

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

QUALIDADE DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM MANAUS, AM

ERIKA TAVARES PIMENTEL

MANAUS - AMAZONAS

Dezembro, 2019

ERIKA TAVARES PIMENTEL

QUALIDADE DE QUEIJO COALHO COMERCIALIZADO EM MANAUS, AM

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Felipe Faccini dos Santos, Dr.  
Coorientador: Alexandre Alberto Tonin, Dr.

MANAUS - AMAZONAS

Dezembro, 2019

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

P644q Pimentel, Erika Tavares  
Qualidade de queijo coalho comercializado em Manaus, AM /  
Erika Tavares Pimentel. 2019  
51 f.: 31 cm.

Orientador: Felipe Faccini dos Santos  
Coorientador: Alexandre Alberto Tonin  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade  
Federal do Amazonas.

1. Artesanal. 2. Bactéria. 3. Dta. 4. Inspeção. 5. Segurança. I.  
Santos, Felipe Faccini dos II. Universidade Federal do Amazonas  
III. Título



Aos meus pais, irmãos, esposo e em especial ao meu filho Adam, que são o alicerce da minha vida.

**Dedico**

## **Agradecimentos**

A Deus por ter me amparado em todos os momentos de fraqueza para que eu pudesse desenvolver este trabalho. A minha Nossa Senhora, minha Mãe querida a quem tanto roguei e me conduziu pelo melhor caminho.

Aos meus pais, Francisco e Izabel, meus melhores amigos, que estão ao meu lado me incentivando e apoiando em toda a minha vida. O amor incondicional que me foi concedido é o que me sustenta. À minhas amadas irmãs e meus irmãos, por toda dedicação a minha educação e meus estudos, sempre me ajudando e me dando forças para vencer.

Ao meu esposo Tierre, meu grande amigo e companheiro incansável, muito obrigada pelo amor e paciência de sempre.

Ao meu filho Adam, que Deus o mandou no momento certo para me encorajar e obter forças para vencer este desafio.

Ao meu orientador, professor Dr. Felipe Faccini por todo o conhecimento que me foi cedido durante este período do mestrado, tenho certeza que fiz um grande amigo o qual tenho uma enorme admiração e carinho. Minha gratidão será eterna.

Ao meu amigo, Rodiney Reis, pela incansável parceria durante todo o experimento, por tantas vezes me segurar quando já não via mais alternativa em relação a algum obstáculo. Compartilhamos conhecimentos e experiência acadêmica, porém a sua amizade foi o mais importante durante todo esse período.

Ao meu amigo Moisés Chagas, por ser determinado e muito paciente, me auxiliando durante o projeto. Obtivemos conhecimentos juntos, os quais foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Serei eternamente grata.

Às minhas queridas acadêmicas do Curso de Medicina Veterinária do Instituto Federal do Amazonas, Joziane Silva de Souza, Bianca Cristina de Oliveira e Ananda Santiago, pela ajuda durante a fase experimental do projeto e pela amizade.

Ao professor Dr. Antônio José Inhamuns, por disponibilizar seu laboratório para que pudéssemos realizar as análises físico-químicas. E, em especial ao técnico de laboratório Carlos Ferreira, pelo apoio nas análises da composição centesimal, sua ajuda foi imprescindível.

Por fim, a todos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Amazonas, aos queridos colegas de sala de aula e aos nossos coordenadores por estarem dispostos a nos ajudar e nos acolher em todos os momentos.

Meus sinceros agradecimentos!

“Tudo posso naquele que me fortalece.”

**Felipenses 4:13**

## Resumo

A produção de queijo coalho representa uma atividade de importância social, econômica e cultural para várias regiões do Brasil. Em Manaus, este tipo de queijo possui grande popularidade. No entanto, sua fabricação não conta com tecnologia apropriada para a melhoria da qualidade, não existe padronização no processo de elaboração e é comum o emprego de leite cru, o que coloca em risco a saúde do consumidor. O objetivo foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do queijo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM. Foram analisadas 40 amostras; sendo 20 amostras de feiras, não fiscalizadas por órgãos governamentais, e 20 amostras de supermercados, fiscalizados. As análises microbiológicas foram Contagem padrão em placa; Contagem de leveduras e bolores; Contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva; Estimativa do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes e isolamento de *Salmonella* spp. A qualidade físico-química foi avaliada pelos seguintes parâmetros: temperatura de exposição do produto, pH, acidez titulável, umidade, gordura, gordura no extrato seco, cinzas e proteína. A análise microbiológica mostrou diferenças ( $P < 0,05$ ) para microrganismos psicrófilos, leveduras e bolores, estafilococos e *Staphylococcus* coagulase positiva, com maiores contagens observadas em queijos obtidos de feiras. Não foram observadas diferenças para os microrganismos mesófilos e coliformes termotolerantes quanto à origem das amostras. Em relação aos resultados físico-químicos, ocorreram diferenças ( $P < 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas, exceto Gordura na matéria seca e Teor de proteínas. O queijo coalho comercializado em Manaus possui qualidade físico-química de acordo com a legislação e a origem do queijo não influenciou suas porcentagens dos constituintes. Quanto ao risco microbiológico para os consumidores, os queijos não inspecionados na feira representam um risco maior do que os queijos inspecionados em supermercados. A qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado em Manaus deve ser melhorada para melhor adequação aos limites legais.

