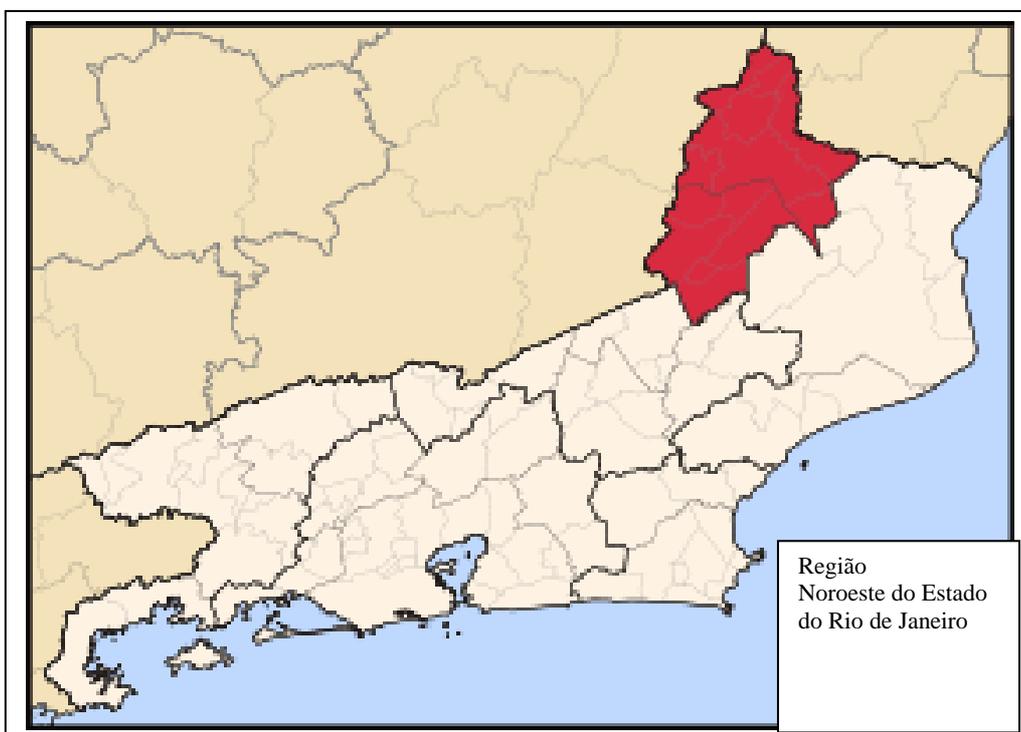
Esses microrganismos são encontrados normalmente nas pessoas principalmente nas mãos, fossas nasais e garganta, bem como na pele e debaixo das unhas, sendo os manipuladores de alimentos portadores de *Staphylococcus* spp. os principais fatores de risco de contaminação desses produtos. Em pesquisas recentes encontram-se dados em que risco potencial representado pelas mãos, pelo ambiente industrial, em relação às intoxicações alimentares.

Com efeito, a falta de informação e registro dos casos de intoxicação alimentar pelas Secretarias Municipais ou mesmo dos surtos proporcionados por este microrganismo torna-se um obstáculo ao desenvolvimento de medidas sanitárias preventivas para a preservação da saúde coletiva.

A contaminação de alimentos por cepas patogênicas de *Staphylococcus* spp., além de resultar em problemas diretos para a saúde humana, pode trazer prejuízos econômicos para a indústria de alimentos devido às perdas pela inutilização imposta a esses produtos pela fiscalização.

O controle de qualidade do queijo minas frescal é normatizado pela Portaria nº 352 / BRASIL (1997), através do Regulamento Técnico e Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Frescal e pela Resolução Diretoria Colegiada nº 12/2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

O objetivo geral do presente trabalho foi pesquisar a ocorrência de *Staphylococcus* spp. em queijo tipo Minas Frescal, cujas marcas comercializadas no noroeste fluminense estivessem sob o registro da Vigilância Sanitária Municipal e do Serviço de Inspeção Sanitária. Foram realizadas as provas de determinação do pH, contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo, método de coloração de Gram, prova da catalase, prova da coagulase e teste de sensibilidade aos antimicrobianos, das cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo encontrados nas amostras de queijos das marcas envolvidas no presente trabalho.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação

O *Staphylococcus* (do grego *staphyle*, uva) são bactérias do tipo cocos da família *Micrococcaceae*, Gram positivos, imóveis, agrupados em massas irregulares ou em cachos de uva. Aeróbios ou anaeróbios facultativos, catalase positivo. Fermentam a glicose com produção de ácido, tanto em aerobiose, como em anaerobiose, e nisso se diferenciam dos microrganismos do gênero *Micrococcus*, que só fermentam em aerobiose (s/a, 2007)

Segundo Pelczar et al. (1981) os estafilococos são habitantes naturais do organismo animal, o qual serve de fonte para esses germes encontrados em toda parte. Como agentes patogênicos, os estafilococos são causa de muitos processos supurativos, variando desde espinhas, furúnculos e abscessos até septicemias fatais; são, ainda, invasores secundários em peritonites, cistites e meningites. Como saprófitas, os estafilococos são cosmopolitas, sendo encontrados na pele normal, no nariz, na boca e nos intestinos, assim como no ar, na água, no leite, nos despejos e nos fômites.

As infecções se estabelecem quando esses germes penetram nos tecidos através de cortes ou de erosões da pele. O ser humano é, em geral, altamente suscetível às amostras virulentas, obtendo-se ligeira imunidade com a administração de vacinas autógenas (vacinas preparadas a partir de culturas obtidas do paciente) ou outras.

Segundo o autor o gênero *Staphylococcus* está freqüentemente associado a uma ampla variedade de infecções de caráter oportunista, em seres humanos e animais. As principais espécies de estafilococos encontrados em seres humanos são os *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus*

saprophyticus. O *S. epidermidis* é encontrado primariamente como residente da pele, tendo um baixo potencial patogênico, assim como o *S. saprophyticus*, que faz parte da microbiota normal da região periuretral do homem e da mulher e da pele. Ao contrário, *S. aureus* é um patógeno em potencial e pode ser encontrado na região da nasofaringe e também das fossas nasais.

2.2 *Staphylococcus* spp

Conforme Silva e Gandra, (2002) relataram que foram descritas 32 espécies de estafilococos, das quais, cinco são capazes de produzir uma enzima extracelular, a coagulase. Entre estas espécies, denominadas de Estafilococos Coagulase Positiva (ECP), o *Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica; entretanto, *S. intermedius* e *S. hyicus* também podem produzir enterotoxinas e já foram envolvidas em surtos.

Segundo Gonçalves e Franco (1996) a ingestão de queijos em condições inadequadas de consumo pode trazer graves conseqüências para a população, sendo, portanto um problema de Saúde Coletiva; vários são os relatos de toxinfecção alimentar devido ao consumo de queijos.

Almeida Filho e Nader Filho (2000) alertaram acerca da precária qualidade higiênico-sanitária do queijo tipo Minas “frescal” de produção artesanal constituindo-se em motivo de preocupação ainda maior, principalmente se considerada a lei 7889 de 23 /01/1989, que delegou aos municípios a competência para a realização da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.

Segundo Almeida Filho e Nader Filho (2000) sugeriram que tais achados possam contribuir não só para alertar as autoridades sanitárias municipais para o elevado risco potencial que esse tipo de queijo pode representar para a saúde da população consumidora, mas, também, para sensibilizá-las sobre a necessidade da imediata adoção de medidas que permitam a efetiva inspeção e/ou fiscalização deste produto.

A contaminação de alimentos tem aumentado a cada ano, e atualmente representa um risco potencial para saúde humana. Contaminação por *Staphylococcus* spp. em alimentos *in natura* e processados (camarão, queijo de coalho, macarrão, peixe cozido e pasta de alho) ocorreu durante os estágios de produção ou na estocagem dos alimentos, produzindo toxinas. Conclui-se que estes

alimentos representam risco à saúde humana se não forem observadas práticas adequadas de higiene no seu manuseio e no armazenamento (Cunha Neto et al, 2002).

De acordo com Camacho et al (2004) das quinze amostras de queijo ralado analisadas para *Staphylococcus* spp., quatro (33,3%) apresentaram teste positivo para coagulase. Estas amostras apresentaram contagens acima do limite máximo permitido pela legislação, que é de 10^3 UFC.g⁻¹ de queijo ralado. As contagens variaram de $1,3 \times 10^5$ a $9,9 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, demonstrando que as amostras encontravam-se impróprias para o consumo humano de acordo com a legislação vigente.

Com o objetivo de identificar as principais fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* produtores de coagulase (SC+), Assumpção et al (2003) avaliaram o processo de fabricação de queijo prato em um laticínios de Lavras (MG), durante os meses de outubro de 2000 a abril de 2001.

As análises microbiológicas foram realizadas no leite cru, no leite pasteurizado resfriado, nas mãos e antebraços dos funcionários, na salmoura, na água de imersão das formas e no queijo embalado. Contagens elevadas de SC+ e de *S.aureus* (4×10^3 a $4,8 \times 10^6$ UFG/ml e 4×10^3 a $3,3 \times 10^5$ UFC/ml, respectivamente) foram encontradas em quatro avaliações no leite cru. Após a pasteurização, as contagens foram reduzidas a menos de uma UFC/mL. Em três das cinco avaliações, o queijo prato apresentou contagens de SC+ ($1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ e $2,3 \times 10^5$ UFC/g) superiores às permitidas pela legislação vigente. A água de imersão das formas e a salmoura apresentaram contagens de SC+ e *S. aureus* inferiores a uma UFC/ml não se constituindo em importantes fontes de contaminação. As mãos e os antebraços dos funcionários foram possivelmente as fontes de contaminação do queijo, sugerindo que as alta contagens nos queijos estava associada à contagem elevada nas mãos (4×10^2 UFC/ cm²) ou nos antebraços ($4,7 \times 10^2$ e $3,3 \times 10^3$ UFC/cm²) dos manipuladores.

A contaminação dos alimentos por *Staphylococcus* spp. de origem humana pode ser bastante reduzida mediante adoção de boas práticas de manufatura. A contaminação por *Staphylococcus* spp. de origem animal pode ser reduzida com medidas de controle da higiene de obtenção do leite. Os microrganismos devem ser destruídos pelo calor (pasteurização) antes que se multipliquem e os alimentos devem ser mantidos sob refrigeração.

As elevadas contagens de *Staphylococcus* spp. no leite cru levam a suspeitar de problemas relacionados às condições higiênico-sanitárias de sua obtenção, conservação ou transporte.

A elevada contagem desses microrganismos potencialmente produtores de toxinas no leite cru e a grande estabilidade das toxinas estafilocócicas ao calor são fatores preocupantes.

A população de *Staphylococcus* spp. verificada nas mãos e antebraços de manipuladores foi provavelmente a fonte de recontaminação do queijo, talvez porque a manipulação não foi acompanhada por boas práticas de fabricação que pudessem garantir a manutenção da qualidade do leite obtida com tratamento térmico. O não uso de luvas ou a sanificação não adequada das mãos e antebraços podem ser motivos das elevadas contagens.

Analisando 20 amostras de queijo de cabra “tipo coalho”, Euthier et al (1998) concluíram que os valores determinados para a sua microbiota foram elevados, podendo estas contaminações terem sido provenientes da água, ação dos manipuladores e ainda da inadequação do processo de higienização dos equipamentos e do ambiente.

O papel da água utilizada durante a produção do leite na contaminação por *Staphylococcus* spp. foi objeto de pesquisa de Amaral et. al. (2003). Foram coletadas amostras de água das fontes dos reservatórios e dos estábulos de 30 propriedades leiteiras no nordeste do Estado de São Paulo. Os resultados indicaram os estábulos como o local de maior ocorrência de *Staphylococcus* spp., encontrando-se aí os maiores valores médios ($4,3 \times 10^4$ e $2,5 \times 10^4$). Os autores alertam, com base nos resultados, para a possibilidade de contaminação do leite ou dos animais por cepas patogênicas.

Loguercio e Aleixo (2001) analisando queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente verificaram que na contagem de *Staphylococcus aureus*, em 30 amostras, 29 (96,67%) obtiveram valores superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g, estando apenas 1 amostra (3,33%) em conformidade com o padrão legal. Relataram que uma maior atenção deve ser dada pelas autoridades sanitárias em relação à permissão de fabricar e comercializar esse produto, uma vez que ele representa risco à saúde dos consumidores.

Picoli et al (2006), pesquisando em laticínios nas etapas de produção de queijo frescal de leite de cabra, comentam sobre o comprometimento a qualidade

sanitária dos produtos de origem láctea. Cita o *S. aureus* devido à possibilidade de produção de toxinas no alimento, pode levar a toxinfecção alimentar. Os autores chama a atenção em relação aos estafilococos, dizendo que os mesmos podem ser introduzidos no alimento sob várias formas, entre as quais o ato de o manipulador levar a mão à boca ou nariz, assim como, por lesões estafilocócicas presentes na pele do funcionário que trabalha diretamente com alimento. A utilização de equipamentos com deficiente sanificação, e que haviam entrado em contato com o leite na plataforma, determinou a recontaminação pós-pasteurização, podendo comprometer a vida útil.