**Palavras-chave:** Artesanal; Bactéria; DTA; Inspeção; Segurança.

## Abstract

The production of coalho cheese represents an activity of social, economic and cultural importance for several regions of Brazil. In the microregion of Manaus, located in the North region of Brazil, this type of cheese has great popularity. However, its manufacture does not have appropriate technology to improve quality, there is no standardization in the process of elaboration, and the use of raw milk is common, which endangers the health of consumers. The objective was to evaluate the microbiological and physicochemical quality of coalho cheese marketed in the city of Manaus-AM. Forty samples were analyzed, being 20 from street markets, not inspected by government agencies, and 20 from supermarkets, inspected. Microbiological analysis were Aerobic plate count; Yeast and mold count; Coagulase positive *staphylococci* count; Most Probable Number of thermotolerant coliforms and *Salmonella* spp. isolation. Physicochemical quality was evaluated by the following parameters: product exposure temperature, pH, titratable acidity, moisture, fat, fat in dry extract, ash, and protein. The microbiological analysis showed differences ( $P < 0.05$ ) for psychrotrophic microorganisms, yeasts and molds, staphylococci and coagulase-positive staphylococci with higher counts observed in cheeses obtained from street markets. It was not observed differences for mesophilic microorganisms and thermotolerant coliforms regarding the origin of the samples. Regarding physicochemical results, differences ( $P < 0.05$ ) occurred for all variables analyzed, except for Fat in dry matter and Protein content. Coalho cheese commercialized in Manaus has physicochemical quality in accordance to the law and the origin of the cheese did not influence its content percentages. This product represents a microbiological risk for consumers and street market not inspected cheeses represents a higher risk than supermarket inspected cheeses. Microbiological quality of coalho cheese commercialized in Manaus must be improved to better fit legal limits.

**Keywords:** Artisanal; Bacteria; Food-borne disease; Inspection; Safety.

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| Tabela 1. Contagem de microrganismos e médias dos parâmetros físico-químicos e erro padrão das médias (MEV) do queijo coalho obtidos em diferentes tipos de estabelecimentos.....      | 40 |
| Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson para relações entre a contagem de microrganismos e variáveis físico-químicas do queijo coalho obtido em estabelecimentos de varejo..... | 41 |

## LISTA DE SIGLAS

ADAF - Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Amazonas

BDA - Ágar batata dextrose

BHI - Brain Heart Infusion (Infusão de Cérebro Coração)

BPA - Ágar Baird-Parker

DTAs - Doenças transmitidas por alimentos

LIA - Lisine Iron Agar (Ágar lisina ferro)

NMP - Número mais provável

PCA - Plate Count Agar (Ágar Padrão de Contagem)

RV - Rappaport Vassiliadis

SC - Selenito Cistina

SIE - Serviço de Inspeção Estadual

SIM - Ágar Sulfeto Indol Motilidade

STEC - Shiga-toxin *Escherichia coli*

TSI - Triple Sugar Iron Agar (Ágar triplo açúcar ferro)

VB - Ágar Verde Brilhante

XLD - Ágar Xilose Lisina Desoxicolato.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1 HISTÓRICO E MERCADO DE QUEIJO NO BRASIL.....   | 15        |
| 2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO COALHO NO AMAZONAS.....   | 16        |
| 2.3 DEFINIÇÃO DE QUEIJO COALHO.....  | 17        |
| 2.4 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO COALHO.....   | 18        |
| 2.5 NORMATIVAS PARA O CONSUMO DE QUEIJO COALHO.....  | 20        |
| 2.6 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO.....  | 20        |
| 2.6.1 Microrganismos mesófilos aeróbios.....   | 21        |
| 2.6.2 Microrganismos psicrotróficos aeróbios.....  | 21        |
| 2.6.3 Bolores e leveduras.....   | 22        |
| 2.6.4 Coliformes termotolerantes.....  | 22        |
| 2.6.5 <i>Staphylococcus coagulase positiva</i> .....   | 23        |
| 2.6.6 <i>Salmonella spp</i> .....  | 24        |
| 2.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJO COALHO.....  | 25        |
| 2.8 IMPORTÂNCIA DO QUEIJO COALHO NA SAÚDE PÚBLICA.....   | 26        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....  | 30        |
| 3.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO.....  | 30        |
| 3.2.1 Preparo das amostras.....  | 31        |
| 3.2.2 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e de microrganismos psicrotróficos aeróbios estritos e facultativo..... | 31        |
| 3.2.3 Contagem de <i>Staphylococcus aureus coagulase positiva</i> .....  | 31        |
| 3.2.4 Determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes.....  | 32        |
| 3.2.5 Pesquisa de <i>Salmonella spp</i> .....  | 32        |
| 3.2.6 Contagem de bolores e leveduras.....   | 33        |
| 3.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DO QUEIJO COALHO.....  | 33        |
| 3.3.1 Temperatura de exposição do produto.....   | 33        |
| 3.3.2 Preparo das amostras.....  | 33        |
| 3.3.3 Acidez.....  | 34        |
| 3.3.4 Determinação de pH.....  | 34        |
| 3.3.5 Umidade.....   | 34        |
| 3.3.6 Cinzas.....  | 35        |
| 3.3.7 Determinação de lipídeos (método de Bligh-Dyer).....   | 35        |
| 3.3.8 Proteína.....  | 36        |
| 3.4 ANÁLISE DOS DADOS.....   | 36        |
| <b>4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>5 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>6 REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>44</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos destinados à alimentação diária são produzidos, manipulados e consumidos em meio a um ambiente contaminado com uma grande variedade e quantidade de microrganismos e parasitos (RIEDEL, 1995). Há procedimentos que favorecem o risco de contaminação dos alimentos, os processos que permitem a sobrevivência de microrganismos e as práticas de armazenamento que possibilitam a multiplicação microbiana.

Durante o processo de produção, elaboração, transporte, armazenamento e distribuição, a contaminação microbiana dos alimentos é indesejável e, inclusive, nociva. Esse aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências higiênicas, que implicariam em contaminação do alimento, busca-se averiguar a presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos.

O queijo coalho é uma iguaria tipicamente nordestina, e é amplamente consumido pela população da região Norte e em especial na cidade de Manaus. É obtido por coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementados ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até dez dias de fabricação. É classificado como queijo de média (36,0 e 45,9%) a alta (46,0 e 54,9%) umidade, massa semicozida ou cozida, classificado como queijo gordo ou semigordo com teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0 e 60,0%. Ainda pelo Regulamento, deve ser embalado e estocado em temperatura média de 10-12 °C, normalmente até dez dias (BRASIL, 2001b).

O queijo é um dos meios de concentrar o leite. Em média são gastos até dez litros de leite para produzir um quilo de queijo. Sendo assim, ele é a maneira mais eficiente de se consumir as propriedades nutritivas do leite, sendo indicado em dietas alimentares devido a sua alta digestibilidade quando comparado a outros alimentos (NUNES, 2013). Com a finalidade de evitar contaminações, durante o processo de fabricação do queijo, deve-se atentar para a obtenção do leite de forma higiênica, a sua pasteurização, adoção de Boas Práticas de Fabricação e refrigeração adequada até o consumidor final.

A fabricação deste tipo de queijo em sua maioria ainda é de aspecto artesanal, não existindo rigor técnico do seu processo de elaboração, sendo comum o emprego de leite cru (CAVALCANTE *et al.*, 2007). Devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias, armazenamento e comercialização em temperaturas inadequadas, os queijos produzidos artesanalmente apresentam, em geral, grande quantidade de microrganismos responsáveis pela deterioração, a redução da vida útil do produto, indicadores de más condições higiênicas

sanitárias do processamento e patógenos. Aliado a isso, comumente chega aos pontos de vendas por produtores ou atravessadores sem inspeção e controle de qualidade prévia (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Deste modo, a magnitude dessa situação requer a intervenção direta de profissionais, tanto do setor produtivo, como da área de saúde, que podem minimizar o impacto negativo deste agravo nas áreas da saúde pública e econômica.

A presença de indicadores higiênicos ruins e microrganismos patogênicos é testada para verificar a contaminação dos alimentos (SALOTTI *et al.*, 2006). O queijo tem características nutricionais que o tornam um alimento muito importante para os seres humanos e também é uma ótima fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias mesofílicas aeróbicas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras. Estes, quando presentes nos alimentos, além de reduzir a qualidade do produto, podem causar danos à saúde do consumidor (SALVADOR *et al.*, 2001). É necessária uma análise microbiológica desse alimento, uma vez que a ingestão de queijos com condições inadequadas de consumo pode ter sérias consequências para a população, sendo um problema de saúde pública (OLIVEIRA *et al.*, 2010a). Também é necessário, durante todo o processo de produção, manter as propriedades físico-químicas do queijo, chegando ao consumidor com suas características nutricionais preservadas.

Neste contexto, considerando a grande importância socioeconômica do queijo coalho para a cidade de Manaus, das condições precárias nas quais são produzidos e comercializados, do risco à saúde do consumidor pela presença de patógenos e da indisponibilidade de informações sobre a qualidade do produto em questão na região, o objetivo desse trabalho foi determinar a qualidade microbiológica e físico-química do queijo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM a fim de produzir informações científicas que possam contribuir para os programas governamentais do município e afins.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO E MERCADO DE QUEIJO NO BRASIL

A origem do queijo ocorreu acidentalmente há mais de quatro mil anos, na Ásia, quando os povos nômades da África transportavam em suas viagens o leite das jumentas e camelas em bolsas feitas com couro do estômago dos animais, o que fazia com que o leite coagulasse. Essa massa foi provada e apreciada e também reconhecida como uma excelente forma de conservar o leite (CAMARGO, 1995).

Camargo (1995) observou que o queijo foi introduzido no Brasil em meados do século XIX, produzido inicialmente em escala doméstica e de forma bastante rudimentar. Cascudo (2004) descreveu que o consumo de queijo foi introduzido no Brasil com a chegada dos portugueses, que já o consumiam em grande escala, tendo uma variedade produzida com leite de cabra, que era muito apreciado por eles. Em São Paulo foi introduzido com o advento da cafeicultura, que atraiu milhares de imigrantes, trazendo com eles o hábito do consumo de queijos, nas suas mais diversas formas: como refeição, como acompanhamento e até condimento.

A produção de queijo é o principal destino do leite brasileiro, resultando em 1,15 milhão de toneladas produzidas de maneira formal. O queijo, para fins de estatística, é dividido em queijo *commodities* – muçarela, prato, minas e requeijão; *commodities* secundárias – minas padrão, coalho e parmesão; e especiais - gouda, gruyère, gorgonzola e brie. A maior parte do queijo produzido é o do tipo mais barato, que chega a 65% do total (MDIC, 2018).

O queijo coalho é um produto de fácil aceitação, seu comércio é bastante difundido, sendo encontrado nos mais diversos pontos de venda: porta a porta, feiras livres, lojas de produtos nordestinos, mercadinhos, supermercados, entre outros, sendo adquirido por várias faixas de renda e consumido em quantidade de formas variadas: cru, assado, frito, ou cozido (DANTAS, 2012).

A produção de queijo aumentou 14% entre 2013 e 2017. São produzidas cerca de 300 mil toneladas de queijo sem inspeção, dos quais 100 mil toneladas são consumidas nas propriedades e 200 mil toneladas são vendidas no mercado informal. Dessa forma, o consumo *per capita*, só de queijo inspecionado, nacional e importado, é de 5,6 Kg por ano. Se for considerado todo o queijo disponível no mercado brasileiro, o consumo sobe para 7,2 Kg por habitante por ano. A produção de queijo artesanal, uma especialidade em ascensão, é estimada

em 35 mil toneladas por ano, e está incluída, por hora, nos números do mercado informal, incluindo, portanto, o queijo coalho (MDIC, 2018).

## 2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO COALHO NO AMAZONAS

O queijo de coalho no Amazonas é produzido principalmente de forma artesanal, mantendo características tradicionais, culturais ou regionais, cuja produção segue de forma rudimentar e ficam à margem da legislação vigente, sem controle da qualidade. É comercializado, na maioria das vezes, de maneira informal, incluindo a maior parte dos produtores de queijos artesanais. A classificação dos queijos baseia-se em função das características decorrentes do tipo de leite utilizado, do tipo de coagulação utilizado no processo de produção, do teor de umidade mantido no produto, da consistência da pasta, do teor de gordura final, do tipo de casca, do tempo de cura, dentre outros (PERRY, 2004).

De acordo com dados da Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Amazonas (ADAF), ao final de 2017 haviam 10 estabelecimentos de laticínios e queijarias legalizados que produzem queijo coalho no Estado do Amazonas, possuindo, portanto, o Serviço de Inspeção Estadual (SIE). Em contrapartida, 164 estabelecimentos encontravam-se em processo de legalização. Para tanto, de um total de 174 estabelecimentos no Amazonas que produzem queijo coalho, apenas 5,75% fornecem produtos inspecionados (AMAZONAS, 2017).