Almeida Filho e Nader Filho (2000) estudaram *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas Frescal, comercializado em Poços de Caldas (MG), visando obter subsídios que permitissem avaliar o risco potencial que o produto pode representar para a saúde da população consumidora.

Segundo os autores anteriormente citados, acredita-se que tais achados sejam extremamente preocupantes principalmente pelo fato destes valores estarem próximos dos requeridos ($1,0 \times 10^5$ UFC/g a $1,0 \times 10^9$ UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para produção de enterotoxinas em quantidades suficientes e necessárias de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

Borges et al (2003) avaliando a qualidade higiênico-sanitária de 43 amostras de queijo de coalho produzidas em diferentes microrregiões do estado do Ceará, verifica a presença de Estafilococos coagulase positiva (SC+) em 93,1% das amostras de queijos, com contagem variando de $1,0 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^9$ UFC/g.

Atento a esta problemática que também atinge a produção de leite, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, promove o Programa Nacional de Qualidade do Leite e conjuntamente os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite, por meio da Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 (BRASIL,2002).

2.3 *Staphylococcus* coagulase positiva

O *Staphylococcus* spp é dividido em dois grupos de acordo com sua capacidade de produzir uma enzima denominada de *coagulase*, capaz de coagular tanto o plasma de sangue humano como o de coelho, bem como o plasma de outras espécies de animais, embora em graus variados, mesmo na presença de

anticoagulantes, tratando-se do *Staphylococcus* coagulase positivo. Por outro lado, no outro grupo, o *Staphylococcus* coagulase negativa, que não coagula o plasma. Trata-se desta, uma espécie comensal da pele e responsável por infecções hospitalares

Os autores Castro et al (2007) trabalhando com queijo minas frescal, observaram que as cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo foram confirmadas em todas as amostras das marcas A, C e D, e na marca B não houve presença detectável desse microrganismo. Relataram que a presença do *Staphylococcus* coagulase positiva nas marcas A, C e D, pode estar relacionada com a manipulação dos queijos, pois os manipuladores representam os principais meios de transmissão dessa bactéria. É importante destacar que as elevadas contagens desse microrganismo são indicativas da presença de enterotoxinas estafilocócicas, sendo um risco à saúde do consumidor. citam ainda um caso de intoxicação alimentar.

2.4 *Staphylococcus* coagulase positiva e a sensibilidade aos antimicrobianos

Os resíduos de antimicrobianos no leite podem aparecer devido ao tratamento parenteral ou intramamário de animais em lactação e representam o principal ponto crítico de controle de contaminação química no leite. Os riscos à saúde do consumidor são apresentados principalmente pelo desencadeamento de fenômenos alérgicos em indivíduos sensíveis, pelos efeitos tóxicos e carcinogênicos, por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores, Freitas (2005).

Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, segundo Pelczar et al (1981) a maior parte dos estafilococos era sensível à penicilina, e assim, mais recentemente, o desenvolvimento de amostras antimicrobianas criou um problema significativamente sério quanto à saúde coletiva.

Na população em geral predominam os estafilococos antimicrobianos, mas as amostras resistentes são mais comuns em hospitais. Aproximadamente 80% dos estafilococos isolados de pacientes hospitalizados são resistentes à penicilina e as estirpes também resistentes à estreptomicina e às tetraciclinas.

Segundo Silva et al (2007) os antimicrobianos são fármacos que têm a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos indicado portanto apenas para o tratamento de infecções microbianas sensíveis.

Martinez et al (1996), pesquisando a sensibilidade bacteriana a antimicrobianos usados na prática médica, relataram que o tratamento das infecções piogênicas é realizado com maior eficácia e segurança, se baseado no resultado da cultura microbiológica, complementada com o teste de sensibilidade antimicrobiana, de amostra representativa do foco infeccioso. É comum, entretanto, que a escolha do antimicrobiano se faça empiricamente, por indisponibilidade temporária ou definitiva de dados laboratoriais. Nestas circunstâncias, a seleção de um determinado fármaco deve se basear na experiência prévia sobre os tipos causadores da infecção e sua sensibilidade a anti-infecciosos.

Costa (2003) no seu trabalho sobre qualidade do leite (células somáticas e resíduo de antimicrobianos) comentou que na atualidade, a questão da "qualidade e segurança" dos alimentos tem recebido maior atenção por parte das autoridades, indústria, profissionais envolvidos, produtores e consumidores de um modo geral.

O leite é considerado o alimento mais perfeito da natureza. Apresenta uma composição rica em proteínas, vitaminas, gordura, carboidratos e sais minerais (principalmente cálcio) sendo fonte essencial à saúde do humana.

Produzido durante a lactação, a partir de elementos que passam do sangue para as células especializadas da glândula mamária, pode em situações específicas, conter resíduos de medicamentos ou fármaco de uso veterinário.

Temas relacionados aos níveis de segurança e tolerância a serem estabelecidos, métodos oficiais de monitoramento, níveis de sensibilidade dos testes rápidos de detecção disponíveis no mercado, destino do leite contaminado, tipo de incentivo ou penalidade a ser instituída para se atingir metas de qualidade, credibilidade das informações relacionadas ao período de descarte do leite contidas nas bulas de medicamentos, vêm sendo muito discutidas.

Segundo os procedimentos específicos para controle de qualidade da matéria prima, contidos na instrução normativa nº 51 (BRASIL, 2002), a pesquisa de resíduo de antibióticos deve ser realizada por métodos analíticos que devem apresentar sensibilidade para os LMR (Limites Máximos de Resíduo permitido) adotados pelo MAPA. A pesquisa de resíduo de antimicrobianos deve ser feita mensalmente em laboratório licenciado, independentemente das análises realizadas na frequência estipulada pelo programa interno de qualidade da granja leiteira.

2.5 Prova da catalase

Na pesquisa de estafilococos coagulase positiva em alimentos, Santana e Azeredo (2005) compararam metodologias alternativas para a detecção e enumeração em meios seletivos e diferenciais, para o gênero *Staphylococcus* e sua posterior caracterização pelos testes de coagulase, termonuclease, coloração de Gram e teste de catalase.

Segundo Stamford et al (2006) os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, podendo levar a doenças manifestadas por ação de microorganismos patogênicos ou suas toxinas. Esses pesquisadores estudaram a ocorrência de cepas de *Staphylococcus*, spp. assim como a sua capacidade para produção de enterotoxinas em leite produzido e/ou comercializado e, para confirmação de *Staphylococcus* utilizou-se a prova da Catalase e DNAase, segundo metodologia descrita por Mac Faddin (1973) .

Brito et al (2002), em uma pesquisa realizada na busca de um esquema simplificado para identificação de estafilococos coagulase-positivos isolados de mastite bovina, utilizaram para a classificação do gênero *Staphylococcus* resultados com base nos testes de sensibilidade à furazolidona, resistência à bacitracina, produção de ácido em aerobiose a partir de glicerol na presença de $0,4\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de eritromicina e de catalase.

Assumpção et al (2003) pesquisando as fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato, utilizaram a metodologia recomendada para a determinação de *Staphylococcus* produtores de coagulase e *S. aureus* e, encontraram colônias típicas e atípicas que foram submetidas às provas bioquímicas (ICMSF, 1982). Foram realizados testes de coloração de Gram e provas de catalase, de coagulase, de termonuclease e de capacidade de crescimento em BHI com 15% de NaCl (MAC FADDIN, 1980).

Segundo Bernardi et al (2001) os cocos Gram-positivos aeróbicos, ou facultativamente anaeróbicos, representam cerca de 30 por cento dos microorganismos isolados na rotina bacteriológica. Nesta identificação, maior atenção recebem os *Streptococcus* spp e *Staphylococcus aureus* como agentes causadores de doenças infecciosas. Nos últimos anos, a presença de outros cocos Gram-positivos, catalase positiva (*Staphylococcus* coagulase negativa, e os chamados estafilococóides: *Alloicoccus*, *Microccus*, *Macroccus* e *Stomatococcus*), associados com diferentes patologias humanas, vem sendo crescente

2.6 Toxina estafilocócica e intoxicação alimentar

A produção de toxinas por parte do *Staphylococcus* spp., segundo Barreto et al (2001) é classificada em (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E), sendo estas pré-formadas no alimento. São proteínas higroscópicas e facilmente solúveis em água e soluções salinas, sendo resistentes à tripsina, quimiotripsina, renina, papaína e pepsina, com exceção da enterotoxina “tipo B” que é destruída pela pepsina em pH ao redor de 2,0. A produção de toxinas atinge o seu auge em temperaturas entre 40^o e 45^oC, sendo ínfima em pH abaixo de 6,0. As toxinas são termo-resistentes. Tal fator é de importância, porque a maioria dos alimentos industrializados sofre algum tipo de tratamento térmico durante o seu processamento podendo haver destruição do microrganismo sem, no entanto, haver inativação da toxina durante o processamento térmico para produção de conservas enlatadas (appertização, tindalização, isto é, esterilização comercial – aquecimentos sucessivos em temperaturas ao redor de 100^o, seguidos de resfriamento).

2.2 QUEIJO MINAS FRESCAL

2.2.1 Aspectos tecnológicos

Conforme a Portaria nº 352 de 04/1997 (BRASIL, 1997) que dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, por definição: “Entende-se por Queijo Minas Frescal, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas.”

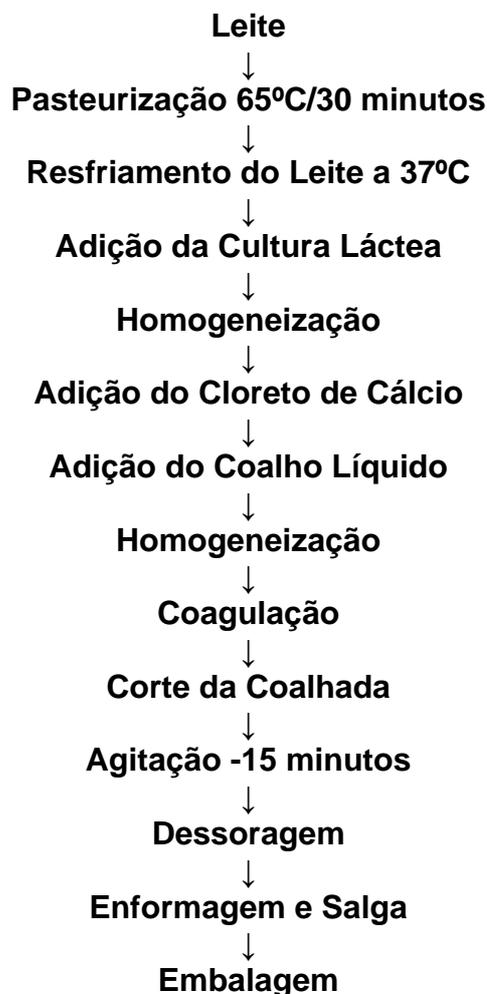
O Queijo Minas Frescal é um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, de acordo com a classificação estabelecida no 'Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. (alterado pela instrução normativa 04 de 01/03/2004, BRASIL).

As práticas de higiene para elaboração do produto devem estar de acordo com o Regulamento Técnico para o MERCOSUL sobre as Condições Higiênic-

Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos.

O leite a ser utilizado na produção de queijo tipo minas frescal deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente para assegurar uma reação da enzima fosfatase alcalina residual negativa (A.O.A.C, 1990 – citado na Portaria 352 do MAPA) (BRASIL, 1997) combinado ou não com outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto.

2.2.1.1 Fluxograma de produção de queijo minas frescal.



A indústria queijeira representa um importante segmento do setor lácteo. Minas Gerais é o maior produtor de queijo do Brasil. Os queijos comumente mais produzidos são, em ordem decrescente, o queijo mussarela, o queijo-de-minas (Minas padrão e Minas Frescal) e o requeijão.

Segundo Mello (2008), somente nestes últimos anos surgiu novas pesquisas, tecnologias e conceitos para fabricação do queijo tipo minas frescal. O retorno da utilização de fermentos lácteos; alguns concentrados protéicos e certos tipos de colóides podem se tornar coadjuvantes na fabricação do queijo Minas.

2.2.2 Aspectos físico-químicos

2.2.2.1 Determinação de pH

Segundo Brant et al (2007) a contaminação da maioria das amostras de queijos artesanais por *Staphylococcus coagulase positiva* pode ser explicada pelo fato de as principais fontes de contaminação do queijo ser a matéria-prima e a manipulação por pessoas portadoras desse microrganismo. Este resultado deveu-se provavelmente às condições de meio (pH, atividade de água, inibidores naturais presentes, dentre outros) menos favoráveis à sobrevivência do patógeno no queijo estocado. Ressalta-se que as toxinas, uma vez produzidas, por este microrganismo são resistentes às condições de estocagem.

Cunha Neto et al (2002) ao estudarem a composição e a proteólise do queijo Minas Frescal de baixo teor de gordura verificaram a evolução dessa proteólise que foi acompanhada através da determinação do pH, acidez titulável e índices de proteólise nos dias 2, 10, 20 e 30 após a fabricação. Para todos os queijos, o pH diminuiu com o tempo, enquanto a acidez e os índices de extensão e profundidade de proteólise aumentaram. Os valores médios de pH ficaram em torno de 6,45 a 6,69. Os autores verificaram que os efeitos negativos associados ao aumento do teor de umidade dos queijos (maior intensidade de glicólise e proteólise e maior suscetibilidade a microrganismos contaminantes) predominaram sobre as potenciais vantagens tecnológicas do uso da técnica de ultrafiltração. Em função disso, observou-se uma tendência de diminuição da vida útil desses queijos, em relação aos queijos fabricados pelo método tradicional.

Saboya et al. (1998) estudaram a fabricação do queijo Minas Frescal utilizando leite *in natura* adicionado de 10, 20 e 40% de leite reconstituído a partir de leite em pó integral "medium heat". Acompanharam a evolução da proteólise dos queijos através da determinação do pH, acidez titulável e índices de proteólise em 1, 7, 14 e 21 dias. Observaram que o teor de umidade dos queijos fabricados com adição de leite reconstituído foi maior do que os queijos Minas Frescal tradicionais. Verificaram que até sete dias após a fabricação os produtos mantiveram características que os identificaram como aptos para o consumo. O pH analisado respectivo aos dias 1, 7, 14 e 21 foram 6,77; 6,66; 6,77 e 6,67. Concluíram que é possível produzir queijos de boa qualidade usando até 40% de leite reconstituído adicionado ao leite *in natura*.

O pH do alimento é um dos principais fatores intrínsecos capazes de determinar o crescimento, sobrevivência ou destruição dos microrganismos nele presente. Os microrganismos tem pH mínimo, ótimo e máximo para crescimento (*Staphylococcus aureus* – mínimo 4,0 - 4,7; ótimo 6,0 – 7,0; máximo 9,5 – 9,8). Muitas bactérias mostram um crescimento ótimo a pH próximo de 7,0, enquanto outros são favoráveis em ambiente ácido, provavelmente devido a inibição de outros organismos, eliminando portanto a competição microbiana. As formas ácidas (*Lactobacillus* e *Streptococcus*) podem tolerar acidez moderada, enquanto que tipos proteolíticos (*Pseudomonas*) podem crescer em substratos moderadamente alcalinos.

A indústria de queijos abriu mão do da utilização do tradicional fermento biológico ou fermento láctico (pH 5,0 – 5,3) para o fermento químico ou ácido láctico (pH 6,1 – 6,3) pelo maior tempo de prateleira do segundo. Observa-se os valores de pH encontrados por Rocha (2006) nas marcas de queijo de Minas Frescal na Fig.1.

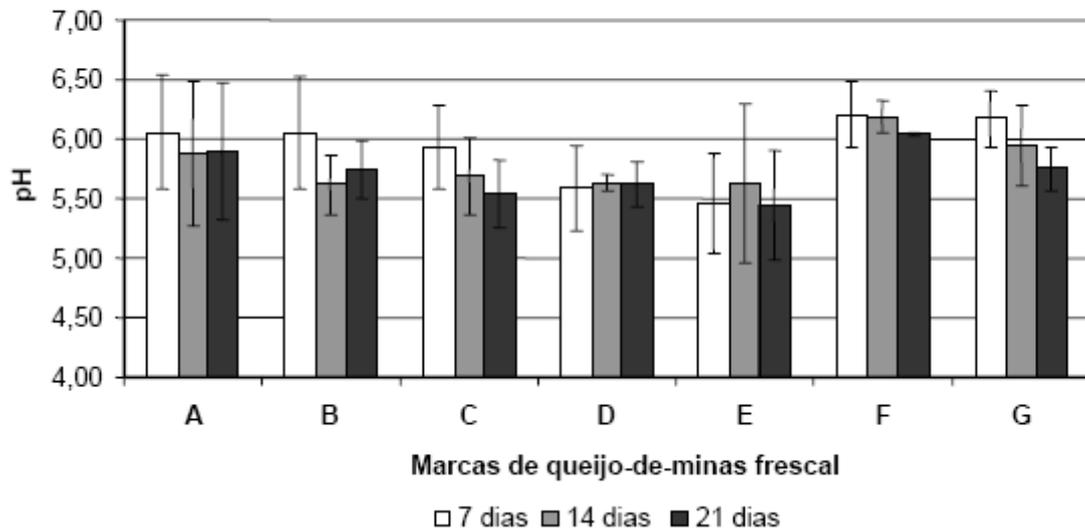


Fig 1 Valores de pH das marcas de queijo minas frescal (A a G) segundo Rocha et. al. (2006).

O gráfico apresenta como o pH torna-se ácido na maioria das amostras em relação a sua validade e/ou período de prateleira (7, 14 e 21 dias) do queijo frescal, mesmo na adição do fermento químico ou do ácido láctico, como normalmente processado nos laticínios.

2.2.3 Aspectos microbiológicos

Os Padrões de Identidade e Qualidade Regulamentares Bacteriológicos para o queijo tipo minas frescal, segundo a Resolução RDC N° 12/01, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, no Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, no Anexo 1, (BRASIL,2001) Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos, estão assim dispostas: “Coliformes a 45°C, 5×10^2 , Estafilococos coagulase positiva 5×10^3 / g; *Salmonella* spp: ausência em 25g”.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia utilizada para contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi de acordo com a Instrução Normativa nº 62 / 2003 da SDA (BRASIL, 2003) e Portaria nº 352 / 1997 do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento referente ao Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal (BRASIL, 1997) e Instrução Normativa nº 68 / 2006 da SDA (BRASIL, 2006). Foram realizadas análises bacteriológicas em 52 amostras de marcas diferentes comercializadas nos municípios estudados.

Os seguintes materiais permanentes e de consumo foram utilizados para as análises físico-químicas e bacteriológicas das amostras de queijo minas frescal utilizadas no presente experimento.

3.1 MATERIAL PERMANENTE

Geladeira Cònsul Praticce 300.

Autoclave vertical, marca Phoenix, capacidade 50 L modelo AV50.

Destilador, capacidade de 5 L/h, marca Biopar, modelo BD 5 L.

Balança de Precisão, eletrônica, microprocessada, marca Marte, máximo 2000 g, 0,01g, modelo AS2000.

Homogeneizador tipo liquidificador, com copo de alumínio de 500 mL, marca M LEONARDO, modelo 3896-A.

Estufa bacteriológica marca Olidef modelo LINEA ECB-2.

Conta-colônias tipo Quebec marca Phoenix modelo CP602.

Peagômetro marca Quimis modelo Q400A.

3.2 MATERIAL DE CONSUMO

Caixa isotérmica para transporte das amostras.

Pipetas graduadas de 1 mL.

Pipetador automático 100-1000 µL.

Placas de Petri de vidro.

Alça de platina.

Agulha de platina.

Meio de cultura Agar Baird-Parker marca VETEC®.

Meio de cultura Caldo BHI marca VETEC®.

Meio de cultura Agar Mueller Hinton HIMEDIA®.

Solução Salina Peptonada 0,1%.

Discos com antimicrobianos para determinação de sensibilidade bacteriana (Polisensidisc 4 x 6 DME).

Demais vidrarias e materiais empregados na rotina de um laboratório de microbiologia.

3.3 MÉTODOS

A seguir serão descritos os métodos utilizados na presente pesquisa, desde a colheita da matéria-prima, o transporte e as análises físico-químicas e bacteriológicas.

3.3.1 Colheita das amostras

As amostras do queijo minas frescal foram adquiridas no mercado varejista dos municípios de Itaperuna-RJ, Bom Jesus do Norte-ES e Bom Jesus do Itabapoana-ES, comercializadas no noroeste fluminense, possuindo o registro da Vigilância Sanitária Municipal e do Serviço de Inspeção, entre os meses de outubro e dezembro de 2007. Foram 14 amostras da marca A, 19 amostras da marca B e 19 amostras da marca C. Totalizando 52 amostras.



Figura 2. Enformagem de queijo minas frescal – procedimento de fabricação da marca A no Noroeste Fluminense em novembro de 2007.

3.3.2 Transporte das amostras

As amostras foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Colégio Técnico Agrícola Ildefonso Bastos Borges, da Universidade Federal Fluminense (CTAIBB/UFF), sob refrigeração acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e, uma vez no laboratório, foram mantidas a temperatura de 4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) até o momento da análise. Antecedendo a análise foram anotadas a data de fabricação e a validade de cada amostra.

3.3.3 Análises

3.3.3.1 *Contagem de Staphylococcus coagulase positivo*

Foram realizadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva em duplicata de todas as amostras coletadas. A metodologia empregada para contagem foi do tipo “spread plate”, conforme recomendação da Instrução Normativa SDA N° 62 (BRASIL, 2003), utilizando o meio de cultura ágar Baird-Parker.

Foram pesados 25g da amostra em uma balança de precisão, acrescentando-se 225 mL de solução salina peptonada 0,1%, a fim de realizar a diluição 10^{-1} . Em um copo estéril de homogeneizador tipo liquidificador procedeu-se a homogeneização da amostra. A diluição seguinte (10^{-2}) foi obtida a partir de adição de 1 mL do homogeneizado em 9 mL de solução salina peptonada 0,1%. As diluições seguintes seguiram o mesmo modelo.

Em seguida retirou-se de cada diluição 0,1 mL, sendo vertido para o interior de uma placa de petri contendo ágar Baird-Parker e imediatamente espalhado pela superfície do meio com uma alça de Drigalski. Aguardou-se a completa absorção da diluição da mostra pelo meio, incubando em seguida, em aerobiose, as placas invertidas em estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$. A leitura ocorreu após 48 h, utilizando-se um conta-colônias tipo Quebec. O resultado da contagem foi expresso em UFC/g, a partir de colônias típicas e atípicas selecionadas entre 20 a 200.

Para confirmação das cepas de *Staphylococcus* spp. procedeu-se semeando uma colônia típica de cada placa onde ocorreu o crescimento. Como cresceram apenas colônias típicas, estas foram transferidas para tubos contendo meio Agar Nutriente Inclinado, utilizando-se agulha de platina.

3.3.3.2 *Morfologia bacteriana e método de coloração de Gram*

Para a observação da morfologia bacteriana e características tintoriais dos microrganismos pesquisados utilizou-se a recomendação da Instrução Normativa nº 62 / 2003 da SDA (BRASIL, 2003) para efeito da identificação de *Staphylococcus* spp. nas amostras. Esse procedimento foi realizado pós semeadura em meio ágar nutriente inclinado, onde preparou-se para a confecção de esfregaços de cinco

lâminas para cada amostra para a realização do método de coloração de Gram, que permite a observação das características morfológicas das colônias.

3.3.3.3 *Teste da catalase*

A Prova da catalase segundo SILVA et al (2001) modificado teve como procedimento o adicionar 1,0 ml de água oxigenada (peróxido de hidrogênio) 3% à cultura, na rampa dos tubos de ágar nutriente inclinado Observou-se a ocorrência de borbulhamento imediato (teste positivo) ou não (teste negativo). Antes de utilizar a cultura em ágar nutriente inclinado para o teste de catalase, preparou-se um esfregaço para coloração de Gram e repicando uma alça em caldo BHI (caldo infusão cérebro coração), para repetições, se necessárias. O *Staphylococcus aureus* é catalase positiva.

3.3.3.4 *Prova da coagulase*

Utilizando-se os cultivos crescidos no meio BHI , incubados a 35⁰ – 37⁰C por 24 h procedeu-se o teste da coagulase. Para isso transferiu-se 0,2 mL de cada cultura obtida em BHI, para um tubo, adicionados aos 0,2 mL de cultura 0,3 mL coagulase plasma de coelho - EDTA, os tubos foram incubados a 37⁰ C por 24 horas, fim de obter-se visualização do coágulo, transformação do fibrinogênio em fibrina. Os tubos contendo coágulos foram considerados positivos e os que não continham visualização de coágulos negativos.

As contagens de *Staphylococcus* foram obtidas pela multiplicação do número de colônias pela recíproca da diluição utilizada e os resultados expressos como UFC.g⁻¹.

3.3.3.5 *Teste de sensibilidade antimicrobiana das cepas de Staphylococcus coagulase positivo*

Pesquisou-se a resistência antimicrobiana para *Staphylococcus coagulase positivo* por meio de testes de sensibilidade. Utilizou-se o antibiograma da marca POLISENSIDISC 12, da DME (Diagnósticos Microbiológicos Especializados). Caixa

contendo 25 (vinte e cinco) unidades; cada unidade composta de 12 (doze) antimicrobianos específicos para cada série.

O procedimento foi uniforme e padronizado para que resultados satisfatórios sejam obtidos.

O meio de cultura padronizado é o Mueller Hinton em placa com espessura uniforme de 5mm.

A concentração do inóculo foi a turbidez equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland. Isto equivale a uma concentração de aproximadamente 10^8 microorganismos/ml. Esta escala se prepara adicionando 0,5ml de cloreto de bário a 1% a 99,5ml de ácido sulfúrico 0,36N, obtendo uma absorvância de 0,080 a 0,100 em espectrofotômetro ajustado em 625 nm.

Os discos que usados foram mantidos sob refrigeração, e em temperatura ambiente antes de serem colocados na superfície do ágar. Os discos que estiverem armazenados como estoque foram mantidos congelados, necessitando um período de aclimação ambiente antes do uso.