A grande maioria dos municípios do estado do Amazonas, produtores de leite, fabrica o queijo coalho. Produzido nas fazendas em locais improvisados, logo, inadequados, da mesma forma que o são os utensílios e matérias-primas utilizadas no preparo dos queijos e transporte em temperatura ambiente, o que indica grande probabilidade de contaminação (RAMOS; COSTA, 2003). A falta de critérios de qualidade para a matéria-prima e para as técnicas de processamento permitem que produtos de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como em relação aos padrões do produto, atinjam o mercado, dificultando sua comercialização (NASSU *et al.*, 2006).

Autazes é o maior fornecedor de queijo coalho, participando com 59% da oferta desse produto, seguido do Careiro (3%), Novo Remanso e Presidente Figueiredo (2%). Manaus participa com 13%, mas não foi possível precisar onde os produtos são fabricados (SEBRAE, 2016). As características de produção e comercialização do queijo coalho na cidade de Manaus, Amazonas, indicam constante contaminação do produto causada por possível falha na aplicação de Boas Práticas de Fabricação, desde a obtenção do leite até o produto final (RUWER *et al.*, 2011). Isso reforça a necessidade de analisar a qualidade do queijo, de modo a sensibilizar e

monitorar criadores de gado leiteiro, manipuladores ou produtores, órgãos de fiscalização e de assistência técnica em suas devidas esferas, além de comerciantes e consumidores.

### 2.3 DEFINIÇÃO DE QUEIJO COALHO

O leite é a principal matéria prima para a fabricação de produtos lácteos e se constitui em um excelente substrato para o desenvolvimento de microrganismos, devido ao conteúdo de nutrientes e compostos minerais presentes no mesmo, sendo, portanto, de fundamental importância a determinação da microbiota e da qualidade higiênico-sanitária do leite e seus derivados (EUTHIER *et al.*, 1998).

O queijo é o resultado da concentração seletiva do leite. A água é eliminada em proporções determinadas, segundo a variedade que se deseja, arrastando com ela parte dos elementos solúveis e das proteínas não coaguladas que estão presentes no leite. A proteína responsável pela formação do coágulo é a caseína. A caseína coagulada constitui a base para a pasta queijeira e na sua degradação se originam diversos compostos aromáticos. Este fenômeno se produz pela desestabilização da solução coloidal de caseína que origina a aglomeração das micelas livres e a formação de um gel em que ficam presos o restante dos componentes do leite (ORDÓÑEZ, 2005).

O queijo é um alimento rico do ponto de vista nutricional como fonte de proteínas, aminoácidos essenciais, vitaminas, cálcio, zinco, potássio, ferro, fósforo, presença de ácido linoleico e de outros ácidos graxos, preparado a partir do processo de coagulação do leite e remoção parcial do soro após a ação de bactérias lácticas (*Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. E *Lactobacillus* spp.), cujas mudanças nas condições de elaboração são os fatores determinantes nos diferentes tipos existentes em todo o mundo (CÂMARA *et al.*, 2002; PERRY, 2004; OPAS, 2009).

É considerado como queijo de coalho a massa que se obtém pela coagulação do leite por meio do coalho ou outra enzima apropriada, complementada ou não pela ação de bactérias lácticas. Deve obedecer critérios microbiológicos estabelecidos para queijo de médio e alto teor de umidade no “Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos microbiológicos de Queijos” (BRASIL, 2001b).

O queijo de coalho é classificado em queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0 e 60,0%. Para ser comercializado com sua denominação de venda deve: ser adicionado de apenas um condimento, que deve estar citado na denominação do produto; quando for adicionado de

mais de um condimento, não haverá necessidade de menção de todos eles na denominação, podendo ser utilizada apenas a expressão: Condimentado após a denominação Queijo de Coalho. O leite integral ou padronizado a 3% (m/m) em seu conteúdo de matéria gorda e o coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas são os seus ingredientes obrigatórios. Como ingredientes opcionais têm-se o cloreto de cálcio, cultivo de bactérias lácteas selecionadas, sólidos de origem láctea, condimentos e especiarias e o cloreto de sódio (BRASIL, 2001b).

Ainda de acordo com o Regulamento Técnico, os requisitos para as características sensoriais como a consistência deve ser semidura, elástica. A textura deve ser compacta e macia. A cor, branco amarelado uniforme. O sabor: brando, ligeiramente ácido, podendo ser salgado. O odor: ligeiramente ácido, lembrando massa coagulada. A Crosta: fina, sem trinca, não sendo usual a formação de casca bem definida. Quanto às olhaduras, devem ser pequenas ou sem olhaduras. O formato e peso podem ser variáveis. Em relação aos requisitos físico-químicos obrigatórios, devem corresponder às características de composição e qualidade dos queijos de média a alta umidade, conforme estabelecido no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Portaria n° 146/96 – MA) e com teor de gordura nos sólidos totais (GST) entre 35 e 60% (BRASIL, 2001b).

As práticas de higiene para elaboração do queijo de coalho devem estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos (Portaria n° 368/97 – MA). O leite a ser utilizado deverá ser higienizado por meios mecânicos adequados e submetido à pasteurização ou tratamento térmico equivalente, para assegurar fosfatase alcalina residual negativa, nos termos da Portaria n° 146/96 - MA, de acordo com metodologia analítica oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, combinado ou não com outros processos físicos ou biológicos que garantam a inocuidade do produto. O produto não deverá conter impurezas ou substâncias estranhas de qualquer natureza e, também, não deverá apresentar substâncias microscópicas estranhas de qualquer natureza. O queijo de coalho deverá obedecer aos critérios estabelecidos para queijo de médio a alto teor de umidade no Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Requisitos Microbiológicos de Queijos - Portaria n° 146/96 – MA (BRASIL, 2001b).