A incubação foi isenta de tensão de CO_2 devido a formação de ácido carbônico que umedece o ágar, provocando um abaixamento do pH.. Os diâmetros dos halos foram mensurados cuidadosamente pela parte posterior da placa, utilizando uma fonte de luz brilhante transmitida.

Com uma alça bacteriológica, tocou-se 4 a 5 colônias bem isoladas do mesmo tipo morfológico, de uma cultura de 18 a 24 horas à 35°C , e inoculou-se em salina fisiológica 0,9% até obter a turvação semelhante a escala 0,5 de Mac Farland, obtendo uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10^8 microorganismos por mililitro.

Para inocular a suspensão no ágar, embebeu-se o suabe estéril na suspensão, retirando-se o excesso na parede do tubo e inoculou-se na superfície da placa suavemente em três sentidos diferentes.

A superfície do ágar onde os discos foram colocados estavam secas. O tempo entre a semeadura da placa e a colocação dos discos, não ultrapassou de 15 minutos.

As placas foram incubadas a $35-37^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Em seguida as placas foram examinadas quanto ao diâmetro do halo formado, classificado em resistente, intermediário ou sensível.

3.3.3.6 *Análise de pH*

A análise de pH foi realizada pelo método potenciômetro, utilizando um pHmetro, sendo o eletrodo inserido em um homogeneizado da amostra diluída em solução salina peptonada 0,1% conforme recomendação de BRASIL, 2006.

3.3.3.7 *Análise estatística*

Os resultados bacteriológicos foram tratados estatisticamente através da análise descritiva simples, onde foi realizado o estudo comparativo com utilização de tabelas e figuras. Os resultados de pH foram analisados através de média A e desvio padrão.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme afirmações de Gonçalves e Franco (1996) a ingestão de queijos produzidos em condições inadequadas podem trazer sérios prejuízos à saúde coletiva. A contagem de *Staphylococcus* spp. realizada no presente trabalho permitiu uma discussão sobre o que representa este patógeno na indústria de alimentos, na fabricação do queijo minas frescal.

Sob o aspecto legal, Almeida Filho e Nader Filho (2000) alertam para as condições artesanais de fabricação muitas das vezes inadequadas, mesmo tendo a lei 7889 / 89 que dá aos municípios a competência para exercer a inspeção sanitária, o que invariavelmente não significa garantia de qualidade ao que é produzido. Neste mesmo sentido Loguercio e Aleixo (2001) analisando queijo tipo Minas frescal produzido artesanalmente verificaram que na contagem de *Staphylococcus aureus*, 96,67% dos valores eram superiores a 10^3 UFC/g que é o limite, para legislação em vigor.

Deve-se levar em conta as observações de Almeida Filho (2000) que acredita que tais achados sejam extremamente preocupantes principalmente pelo fato destes valores encontrados para *Staphylococcus* spp. estarem próximos dos requeridos (10^5 UFC/g a 10^9 UFC/g) pelas cepas enterotoxigênicas para produção de enterotoxinas em quantidades suficientes e necessárias para produzirem surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

4.1 CONTAGEM DE *Staphylococcus* coagulase positivo

Dentre os resultados obtidos a marca A teve valores de contagem de *Staphylococcus* spp. entre $1,2 \times 10^6$ e $2,1 \times 10^7$ UFC/g; a marca B atingiu valores entre

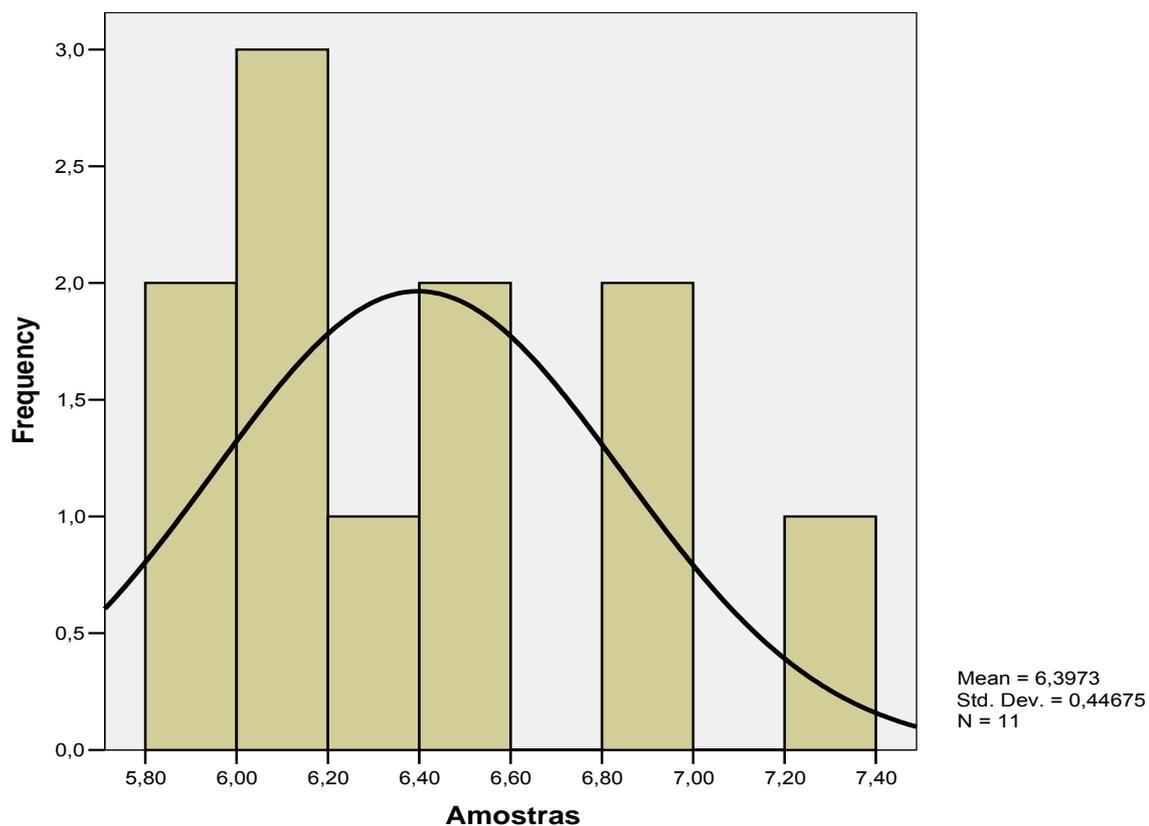
$2,1 \times 10^4$ e $4,8 \times 10^8$ UFC/g e finalmente a marca C onde se registrou uma contagem entre $1,2 \times 10^6$ e $1,2 \times 10^8$ UFC/g. Tais valores encontram-se acima dos limites de 10^3 UFC/g para *Staphylococcus* coagulase positiva ditados pelos padrões microbiológicos conforme a legislação vigente.

Os resultados das contagens realizadas nas amostras das marcas A, B e C estão apresentados na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Valores de UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007.

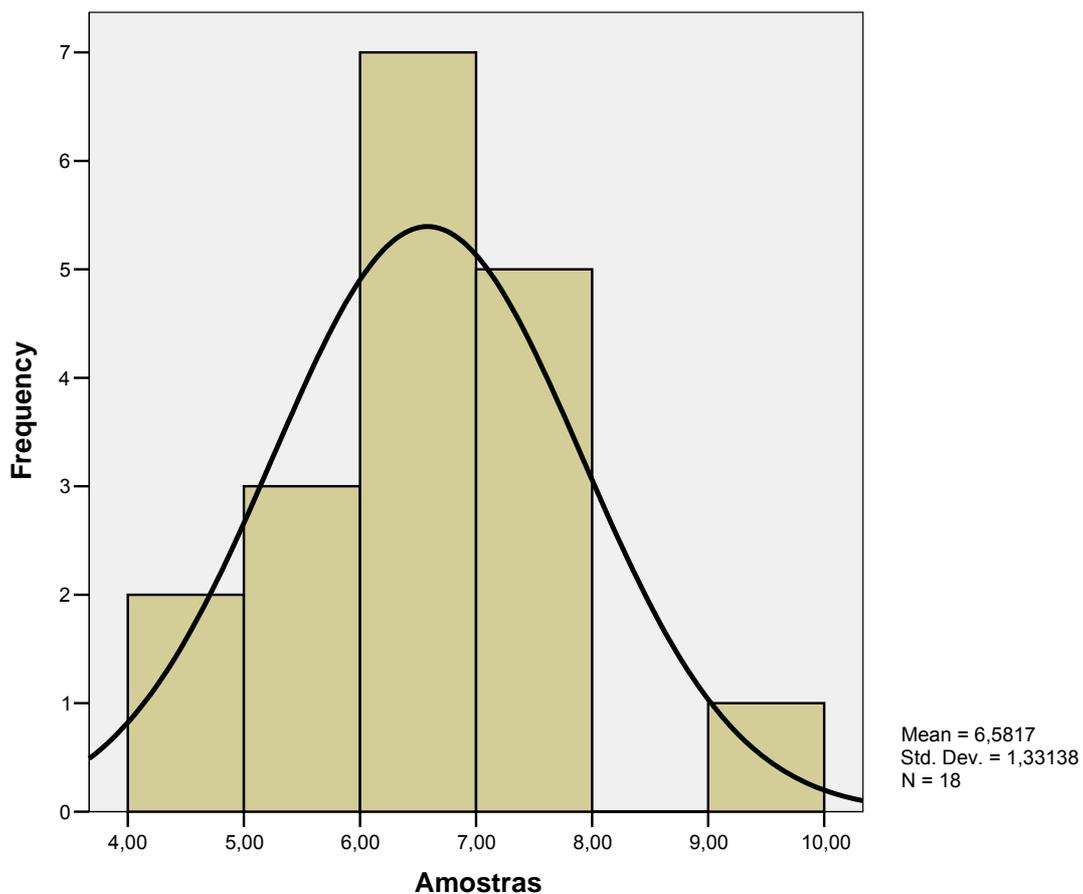
Amostra	Nº UFC/g		Nº UFC/g		Nº UFC/g	
	Marca A	Log	Marca B	Log	Marca C	Log
1	$7,2 \times 10^6$	6,85	$2,1 \times 10^4$	4,32	$6,9 \times 10^6$	6,83
2	$1,2 \times 10^6$	6,07	$3,9 \times 10^5$	5,59	$6,7 \times 10^6$	6,82
3	x	x	$1,1 \times 10^6$	6,04	$1,2 \times 10^6$	6,07
4	x	x	$2,5 \times 10^5$	5,39	$2,0 \times 10^6$	6,30
5	$7,2 \times 10^5$	5,85	$3,2 \times 10^6$	6,50	$1,4 \times 10^7$	7,14
6	$3,1 \times 10^6$	6,49	$3,2 \times 10^6$	6,50	$2,4 \times 10^6$	6,38
7	$2,1 \times 10^7$	6,32	$1,5 \times 10^6$	6,17	$1,6 \times 10^6$	6,20
8	$1,9 \times 10^7$	7,27	$1,4 \times 10^6$	6,14	$1,6 \times 10^6$	6,20
9	$1,6 \times 10^6$	6,20	$5,2 \times 10^4$	4,71	$1,4 \times 10^6$	6,14
10	$2,6 \times 10^6$	6,41	$1,7 \times 10^5$	5,23	$4,1 \times 10^6$	6,61
11	x	x	$3,6 \times 10^6$	6,55	$1,2 \times 10^8$	8,07
12	$8,0 \times 10^6$	6,90	$7,8 \times 10^6$	6,89	$7,3 \times 10^6$	6,86
13	$8,8 \times 10^5$	5,94	$8,5 \times 10^7$	7,92	$1,7 \times 10^6$	6,23
14	$1,2 \times 10^6$	6,07	$4,0 \times 10^7$	7,60	$2,0 \times 10^7$	7,30
15			$7,0 \times 10^7$	7,84	$1,5 \times 10^7$	7,17
16			$4,8 \times 10^8$	9,68	$5,5 \times 10^6$	6,74
17			x	x	$1,1 \times 10^7$	7,04
18			$5,7 \times 10^7$	7,75	x	x
19			$4,5 \times 10^7$	7,65	$3,9 \times 10^7$	7,59

Legenda: (x) significa amostra perdida



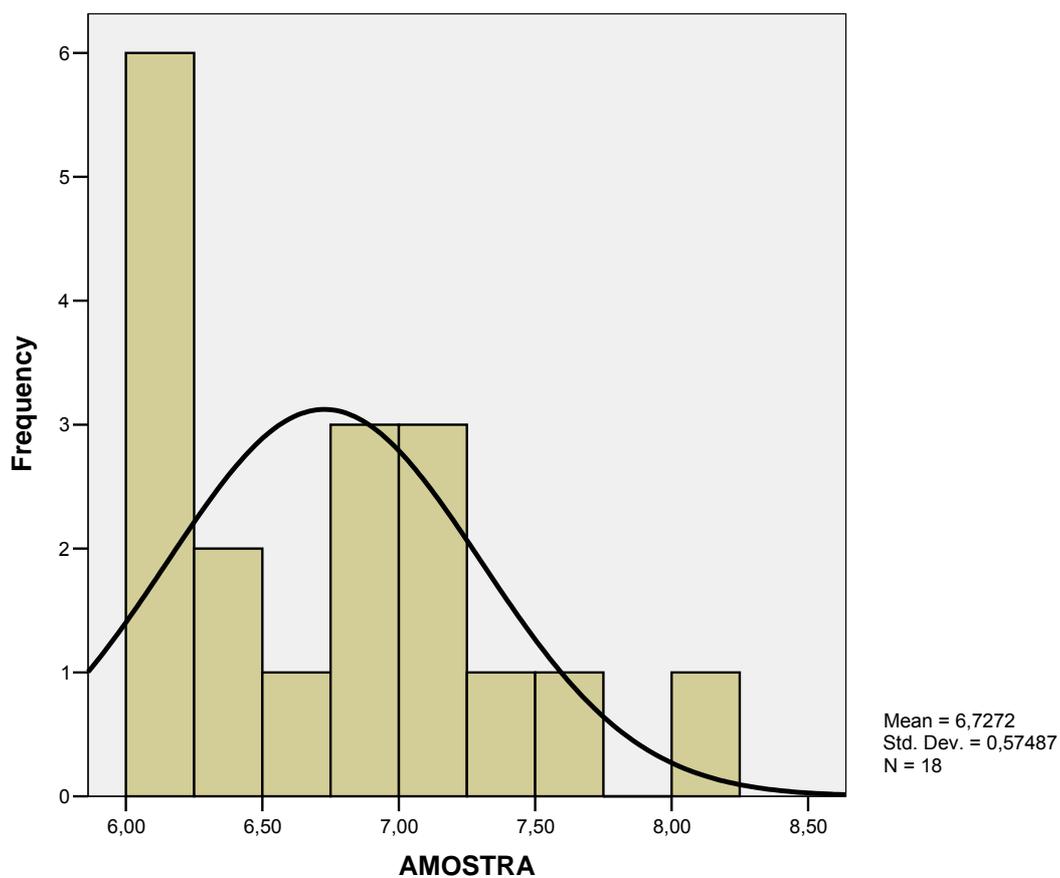
Histograma – Valores de UFC/g de *Staphylococcus coagulase* positivo da marca A

MARCA A	
Média	6,397272727
Erro padrão	0,13469893
Mediana	6,32
Modo	6,07
Desvio padrão	0,446745809
Variância da amostra	0,199581818
Curtose	-0,28213195
Assimetria	0,750627953
Intervalo	1,42
Mínimo	5,85
Máximo	7,27
Soma	70,37
Contagem	11
Nível de confiança(95,0%)	0,30012797



Histograma – Valores de UFC/g de *Staphylococcus coagulase* positivo da marca B

<i>MARCA B</i>	
Média	6,581667
Erro padrão	0,313809
Mediana	6,5
Modo	6,5
Desvio padrão	1,331378
Variância da amostra	1,772568
Curtose	0,310041
Assimetria	0,4053
Intervalo	5,36
Mínimo	4,32
Máximo	9,68
Soma	118,47
Contagem	18
Nível de confiança(95,0%)	0,66208



Histograma – Valores de UFC/g de *Staphylococcus coagulase* positivo da marca C

MARCA C	
Média	6,727222
Erro padrão	0,135499
Mediana	6,715
Modo	6,2
Desvio padrão	0,574874
Variância da amostra	0,33048
Curtose	-0,02189
Assimetria	0,772195
Intervalo	2
Mínimo	6,07
Máximo	8,07
Soma	121,09
Contagem	18
Nível de confiança(95,0%)	0,285878

Os histogramas se baseiam na distribuição normal, Diniz (2001). Na distribuição normal (curva de Gauss) os itens de média μ e desvio padrão σ se distribuem em torno da média nas seguintes proporções aproximadas:

- 68% dos valores no intervalo $\mu \pm \sigma$;
- 95% dos valores no intervalo $\mu \pm 2\sigma$;
- 99,7% dos valores no intervalo $\mu \pm 3\sigma$.

A maioria das medições em processos produtivos resulta numa distribuição normal ou curva em forma de sino também conhecida como curva de Gauss, como pode ser visto na figura 3.

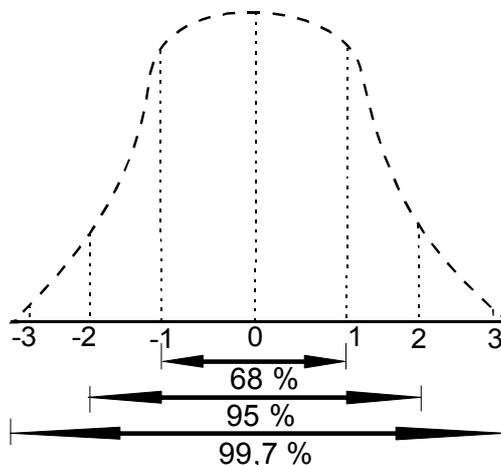


Figura 3: Curva em forma de sino, segundo DINIZ (2001)

Em razão da perda de amostras por falhas técnicas do operador, algumas amostras não apresentaram resultados na tabela. Como por exemplo na marca A, as amostras de número 3, 4 e 11; na marca B, a amostra número 17 e a marca C de número 18.

Na marca A trabalho-se 14 amostras e as marca B e C com 19 amostras respectivamente, totalizando 52 pesquisadas.

Os resultados permitem concluir que os valores encontrados estão acima dos Padrões Microbiológicos regulados pela RDC N°12, da ANVISA, para o queijo minas frescal, onde o valor máximo é de 10^3 UFC/g. Com isso, 100% das amostras analisadas tiveram resultados acima do valor máximo permitido, sendo considerado impróprio para o consumo.

Para facilidade de interpretação os resultados de contagens de estafilococos foram expressos em logaritmo. Nas amostras da marca A tiveram um valor médio de contagem de estafilococos de 6,40, para a contagem da marca B o valor médio

encontrado foi de 6,58 enquanto que na marca C foi de 6,76. A partir daí esses resultados sugerem um valor médio mais elevado na marca C, seguido do resultado da marca B e finalmente da marca A cujos resultados de contagens foram os mais baixos dentre as três marcas.

Tentando expressar esses dados considerando o ponto de vista de higiene de produção desses queijos, poder-se-ia afirmar que a marca A teve um melhor resultado na higiene de processamento do que as marcas B e C, sendo esta última a mais provável de ter tido falha nos procedimentos de higiene na fabricação de seus queijos.

Tais resultados quando comparados aos encontrados por outros pesquisadores como Gonçalves e Franco (1996), indicaram uma alta contagem do número de *Staphylococcus* spp. no queijo tipo Minas frescal. Sugerindo que maior atenção deva ser tomada pelas autoridades sanitárias, uma vez que tais situações comprometem a qualidade, o prazo de vida comercial do produto, alteram suas qualidades sensoriais e põem em risco a saúde do consumidor.

Em um trabalho realizado por Camacho et al. (2004), 33,3% das amostras de *Staphylococcus* spp. foram positivas para coagulase. Estas amostras apresentaram valores de contagens de $1,3 \times 10^5$ a $9,9 \times 10^5$ UFC/g⁻¹ estando acima do limite máximo permitido pela legislação, que é de 10^3 UFC/g⁻¹ embora que, próximo aos valores mais baixos encontrados no presente trabalho de tese cujos valores oscilaram entre $2,1 \times 10^4$ a $4,8 \times 10^8$ considerando as três marcas estudadas nessa pesquisa.

Outro fator importante além das possíveis contaminações pelas mãos e antebraços, como ressalta o autor acima citado e também Picoli et al. (2006), é o fato de não se observar a qualidade da água como bem registraram Amaral et. al. (2003) em seus trabalhos onde os resultados mais expressivos em termos de contaminação foram aqueles provenientes da água do estábulo dos animais que tiveram valores de $4,3 \times 10^4$ a $2,5 \times 10^4$ para *Staphylococcus* spp. Os autores alertaram para a possibilidade de contaminação do leite, ou dos animais, por cepas patogênicas.

Dados de outras regiões como relata Borges et al. (2003), no Ceará, apontam para uma contagem de estafilococos coagulase positiva que varia de $1,0 \times 10^7$ a $2,0 \times 10^9$. Dados estes, mais próximos dos valores encontrados na presente pesquisa.

Sabioni et al. (1988), em sua pesquisa sobre intoxicação alimentar por *Staphylococcus*, reconhece que é comum encontrar estes microrganismos na produção do queijo fresco, mas padrões elevados sugerem que seja considerado alimento infeccioso. Dentro desse raciocínio, Picoli et al. (2006) revelam que as contagens de colônias típicas e atípicas no Ágar Baird-Parker em trabalho por eles desenvolvidos estavam dentro dos limites considerados de risco à saúde caso houvesse consumo desse queijo. As contagens de *Staphylococcus* spp. encontrados na presente pesquisa, apontam para a mesma preocupação dos autores supra citados

Loguercio e Aleixo (2002), em suas pesquisas também verificaram que além da presença de *S. aureus* acima dos limites aceitáveis em 96,67% das amostras, 43,33% destas foram classificadas como potencialmente capazes de causar intoxicação alimentar. Assim, pode-se supor que o tratamento térmico do leite tenha sido ineficiente, ou que estivesse ocorrendo contaminação após este tratamento, devido à manipulação ou contato com superfícies não sanitizadas, ou, o que é mais comum na produção artesanal, estivesse sendo utilizado o leite cru e não o pasteurizado na fabricação do queijo. Tal situação de avaliação tecnológica não seria possível de se determinar a ocorrência ou não da pasteurização nas marcas estudadas no presente trabalho, apenas pelas análises ora desenvolvidas.

4.2 Provas da catalase e da coagulase

A partir do conhecimento de que *Staphylococcus* spp. são catalase positivos a realização dessa prova faz-se necessária conforme preconiza a técnica estabelecida na Instrução Normativa nº 62 (BRASIL, 2003).

Embora sejam provas laboratoriais essenciais na caracterização de *Staphylococcus* spp. não foram encontrados registros numéricos ou percentuais de amostras para essas duas provas que corresponderam positivamente dentre as amostras estudadas por pesquisadores como Stamford et al. (2006); Brito et al. (2002); Assumpção et al. (2001).

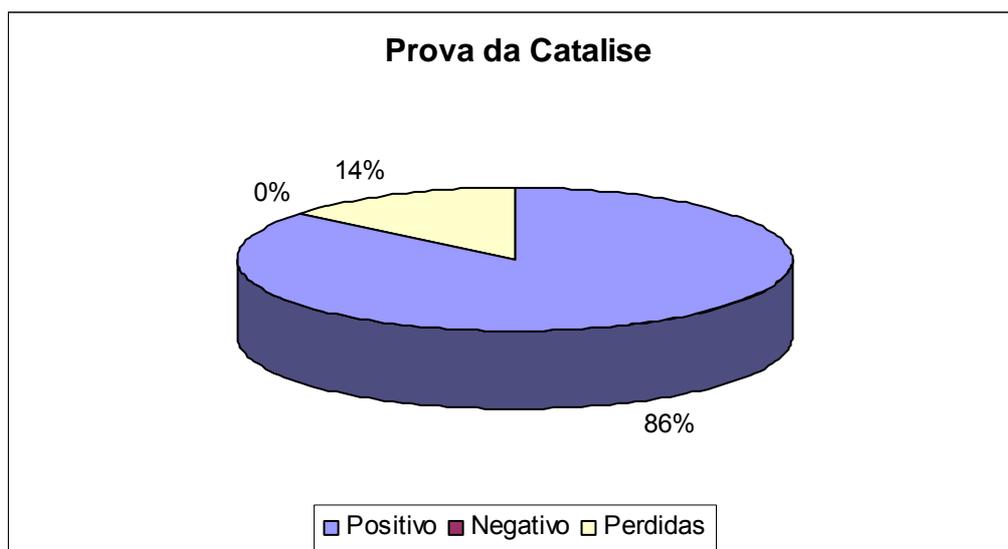
Marca A

Amostras	Prova da Catalase	Prova da Coagulase
1	positivo	positivo
2	positivo	positivo
3	x	x
4	x	x
5	positivo	positivo
6	positivo	positivo
7	positivo	positivo
8	positivo	positivo
9	positivo	positivo
10	positivo	positivo
11	positivo	negativo
12	positivo	positivo
13	positivo	positivo
14	positivo	positivo

Legenda: (x) = amostra perdida.

Tab. 2. Provas da catalase e coagulase no queijo fresco marca A.

Nº de amostras p/ Prova da Catalase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n_i)	Frequência Relativa (f_i)	Porcentagem (%)
14	12	0	2	12	$12/14=0,86$	86%



Nº de amostra p/ Prova da Coagulase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n ₁)	Frequência Relativa (f ₁)	Porcentagem (%)
14	11	0	2	11	13/14=0,78	78%
14	0	1	2	1	1/14=0,07	7%

Marca B

	Prova da Catalase	Prova da Coagulase
1	positivo	positivo
2	positivo	positivo
3	positivo	positivo
4	positivo	positivo
5	positivo	positivo
6	positivo	positivo
7	positivo	positivo
8	positivo	positivo
9	positivo	positivo
10	positivo	positivo
11	positivo	positivo
12	positivo	positivo
13	positivo	positivo
14	positivo	positivo
15	positivo	positivo
16	positivo	positivo
17	positivo	negativo
18	positivo	positivo
19	positivo	positivo

Tab. 3. Provas da catalase e coagulase no queijo fresco marca B.