#### 2.4 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE QUEIJO COALHO

De acordo com o RT, as suas características quanto ao processo de elaboração, distinguindo dos demais queijos, a coagulação deve ser em torno de 40 minutos, seguindo o

corte e mexedura da massa, remoção parcial do soro, aquecimento da massa com água quente ou vapor indireto até obtenção de massa semicozida (até 45 °C) ou cozida (entre 45 e 55 °C), adição de sal (cloreto de sódio) à massa, se for o caso, prensagem, secagem, embalagem e estocagem em temperatura média de 10 a 12 °C até dez dias. Esse queijo poderá ser também elaborado a partir de massa crua (sem aquecimento). Deve ser acondicionado em embalagem bromatologicamente apta, com ou sem vácuo. A sua conservação e comercialização deverá manter-se a uma temperatura não superior a 12 °C. São autorizados os aditivos previstos no item 5 do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (Portaria nº 146/96 – MA), para queijos de média ou alta umidade. Os contaminantes orgânicos e inorgânicos não devem estar presentes em quantidades superiores aos limites estabelecidos pelo regulamento específico (BRASIL, 2001b).

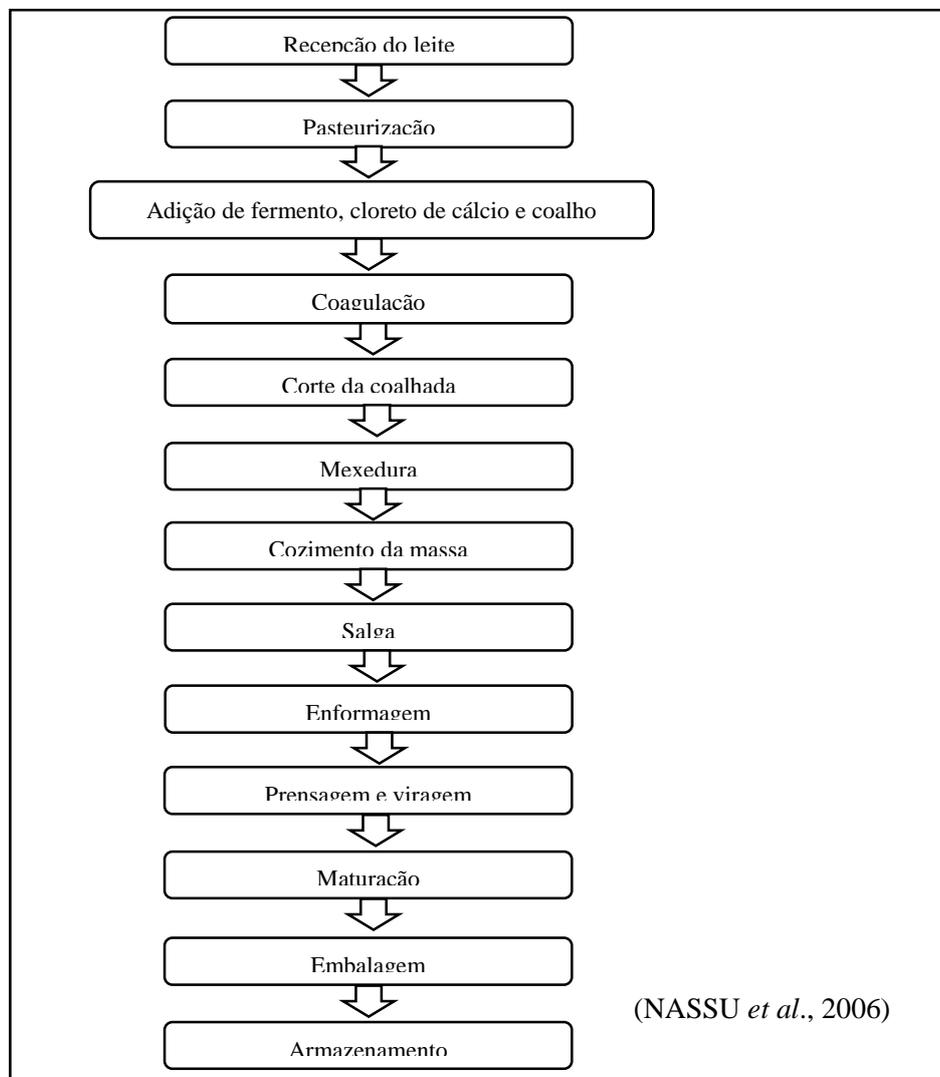


Figura 1.

A tecnologia para a obtenção do queijo é relativamente simples e a sua fabricação não exige equipamentos sofisticados. No entanto, há uma diversificação da metodologia para a

elaboração, variando de acordo com os fabricantes (NASSU *et al.*, 2006). De maneira geral as etapas para o processo de produção são de acordo com o fluxograma (Figura 1).

## 2.5 NORMATIVAS PARA O CONSUMO DE QUEIJO COALHO

A qualidade do queijo coalho está diretamente relacionada à qualidade de sua matéria prima, processamento e comercialização. Por isso, critérios de qualidade são estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para etapas desde a produção do leite até a expedição do queijo para o comércio. No varejo, a qualidade do produto, especificamente quanto a segurança do alimento, o Ministério da Saúde promove a fiscalização por meio dos serviços de vigilância sanitária municipais. Portanto, os parâmetros através do Regulamento da Diretoria Colegiada (RDC nº 12 de 02/01/2001) da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para alimentos bem como adota metodologia analítica editada pela *Association of Official Analytical Chemists* (FDA/AOAC). Considera ainda, para o queijo coalho através do Número Mais Provável por grama (NMP/g) uma tolerância de  $5 \times 10^3$  da amostra para coliformes a 45 °C e  $1 \times 10^3$  estafilococos coagulase positiva e ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* (BRASIL, 2001a).

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO

Devido à natureza do produto, a microbiologia do queijo coalho pode ser complexa. É produzido a partir do leite, matéria-prima naturalmente contaminada por microrganismos presentes no animal e durante o processo de ordenha, trazendo características muito particulares que dependem de diversos fatores como: condições sanitárias do rebanho, procedimentos higiênico-sanitários na ordenha, potabilidade e dureza da água empregada e do processo de higienização das ordenhadeiras e instalações, sazonalidade (REIS *et al.*, 2013).