Nº de amostras p/ Prova da Catalase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n ₁)	Frequência Relativa (f ₁)	Porcentagens (%)
19	19	0	0	19	19/19	100%

Nº de amostras p/ Prova da Coagulase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n ₁)	Frequência Relativa (f ₁)	Porcentagens (%)
19	18	0	0	18	18/19=95	95%
19	0	1	0	1	1/19=0,05	5%

Marca C

Amostras	Prova da Catalase	Prova da Coagulase
1	positivo	positivo
2	positivo	positivo
3	positivo	positivo
4	positivo	positivo
5	positivo	positivo
6	positivo	positivo
7	positivo	positivo
8	positivo	positivo
9	positivo	positivo
10	positivo	positivo
11	positivo	positivo
12	positivo	positivo
13	positivo	positivo
14	positivo	positivo
15	positivo	positivo
16	positivo	positivo
17	positivo	positivo
18	positivo	negativo
19	positivo	positivo

Tab. 4. Provas da catalase e coagulase no queijo fresco marca C.

Nº de amostras p/ Prova da Catalase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n_1)	Frequência Relativa (f_1)	Porcentagens (%)
19	19	0	0	19	19/19	100%

Nº de amostras p/ Prova da Coagulase	Amostras Positivo	Amostras Negativo	Amostras Perdidas	Frequência Absoluta (n_1)	Frequência Relativa (f_1)	Porcentagens (%)
19	18	0	0	18	18/19=0,95	95%
19	0	1	0	1	1/19=0,5	5%

De acordo com as análises efetuadas para catalase e coagulase, os quadros acima mostram os resultados obtidos para as marcas A, B e C de queijo minas fresco estudadas no presente trabalho.

Para a prova de catalase, com exceção de duas amostras perdidas (amostras 3 e 4 da marca A), todas as demais amostras de onde foram retiradas as colônias de bactérias para a prova da catalase apresentaram resultados positivos o que é um dos indicativos do gênero *Staphylococcus*.

Por outro lado, a prova da coagulase teve como diferencial além das duas amostras perdidas na marca A, o fato de que cada uma das três marcas teve um resultado negativo para a prova de coagulase. Colocando em termos de percentuais daquelas amostras examinadas (17 amostras) pode-se concluir que na marca A 5,9% (uma amostra) foram negativas, enquanto que nas marcas B e C tendo sido examinadas todas as dezenove amostras, foi encontrado um valor de coagulase de 5,3% de amostras positivas tanto para a marca B como para a marca C.

4.3 Morfologia Bacteriana pelo Método de Coloração de Gram

Na análise morfológica foi possível registrar as formas cocos, diplococos e cachos em todos os resultados das 52 amostras estudadas, cujos valores estão demonstrados na Tabela 5 abaixo. Das amostras analisadas, seis não ofereceram condições de visualização. Considerando outras formas bacterianas além dos cocos encontradas pode-se verificar seis formas de bacilos, entre as formas predominantes de cocos, sendo quatro amostras na marca A e duas na marca B, correspondendo a 11,5% das 52 amostras entre todas as marcas estudadas. Confirmando a ausência de cuidados higiênicos sanitários no processamento do queijo Minas frescal

Marcas pesquisadas	Número de Amostras	Resultados Gram Positivos	Resultados Gram Negativos	Formas de cocos, diplococos e cachos
A	14	14	0	11
B	19	15	2	19
C	19	19	0	19
TOTAL	52	48 (92,3%)	2 (3,8%)	49

Tabela 05. Resultados da morfologia bacteriana realizada nas marcas A, B e C de queijo minas frescal estudadas no Noroeste do Estado do Rio de Janeiro (2008). Resultados do autor

Ao se analisar o Gráfico 1 observa-se que as formas de cocos, diplococos e cachos encontradas em todas amostras, aliadas ao fato de que as amostras que somente apresentaram bastonetes amostras que tinham na verdade a predominância de cocos, isso pode levar a crer na possibilidade de se tratar do gênero *Staphylococcus*.

A respeito da análise tintorial, pelo método de coloração de Gram, foi verificada a predominância dos resultados das formas Gram positivas, correspondendo a um percentual de 92,3% contra duas amostras Gram negativas encontradas na marca B, o que equivale a 3,8% das amostras. A diferença no número total das amostras foi devido a perdas durante o procedimento de análise.

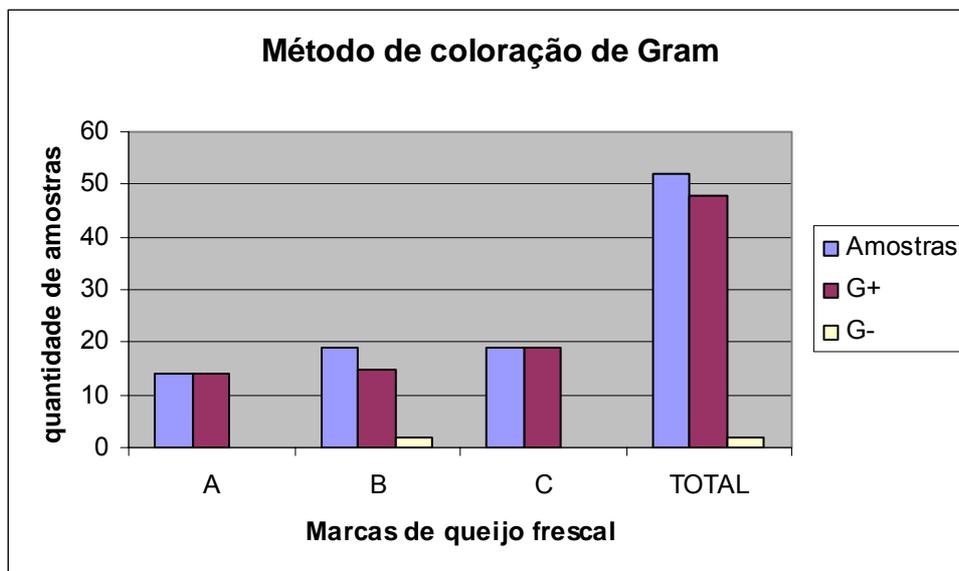


Gráfico 1. Demonstrativo da quantidade de amostras e respectivos resultados da análise tintorial pelo método de coloração de Gram.

O gráfico 1 acima ilustra a distribuição dos resultados da coloração pelo método de Gram, mostrando a ocorrência desses resultados chamando a atenção para a semelhança nas três marcas onde houve um predomínio de resultados Gram positivos.

4.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVO

Os resultados da sensibilidade em disco aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras das marcas das marcas A, B e C estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4.

SENSÍVEL	CPM30	CFO30	CIP05	CLI02	CLO30	ERI15	GEN10	OXA01	PEN10	RIF05	SUT15	VAN30
A	10	11	10	6	11	8	11	10	10	10	10	11
B	10	18	17	11	18	16	18	9	9	14	12	18
C	14	16	18	5	17	13	17	15	14	15	17	16
soma	34	45	45	22	46	37	46	34	33	39	39	45

Tabela 6. Total de amostras com resultados SENSÍVEL nas marcas A, B e C.

INTERMEDIÁRIO	CPM30	CFO30	CIP05	CLI02	CLO30	ERI15	GEN10	OXA01	PEN10	RIF05	SUT15	VAN30
A	0	0	1	2	0	3	0	0	0	1	0	0
B	0	0	0	5	0	0	0	0	0	2	5	0
C	0	1	0	4	1	4	0	0	0	1	1	0
soma	0	1	1	11	1	7	0	0	0	4	6	0

Tabela 7. Total de amostras com resultados INTERMEDIÁRIO nas marcas A, B e C.

RESISTENTE	CPM30	CFO30	CIP05	CLI02	CLO30	ERI15	GEN10	OXA01	PEN10	RIF05	SUT15	VAN30
A	1	0	0	3	0	0	0	1	1	0	1	0
B	8	0	1	2	0	2	0	9	9	2	1	0
C	3	0	0	8	0	0	0	3	3	1	0	1
soma	12	0	1	13	0	2	0	13	13	3	2	1

Tabela 8. Total de amostras com resultados RESISTENTE nas marcas A, B e C.

O quadro abaixo contem os doze antimicrobianos utilizados no presente trabalho e seus respectivos códigos e potências de seus princípios ativos.

Antibacteriano	Código / Potência
1 Cefepime	CPM 30
2 Cefoxitina	CFO 30
3 Ciprofloxacina	CIP 05
4 Clindamicina	CLI 02
5 Clorafenicol	CLO 30
6 Eritromicina	ERI 15
7 Gentamicina	GEN 10
8 Oxacilina	OXA 01
9 Penicilina G	PEN 10
10 Rifampicina	RIF 05
11 Sulfazotrim	SUT 25
12 Vancomicina	VAN 30

Tabela 9: Antimicrobianos utilizados no experimento. Fonte: Própria

Os três gráficos abaixo (2, 3, 4) mostram os valores totais de resultados para sensibilidade, intermediário e resistência considerando as três marcas estudadas.

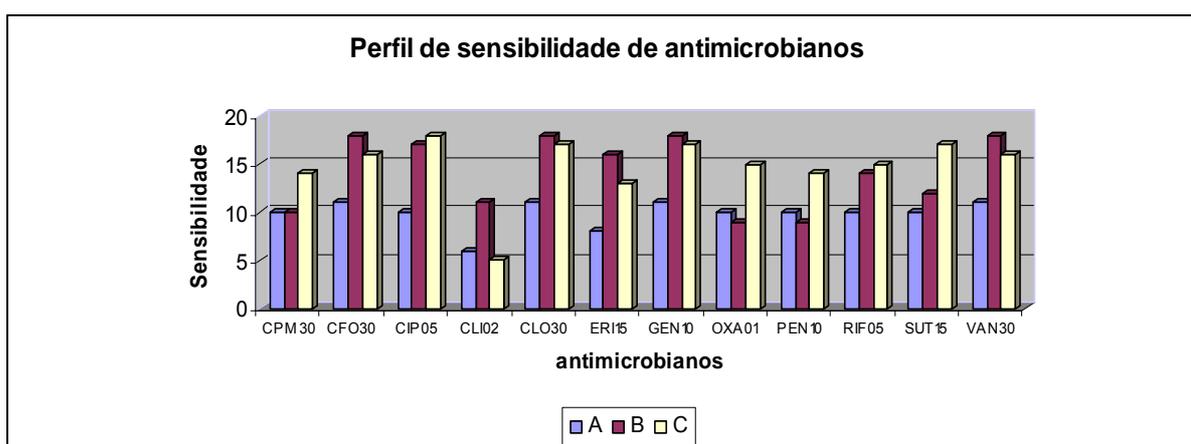


Gráfico 2. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas sensíveis. Fonte: própria.

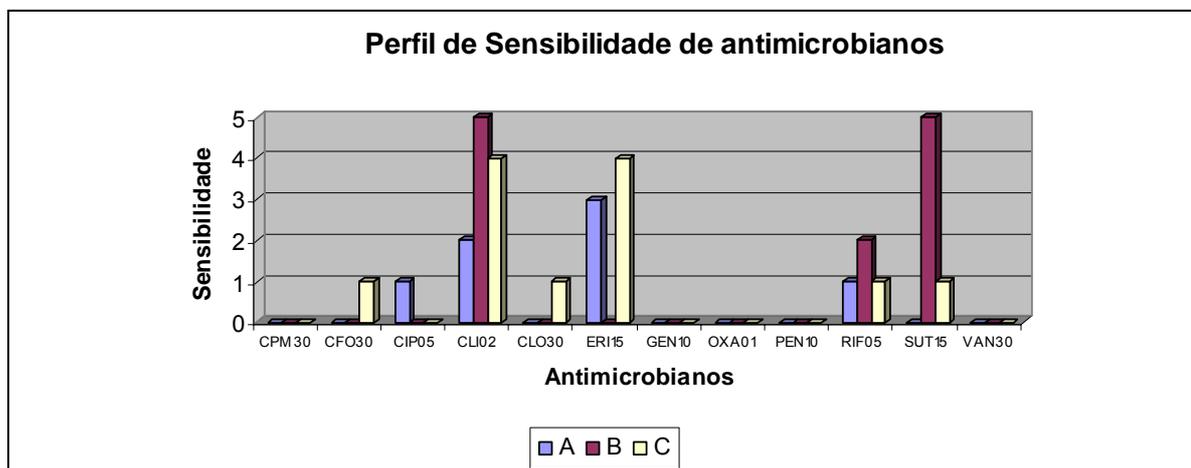


Gráfico 3. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas intermediárias. Fonte: própria.