Além da influência da matéria-prima, a maneira como esta é processada é fundamental para a obtenção de um produto de final com qualidade adequada. Considerando que no processo de fabricação do queijo há a etapa de coagulação, auxiliada pela fermentação microbiana do leite para gerar acidificação, a microbiota pré-existente do leite é fundamental para determinar a qualidade do queijo, especialmente quando se trata de queijos feitos a partir do leite cru.

Desta forma, diferentes microrganismos e grupos de microrganismos são estudados com objetivo de melhor caracterizar a qualidade microbiológica destes produtos, sendo utilizados como indicadores higiênicos, sanitários ou tecnológicos.

### 2.6.1 Microrganismos mesófilos aeróbios

São microrganismos que possuem temperatura ótima de crescimento de 25 a 40 °C. Dentre os mesófilos, os microrganismos patogênicos apresentam temperatura ótima de cerca de 37 °C. Os mesófilos incluem a maioria dos organismos deteriorantes e patogênicos (TORTORA *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos numa análise de contagem de mesófilos e psicrotróficos são úteis para avaliar as condições de processamento do alimento. Contagens elevadas possibilitam a obtenção de informações gerais sobre a qualidade dos produtos, práticas de manufatura, matérias primas, condições de processamento e manipulação (SILVA *et al.*, 2017), bem como influenciarão na diminuição do período de vida útil desses produtos, resultando na sua deterioração (HAJDENWURCEL, 1998).

### 2.6.2 Microrganismos psicrotróficos aeróbios

São microrganismos que tem capacidade de crescer a 7 °C ou menos sem considerar sua ótima temperatura de crescimento. Alguns psicrotróficos crescem a temperaturas abaixo de 0 °C e outros podem crescer também a temperaturas altas entre 37 a 45 °C (HAJDENWURCEL, 1998). Alguns fungos também são psicrotróficos, possuindo capacidade de crescimento à temperaturas de refrigeração (HAJDENWURCEL, 1998).

Esses microrganismos se multiplicam em alimentos refrigerados, mas crescem melhor nas temperaturas da faixa mesófila (SILVA *et al.*, 2017). Tortora *et al.* (2012) afirmaram que psicrotróficos na realidade não crescem bem em temperaturas baixas, exceto quando comparados com outros microrganismos; contudo, em um determinado período, eles são capazes de deteriorar lentamente o alimento podendo se desenvolver na forma de micélio fúngico, limo na superfície do alimento ou alterações de sabor ou cor nos alimentos.

As principais bactérias psicrotróficas estão distribuídas em vários gêneros, incluindo cocos e bastonetes, esporogênicos e não esporogênicos, aeróbios e anaeróbios. As mais comuns em alimentos, a exemplo dos produtos lácteos, são espécies dos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Serratia*, *Shewanella*, *Streptococcus* e *Weissella*, sendo *Pseudomonas* e *Acinetobacter* os psicrotróficos deteriorantes mais frequentes em produtos lácteos refrigerados (SILVA *et al.*, 2017).

### 2.6.3 Bolores e leveduras

As leveduras, são agentes potenciais de deterioração, sendo uma das consequências do seu desenvolvimento no produto a elevação do pH, criando condições para o crescimento de outros microrganismos, inclusive patogênicos, desde que atinja valores superiores a 4,5. As mesmas desenvolvem turbidez, floculação, película e depósito. Elas podem ainda degradar ácidos orgânicos, promovendo o aumento de pH e formar o acetaldeído contribuindo também na fermentação de açúcar (SILVA, 2003).

A presença de bolores e leveduras em queijos é, na maioria dos casos, indesejável. Quanto maiores as contagens desta classe de deteriorantes, maiores são as deficiências de higiene na planta de processamento. A presença de bolores e leveduras viáveis em um índice muito elevado nos alimentos pode indicar condições higiênico-sanitárias insatisfatórias de equipamentos, multiplicação no produto em decorrência de falhas no processamento ou estocagem e matéria-prima com contaminação excessiva (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Para controle de bolores e leveduras é necessário excelente higiene da planta de processamento, pois estes deteriorantes são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente (ZACARCHENCO, 2011).

### 2.6.4 Coliformes termotolerantes

Os coliformes totais compreendem as bactérias entéricas (que vivem no intestino) e ambientais, sendo por isso designadas de coliformes totais. Os gêneros que pertencem a este grupo são: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. São bacilos Gram-negativo, não formadores de esporos e inclui cerca de 20 espécies, são capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a 35-37 °C, por 48 horas (LEITE; FRANCO, 2006).

Os coliformes termotolerantes são um subgrupo que fornece informações concretas sobre a contaminação e condições higiênicas do produto e melhor indicação da eventual presença de enterobactérias originárias do trato intestinal (*E. coli*) (SILVA, 2007).

*Escherichia coli* é membro da família Enterobacteriaceae, gênero bacteriano com apenas uma única espécie e, aproximadamente, 1.000 tipos antigênicos. Os sorotipos desta bactéria são definidos com base nos antígenos: somáticos O; flagelares H; e, capsulares K. Apesar de elevadíssimo número de antigênicos, apenas uma minoria de cepas é capaz de provocar doença no homem, como a: *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) que acomete recém-nascidos e lactantes; a Enterotoxigênica (ETEC) que provoca a diarreia infantil e a diarreia dos

viajantes; a Enteroinvasiva (EIEC) que acomete jovens e adultos; e a Enterohemorrágica (ECHEH) ou (EHEC) que acomete com bastante gravidade, preferencialmente, crianças e idosos (GERMANO; GERMANO, 2001).

Dentre as inúmeras cepas enterovirulentas do microrganismo, a que constitui maior preocupação para as autoridades de saúde, é a *E. coli* O157:H7, responsável pela forma enterohemorrágica da infecção. A *E. coli* é encontrada normalmente nos intestinos dos animais de sangue quente e do homem, é Gram-negativa, catalase-positiva e oxidase-negativa, não esporogênica. É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7 e 46 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima, embora existam cepas que possam se multiplicar a 4 °C (GERMANO; GERMANO, 2001).

Contagens elevadas de microrganismos do grupo coliformes são frequentemente observadas no queijo coalho, sugerindo que foram produzidos em condições de higiene insatisfatória. A presença de coliformes fecais ou termotolerantes em alimento é indicativa de que houve contato direto com material fecal (DUARTE *et al.*, 2005).

Contudo, de acordo com Silva *et al.* (2006), a presença de coliformes a 45 °C não prova necessariamente contaminação de origem fecal, esse padrão precisa ser reavaliado. Concordando com estudos de Silva Junior (1995), a fonte de contaminação por *E. coli* pode ser as fezes do homem e animais de sangue quente, água de rios, lagos, nascentes e poços, podendo também estar presente em hortaliças regadas com água contaminada, carnes, aves, pescado, verduras e legumes crus ou mal cozidos, dentre outros. O que é contestado por Germano e Germano (2012) e Gava *et al.* (2008) que afirmam que a presença de coliformes a 45 °C é indicador de contaminação fecal por se tratar de microrganismo com habitat exclusivo do trato intestinal do homem e de animais.

### **2.6.5 *Staphylococcus coagulase positiva***

Conforme Franco e Landgraf (2008), *Staphylococcus coagulase positiva* é um indicador de falha de higiene durante manipulação, sendo encontrado em seres humanos e animais de sangue quente. Está presente principalmente nas vias nasais, garganta, pele e cabelos, além do úbere de vacas contaminadas, podendo ocorrer contaminação do leite. Almeida Filho e Nader Filho (2000) ressaltaram que o leite destinado à fabricação de queijos muitas vezes se contamina já no interior do úbero, especialmente nos casos de mastite. *Staphylococcus aureus* é o principal agente etiológico desta enfermidade e, uma vez instalado na glândula mamária poderá chegar ao leite e conseqüentemente ao queijo.

Esses microrganismos apresentam resistência a variadas condições ambientais, tais como ambientes secos, com pH mínimo de 4,2, máximo de 9,3, com ótimo de 7,0-7,5 e, a temperatura mínima de 6 e máxima de 48 °C, com ótimo de 37 °C. Toleram ainda altas concentrações de cloreto de sódio de até 25%, com ótimo de 7 a 10% (TRABULSI; ALTHERTHUM, 2015).

*Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar pela enterotoxina estafilocócica (CUNHA NETO *et al.*, 2002). Essa intoxicação alimentar é decorrente da ingestão de alimentos contendo toxinas microbianas pré-formadas, produzidas durante a intensa proliferação dos microrganismos patogênicos no alimento (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Um estudo realizado por Silva *et al.* (2015) visando o levantamento da incidência e ocorrência de surtos por tipo de alimento e espécie de microrganismo envolvido, e por região do Brasil, descreveu que alimentos como o leite, queijos, embutidos crus curados, carnes de aves, de suínos, vermelhas, pescados e refeições prontas, são os alimentos com maior incidência de *Staphylococcus* spp. no Brasil. Dentre esses, com destaque para o queijo, que independentemente do tipo, apresentou-se como um dos alimentos com maior incidência de *S. aureus* em quase todas as regiões do Brasil.

#### **2.6.6 *Salmonella* spp.**

São bastonetes, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, pertencentes a família Enterobacteriaceae. São móveis devido a presença de flagelos peritríquios ou imóveis, não formam esporos, quimiorganotróficas, possuindo metabolismo oxidativo e fermentativo. Produzem ácido e gás a partir da glicose e de outros carboidratos. São catalase positivas e oxidase negativas (HAJDENWURCEL, 1998). A temperatura ideal para multiplicação é 35-37 °C, sendo a mínima de 5 e a máxima 47 °C. Vários estudos indicam, que valores máximos e mínimo dependem do sorotipo (FRANCO; LANDGRAF, 2008). Normalmente encontrada no trato intestinal de animais domésticos e silvestres, especialmente aves e répteis e tem como principal veículo de disseminação os alimentos e a água, sendo comumente observada em queijo coalho (ÁVILA; GALLO, 1996; FEITOSA *et al.*, 2003).

Os principais veículos de transmissão são alimentos de origem animal, principalmente aves e ovos, mas também incluem-se neste item a carne de vaca, peixes, frutos do mar, laticínios como leite e queijos oriundos de leite não pasteurizados e sorvetes (SHINOHARA *et al.*, 2008).

A maioria das salmonelas é considerada patogênica para o homem, e diferem quanto às características da amostra e gravidade da enfermidade que causam, além da susceptibilidade e do *status* de saúde de cada indivíduo (CLIVER, 1990). As salmonelas são responsáveis por várias síndromes clínicas diferentes, que podem ser agrupadas em enterites e enfermidades sistêmicas. O primeiro grupo está relacionado às infecções gastrointestinais causadas principalmente pelos sorotipos que existem em abundância nos animais e nas pessoas, sobretudo *S. enteritidis*, *S. typhimurium* e *S. virchow*. Os sorotipos adaptados ao hospedeiro são mais invasivos e tendem a causar uma enfermidade sistêmica em seus hospedeiros, característica que está relacionada com sua resistência à destruição fagocítica. Em humanos, esta característica se aplica a *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B e C, sendo que esta última causa a enfermidade conhecida como febre entérica (ADAM; MOSS, 1997).

A *S. typhi* por sua vez causa a febre tifoide, tem um período de incubação com duração de 3 a 56 dias, habitualmente compreendida entre 10 e 20 dias. Na primeira fase da enfermidade há a aparição lenta de sintomas que incluem febre, dor de cabeça, sensibilidade abdominal e constipação, e a aparição de manchas de cor vermelha na superfície do corpo. Na segunda fase, o microrganismo coloniza a vesícula biliar, cujo conteúdo infecta o intestino delgado causando sua inflamação e ulceração e febre persistente. Nos casos mais graves, pode haver hemorragia das úlceras e perfuração do intestino (ADAM; MOSS, 1997). Já a febre entérica ou paratifóide, embora ocasione sintomas mais brandos, pode causar septicemia, febre, dor de cabeça e dor abdominal (D'AOUST, 1989).