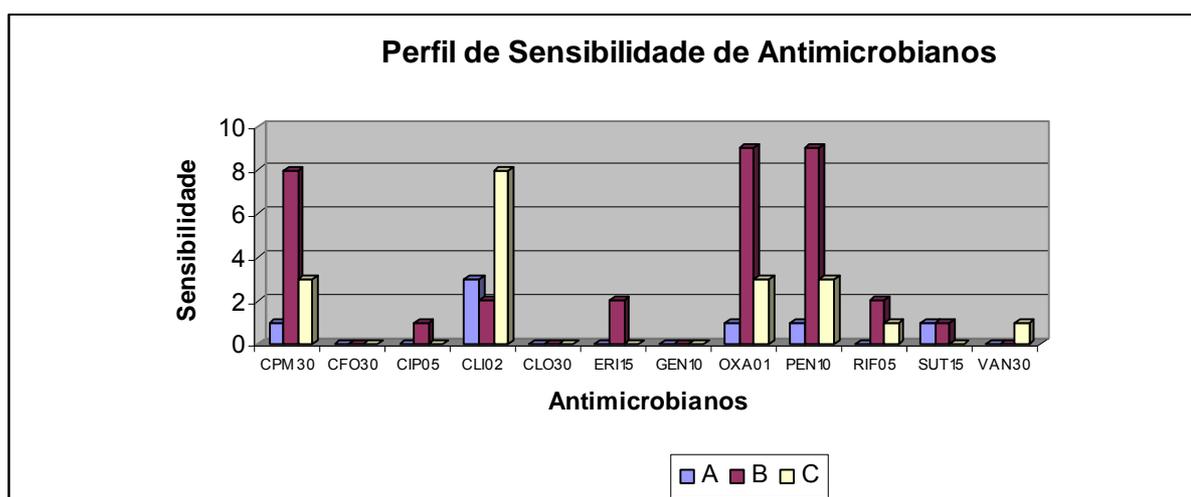


Gráfico 4. Sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Staphylococcus* coagulase positivo das marcas A, B e C de queijo Minas Frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007. Cepas resistentes. Fonte: própria.

Nesta observação, considerando o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados torna-se evidente a ocorrência em maior grau dos resultados da categoria *sensível* seguidos pelos resultados *intemediário* e *resistente*.

Alguns desses antibióticos já aparecem com um grau de resistência que deve ser levado em conta sob o ponto de vista de saúde coletiva como destaca Pelczar (1981). Além da Penicilina (PEN 10) como também cita o autor, o presente trabalho releva a condição de resistência apresentada por outros antimicrobianos como Cefepime (CPM30), Clindamicina (CLI 02) e Oxacilina (OXA 01).

Esses problemas comumente são decorrentes de prescrição sem o devido conhecimento do agente predominante no quadro infeccioso, levando ao uso de um antibiótico que podem não ser o mais indicado como relata Martinez (1994). Essa prática médica pode acontecer por falta de tempo para a espera do resultado ou por indisponibilidade desses dados laboratoriais e acaba por se aplicar uma prescrição baseada na experiência prévia, como reforça o autor.

O mesmo raciocínio pode ser aplicado à medicina veterinária em sua rotina de tratamento de animais com mastite ou outra doença que venha a acarretar na presença de resíduos medicamentosos no leite (FREITAS et. al. 2005). Essa preocupação se confirma nos trabalhos de Almeida et. al. (2003) cujos resultados indicaram os estábulos como local de maior ocorrência de *Staphylococcus sp.*. Mesmo o leite sofrendo tratamento térmico em indústria ou de modo artesanal não exclui a possibilidade da presença das toxinas produzidas por esses patógenos uma vez que são termo-resistentes. Na indústria de alimentos a partir do uso de tratamento térmico ou de outra natureza pode-se eliminar o microorganismo mas sem haver a inativação da toxina por ele produzida (BARRETO, 2001).

4.5 ANÁLISE DE pH

Torna-se obrigatório explicar a ausência de alguns valores iniciais, quando ocorreram falhas na execução de técnica de medição e da manipulação do pHmetro. Corrigiu-se o erro e foram realizadas as demais medições. Os resultados do pH obtido nas amostras das marcas das marcas A, B e C estão apresentados na Tabela 3.

Amostras	Valores de pH		
	Marca A	Marca B	Marca C
1	x	x	x
2	x	x	x
3	x	x	5,80
4	x	6,76	5,98
5	6,99	6,84	6,0
6	6,99	6,78	6,07
7	7,05	6,69	6,05
8	6,98	6,82	5,83
9	6,90	6,66	5,62
10	6,82	5,62	5,55
11	6,87	6,93	5,91
12	6,73	5,80	5,73
13	6,85	6,09	5,39
14	7,08	6,50	5,49
15		5,71	5,34
16		5,58	5,49
17		5,64	5,72
18		6,18	6,05
19		6,09	5,72

Legenda: (x) significa amostra perdida

TABELA 10. Valores médios de pH das marcas A, B e C de queijo minas frescal comercializados no mercado varejista da região Noroeste Fluminense nos meses de outubro a dezembro de 2007.

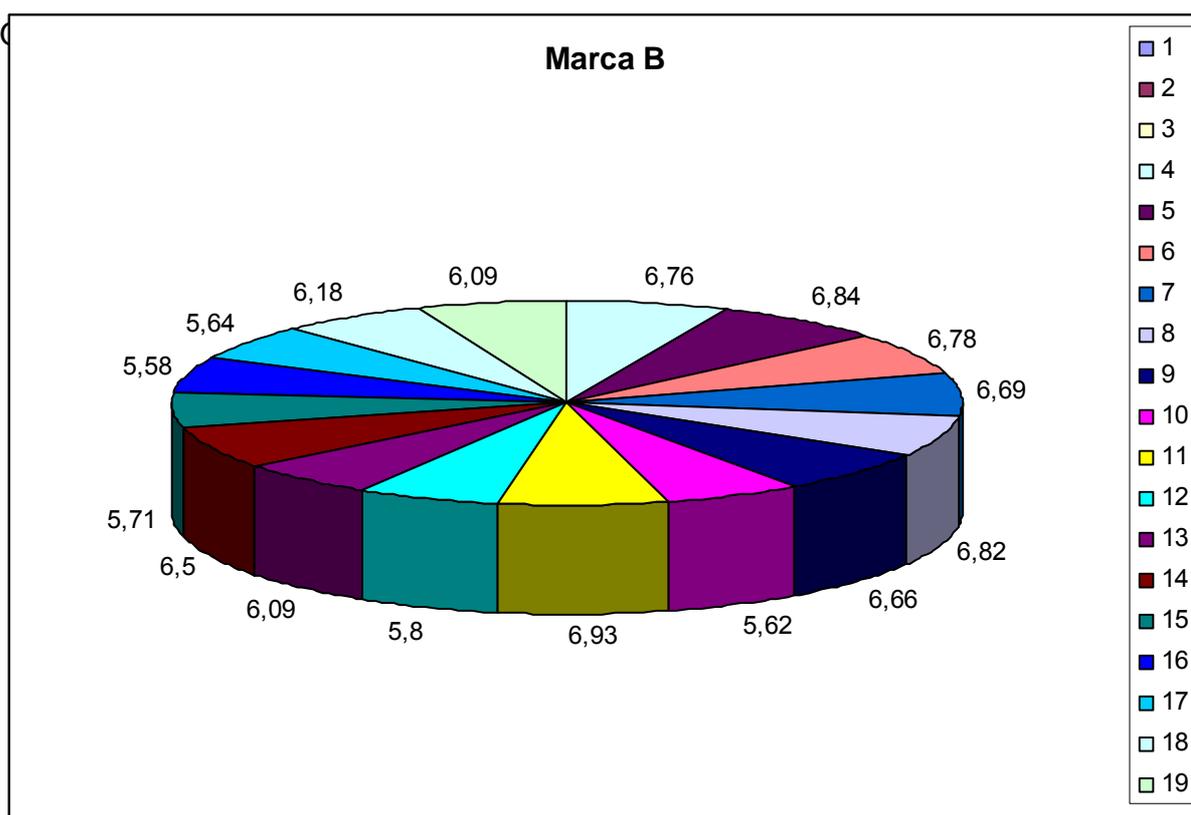
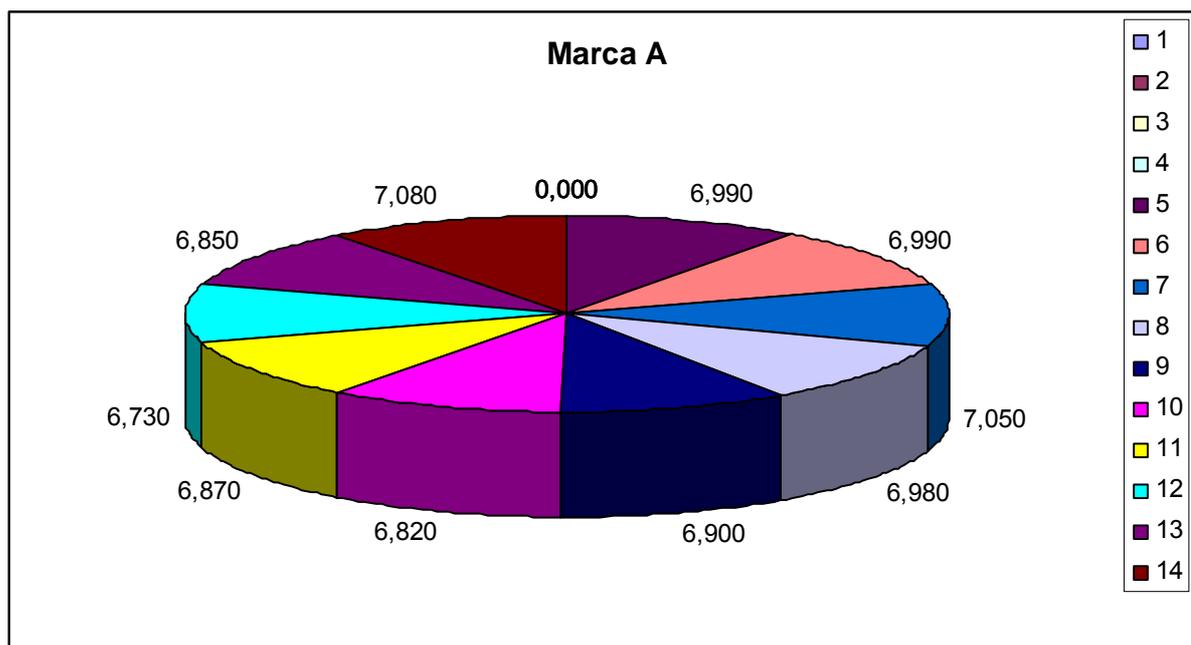


Gráfico 6. Valores médios de pH da marca B de queijo minas frescal.

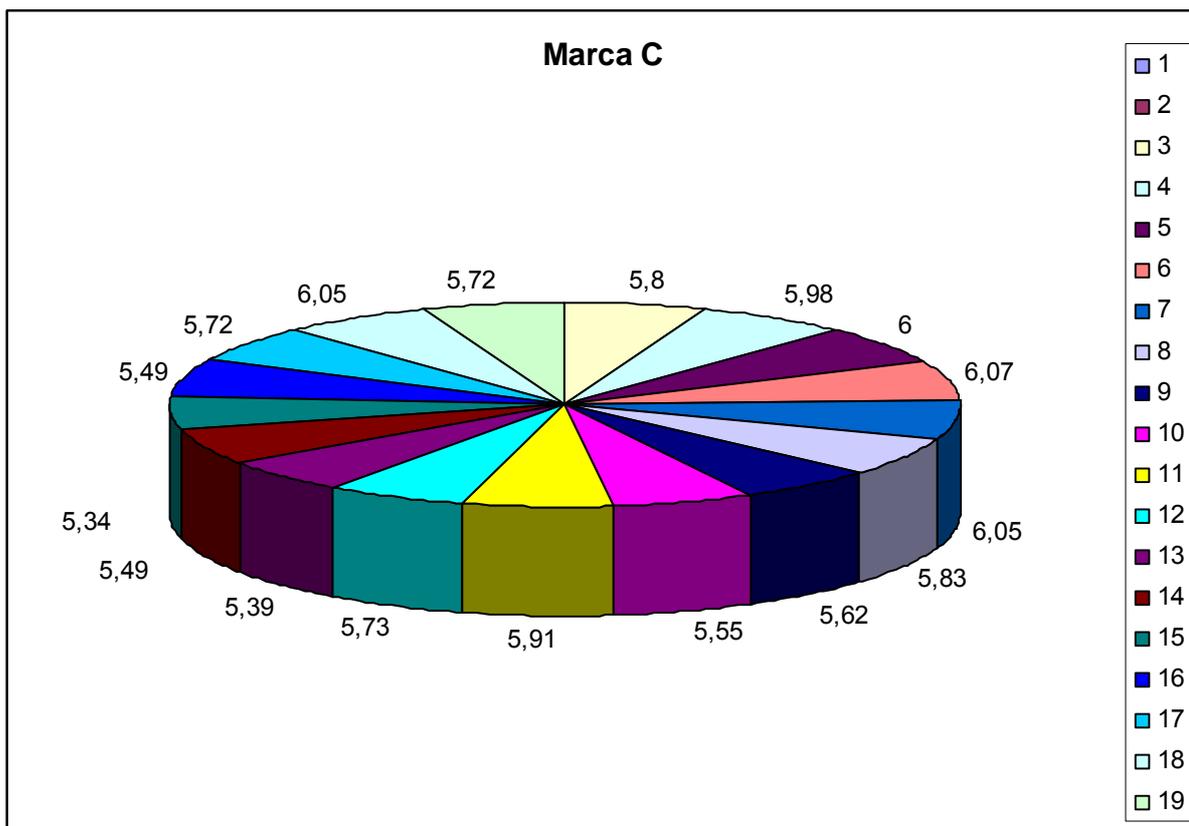


Gráfico 7. Valores médios de pH da marca C de queijo minas frescal.

A respeito da composição química do queijo Tipo Minas Frescal, Pereira (2006) e Grandi (2006) relatam os valores de pH são diferenciados quando processados com fermento láctico ou fermento biológico ocorrendo variações entre 5,0 a 5,3 e com o ácido láctico ou fermento químico entre 6,1 a 6,3.

Cerca de 90% das fabricações são conduzidas sem o uso de fermento láctico, o que obviamente provoca maior retenção de umidade na massa no momento da enformagem.

Os fabricantes desse queijo preferem o ácido láctico porque não continua a fermentação depois de pronto, no comércio, e com fermento este problema pode vir a aparecer, causando dessoramentos e a elevação da acidez o que não é desejado no Minas Frescal, pois diminui o tempo de vida comercial do mesmo. (Informativo Ha-la Biotec sobre o Queijo Minas Frescal. Christian Hansen, 2007).

Na descrição do processamento do Queijo Tipo Minas Frescal, Ordoñez (2007) indica como componente e integrante na elaboração deste produto como padrão, a ácido láctico ou fermento químico, caracterizando assim, a utilização como norma de fabricação.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÃO

Os resultados encontrados permitam concluir que:

As três marcas analisadas no presente trabalho tinham valores bem acima daqueles descritos na legislação, o que leva a crer na inobservância dos cuidados higiênicos durante o processamento do queijo minas frescal.

Conclui-se que uma maior atenção deve ser dada pelas autoridades sanitárias em relação à fabricação desse produto, por constituir risco à saúde dos consumidores.

Recomenda-se a observância das Boas Práticas de Fabricação (BPF) no processamento neste tipo de queijo;

A utilização dos antimicrobianos obedecendo as normas recomendadas;

A ação preventiva do profissional habilitado na fiscalização sanitária em prol da saúde coletiva;

A concessão do registro pelo selo do Serviço de Inspeção Municipal;

A ausência de registros nas Secretarias Municipais de Saúde de toxinfecção alimentar estafilocócica na região pesquisada

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FILHO, E.S. e NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo Minas “frescal”. *Revista de Saúde Pública*, v.34, n.6, p. 578-80, dez 2000.

ALMEIDA, A.D.; MENDES, A.P.; PEREIRA, F.F.; PASQUA, M.C.; VEIGA, S.M.O.M. Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijo minas frescal comercializado na cidade de Alfenas, MG. *Higiene Alimentar*, v. 20, n.147, p.45-49, dez, 2006.

ALMEIDA, R.C.C.; KUAYE, A.Y.; SERRANO, A.M.; ALMEIDA, P.F. . Avaliação e controle de qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Revista Saúde Pública*, v. 29, n. 4, p.290-94, 1995.

AMARAL. L.A.; ROSSI JÚNIOR, O.D.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS,. Ocorrência de *Staphylococcus sp.* em água utilizada em propriedades leiteiras do estado de São Paulo. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.55, nº5, Belo Horizonte (MG), out 2005.

A.O.A.C. 15 ed. 979.13 p.823, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE QUEIJO. análises microbiológicas de alimentos . Disponível em: <<http://www.abiq.com.br>>. Acesso em: 20 junho 2006.

ASSUMÇÃO, E.G.; VALLE-PICCOLI, R.H.; ABREU, L.R. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n.3, Belo Horizonte(MG), jun, 2003.

AZEVEDO, A.G.; CAMPOS, P.H.B. Estatística Básica. Livros Técnicos e Científicos Editora, 4 ed., Rio de Janeiro, 1986.

BARRETTO, E.S.S. Doenças transmitidas por alimentos. Artigo impresso. Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro, RJ, 2001.

BEHMER, M.L.A. Tecnologia do Leite: produção – industrialização e análise, Ed. Nobel, São Paulo (SP), 1984.

BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo de coalho produzido no estado do Ceará, Brasil. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos - B.CEPPA, Curitiba (PR), vol.21, nº1, jan-jun, 2003.

BRASIL, Instrução Normativa nº 68 / 2006 da SDA. *Diário Oficial da União*

BRASIL, Lei Nº 7889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* de 24/11/1989 , Seção 1 , Página 21529.

BRASIL. Decreto nº 30691 de 29 de março de 1952, alterado pelo decreto nº 1255 de 25 de junho de 1962, nº 1236 de 02 de setembro de 1994, nº 1812 de 08 de fevereiro de 1996 e nº 2244 de 04 de junho de 1997. Aprova o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 7 de julho de 1952.

BRASIL. Instrução Normativa nº 51/2002, Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite.

BRASIL. Instrução Normativa SDA (Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário), nº 62, de 26 ago 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas e para controle de produtos de origem animal e água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II Métodos Físico Químicos. Brasília, DF, 1981, 123p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de vigilância Sanitária, RDC nº12 2001.

CASTRO, P.S., Apostila de aulas práticas, *Tecnologia de leite e derivados*, Universidade Católica de Goiás, GO, fev, 2005

CASTRO, P.S., Apostila de aulas práticas, *Tecnologia de leite e derivados*, Universidade Católica de Goiás, GO, fev, 2007

CHAVES, G.M.C.; GONÇALVES, P.M.R.; FRANCO, R.M.; CARVALHO, J.C.A.P., Avaliação bacteriológica de lingüiça frescal suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. *Higiene Alimentar*, v.14, n. 73, p. 48-52, jun, 2000.

CUNHA NETO, A.; SILVA, C.G.M.; STAMFORD, T.L.M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, n. 3, 2002.

DINIZ, M. G. Desmistificando o controle estatístico de processos. São Paulo: Artliber, 2001.

DÜRR, J.W., Organização da cadeia produtiva para qualidade do leite, artigo, Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, CBQL, Clínica do Leite/ ESALQ(USP), 2005.

Editorial do Boletim Informativo, Ha-La Biotec, da Christian Hansen, Queijo Frescal, nº 52, jun/ago/set, 2007.

EUTHIER, S.M.F.; TRIGUEIRO, I.N.S.; RIVERA, F. .Condições higiênicas-sanitárias do queijo de leite de cabra “tipo coalho”, artesanal elaborado no Curimataú paraibano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, n.2, Campinas, mai/jun, 1998.

FORSYTHE, S.J. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Artmed Editora, Porto Alegre (RS), 2002.

FRANCO, R.M e ALMEIDA, L.E.F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ., *Higiene Alimentar*, v. 6, n. 21, p.33-36, mar. 1992.

FRANCO, R.M.; CAVALCANTI, R.M.S.; WOOD, P.C.B.; LORETTI. V.P.; GONÇALVES, P.M.R.; OLIVEIRA, L.A.T. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados, *Higiene Alimentar*, v.14, n.68/69, p.70-77, jan-fev, 2000.

FREITAS, E.I. Detecção de genes enterotoxinas de *Staphylococcus spp*. Isolados no queijo minas frescal. Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FREITAS, M.F.L., MOTA, R.A.; LEÃO, A.E.D.S.; FIGUEIREDO, M.L.; FONTE, M.M.; VIEIRA, R.F.C. .Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus spp*. isoladas de frango comercializadas em Recife, *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 56, n.3, Belo horizonte (MG), jun. 2004.

FREITAS, M.F.L., PINHEIRO JÚNIOR, J.W., STAMFORD, T.L.M., RABELO, S.S. de A., SILVA, D.R. da, SILVEIRA FILHO, V.M. da, SANTOS, F.G.B., SENA, M.J da, MOTA, R.A. Perfil de Sensibilidade Antimicrobiana *in vitro* de *Staphylococcus Coagulase positivos* isolados de leite de vacas com Mastite no Agreste do Estado de Pernambuco, *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v. 72, n. 2, p.171-177, abr/jun, 2005.

GONÇALVES, P.M.R e FRANCO, R.M. Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.3, n.1, p.05-09, jan/abril, 1996.

GONÇALVES, P.M.R. e FRANCO, R.M. Coliformes fecais, *Salmonella* e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal, *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 3, n.1, p.05-09, jan./abril 1996.

GONÇALVES, R.M.S.; FRANCO, R.M., Determinação da carga bacteriana em leite pasteurizado tipos “B” e “C”, comercializados na cidade do Rio de Janeiro, RJ., *Higiene Alimentar*, v. 2, n. 53, p.61-5, jan-fev, 1998.

GRANDI, A. Z.; ROSSI, D. A. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado na cidade de Uberlândia-MG. In: VI Encontro Interno de Iniciação

Científica, 2006, Uberlândia. Anais do VI Encontro Interno de Iniciação Científica, 2006.

Microbiologia Médica, artigos, disponível em <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/estafilococos.pdf>. P. 16, acessado em 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Pesquisa Industrial, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p. 25, 2005.

LEITE, C.C.; GUIMARÃES, A.G.; ASSIS, P.N.; SILVA, M.D.; ANDRADE.C.S. . Qualidade bacteriológica do leite integral (tipo C) comercializado em Salvador(BA), *Revista Brasileira de Saúde Pública*. AM. v.3, n.1, p. 21-25, 2005.

LOGUERCIO, A.P.e ALEIXO, J.A.G., Microbiologia de queijo tipo frescal produzido artesanalmente. *Ciência Rural*, Santa Maria(RS), v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.

MARQUES, M.R.H.; MARTINS, R.P.; CUNHA NETO, A. Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* em leite e queijo: identificação, perfil enzimático e biotipagem. *Higiene Alimentar*, v.21, n.140, p.86-94, abr. 2006.

MARTINEZ, R.; GIRONI RHAR; SANTOS, V.R. dos. Sensibilidade bacteriana a antimicrobianos, usados na prática médica – Ribeirão Preto-SP. *Revista de Medicina*, v. 29, p.278-284, abr/set.,1996.

MELLO, F.F. Produção de queijo Minas Frescal. Portal Hexis Científica. Disponível: <http://hexis.com.br/portal/sistema> Acesso em: mai 2008.

S/A. Microbiologia Médica. Disponível em; <http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/estafilococos.pdf>. Acesso em: 2007

OLIVEIRA, T.F.R. *Estatística Aplicada à Educação*. Livros Técnicos e Científicos Editora, Rio de Janeiro, 1986.

ORDÓÑEZ, J. A. *Tecnologia de Alimentos: Alimentos de Origem Animal*. Porto Alegre: Artemed, 2005.

PELCZAR,M.; REID, R.; CHAN, E.C.N. *Microbiologia*, vol 1 e 2, Ed. McGraw-Hill, São Paulo(SP), 1981.

PEREIRA, M.M.G; Lima, M.T.; Santana, M.F.S. *Queijo minas frescal*. Comunicado Técnico, n. 12, p. 1-4, abril, Universidade Federal do Piauí, 2006.

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

PINTO, A.F.M.A., Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos, ver Millenium – on line, seção, Educação, Ciência e Tecnologia, n.4, out. 1996, disponível em: www.ipv.pt/millenium/ect4_1.htm

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

ROCHA, J.S.; BURITI, F.C.A. e SAAD, S.M.I.. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2006, vol.58, n.2, pp. 263-272.

RUBEZ, J. As grandes conquistas do leite do Brasil, artigo, Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite, CBQL, Clínica do Leite/ ESALQ(USP), 2005.

SABIONI, J.G; HIROOKA, E.Y.; SOUZA, M. L. R. .Intoxicação alimentar por queijo Minas frescal por *Staphylococcus aureus*. *Revista de Saúde Pública*, São Paulo, v. 22, p. 458-61, 1988.

SILVA, B.E. Antimicrobianos, artigo, disponível em www.fmt.am.gov.br/manual/antimic.htm. Acesso em setembro de 2007

SILVA, B.E., Antimicrobianos, artigo, disponível em: www.fmt.am.gov.br/manual/antimic.htm. Acesso em maio de 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*, 2 ed., São Paulo: Livraria Varela, 2001. 317p.

SILVA, W.P. e GANDRA, E.A. Estafilococos coagulase positiva: patógenos de importância em alimentos, *Revista Higiene Alimentar*, 2002.

SPIEGEL, M.R. *Estatística*, Coleção Schaum, Ed. Mc Graw-Hill, São Paulo, 1977.

TEIXEIRA, L.V.; FONSECA, L.M.; MENEZES, L.D.M., Avaliação da qualidade microbiológica do soro de queijo Minas padrão e mozzarella produzidos em quatro regiões do estado de Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.59, n.1, Belo Horizonte (MG), fev., 2007.

TOMICH, R.G.P.; TOMICH, T. R.; AMARAL, C.A.A.; JUNQUEIRA, R.G.; PEREIRA, J.G. Metodologia para avaliação das boas práticas de fabricação em indústrias de pão de queijo. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.1, p.115-120, jan-mar, 2005.