São inúmeros os registros existentes sobre problemas de doenças por infecção alimentar causados por *Salmonella* spp., por exemplo, de acordo com Costalunga e Tondo (2002) a Divisão de Vigilância Sanitária do Rio Grande do Sul, registrou 323 surtos de origem alimentar no Estado no período compreendido entre 1997 e 1999. *Salmonella* spp. foram as principais causas de doenças transmitidas por alimentos, envolvendo 8.217 pessoas em 116 surtos, das quais 2.846 ficaram doentes e 1.557 foram hospitalizadas. A utilização de matéria-prima sem inspeção foi a principal causa das salmoneloses, em 22,92% dos casos; e o leite e seus derivados foram incriminados em 2,88% dos casos.

## 2.7 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJO COALHO

A produção de queijos foi evoluindo conforme o desenvolvimento tecnológico, surgindo assim em nível nacional muitas variedades, algumas carregando suas particularidades conforme a expressão regional respectiva (BORGES, 2003). O processo básico de fabricação é comum a

quase todos os queijos, porém há variações na origem do leite, no processamento tecnológico e no tempo de maturação que criam a imensa variedade conhecida (ANDRADE, 2006).

Conforme Venturoso *et al.* (2007), controlar a qualidade dos produtos lácteos através das determinações físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais é essencial para garantir as propriedades nutricionais, bem como a saúde e satisfação do consumidor. De acordo com as características físico-químicas, o queijo coalho é um concentrado lácteo constituído de proteínas, lipídios, sais minerais principalmente cálcio, fósforo e vitaminas, entre elas A e Complexo B, que formam um aparato nutricional importantíssimo (PERRY, 2004).

O controle de qualidade físico-químico do queijo coalho é garantido através da determinação de macroconstituintes (gorduras e proteínas) e também, temperatura, pH e acidez titulável utilizando metodologias padrão, reconhecidas pela Instrução Normativa nº 68/2006 (BRASIL, 2006).

O queijo coalho é produzido há mais de um século, porém ainda necessita padronização das técnicas de sua fabricação, resultando na diversidade de suas características físico-químicas, que podem ser respaldadas devido aos parâmetros físico-químicos estabelecidos pela legislação vigente através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do queijo coalho, que o classifica por exemplo, como de médio (36,0-45,9%) a alto teor de umidade (46,0-54,9%), de massa semi-cozida ou cozida, semi-gordo (25,0-44,9%) ou gordo (45,0-59,9%) com teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35,0 e 60,0% (CARVALHO, 2007; BRASIL, 2001b).

O pH e a acidez titulável são parâmetros importantes para estabelecer a degradação microbiana no alimento, no entanto, a legislação brasileira não preconiza valores de referência para estas análises, fazendo-se apenas comparativos através de dados encontrados na literatura (RAHMAN *et al.*, 2004; SOUZA *et al.*, 2014).

A falta de uniformidade na produção do queijo coalho é evidenciada por vários autores através das análises das características físico-químicas, esses problemas estão relacionados com falhas na padronização do leite utilizado na produção (SENA, 2000).

## 2.8 IMPORTÂNCIA DO QUEIJO COALHO NA SAÚDE PÚBLICA

Como é uma prática comum este queijo ser consumido cru, e na maioria das vezes o mesmo ser produzido com leite também cru, o consumidor acaba expondo-se a risco sanitário, e desta forma, Peixoto *et al.* (2007) afirmaram que a contaminação microbiana desse produto assume destacada relevância tanto para a indústria, pelas perdas econômicas, como para a saúde pública, pelo risco de causar doenças transmitidas por alimentos (DTA). Segundo Dantas

(2012), se o leite não for obtido com condições adequadas de higiene, pode ser, além de matéria prima, veículo de microrganismos patogênicos. As condições higiênico-sanitárias inadequadas da matéria prima, falhas no processamento, armazenamento, transporte e exposição do produto a contaminação durante a comercialização, trazem como consequência, queijos de baixa qualidade expondo o consumidor ao risco de DTA.

A identificação de casos suspeitos de DTA que possam caracterizar um surto obriga o profissional que os atende, mesmo em serviços de emergência, a acionar de imediato o sistema de vigilância epidemiológica para que se possam adotar as medidas de controle precocemente, evitando danos maiores à comunidade (BRASIL, 2010). Segundo Ruwer *et al.*, (2011), na cidade de Manaus, no ano de 2007, o risco relativo de ocorrer um surto de DTA originado pelo consumo de queijo coalho foi de 4,83 vezes maior do que pelo consumo de outros alimentos.

O ar, o ambiente, as embalagens primárias, as mãos dos funcionários, bem como os equipamentos e os utensílios, constituem pontos importantes que devem ser ajustados às boas práticas de fabricação (BPF) de forma a não representarem risco de contaminação para o produto (PEIXOTO *et al.*, 2007), e desta forma evitar os surtos decorrentes de alimentos contaminados.

De acordo com o perfil epidemiológico das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) entre os anos de 2000 a 2017 no Brasil obteve-se o maior percentual de agentes etiológicos dos surtos notificados foram bactérias (92,2%), seguido por vírus (6,0%), agentes químicos/outros (1,2%) e protozoários e helmintos (0,6%) (BRASIL, 2019a).

O leite e seus derivados são frequentemente implicados em surtos de toxinfecções alimentares. Vários fatores podem contribuir para a presença de alguns tipos de microrganismos patogênicos nessas espécies de alimentos: sua origem, a maneira como foram processados, manipulação, transporte e armazenamento que, de maneira isolada ou em conjunto, favorecem o desenvolvimento de microrganismos causadores de doenças (RAMOS; COSTA, 2003). Dados do Ministério da Saúde descrevem que nos últimos dez anos o leite e derivados foram o quarto principal grupo de alimentos identificados isoladamente relacionados às DTAs, sendo responsáveis por 7,8% dos casos (BRASIL, 2019b).

Em algumas localidades, o leite ainda é obtido sob condições higiênico-sanitárias deficientes e, em consequência, apresenta elevado número de microrganismos, o que constitui um risco à saúde da população, principalmente quando consumido sem tratamento térmico. Dessa forma, para o leite e seus derivados, cuidados higiênicos desde a ordenha até a obtenção do produto final devem ser empregados (CATAO; CEBALLOS, 2001).

A contaminação microbiana em queijos assume destacada relevância para saúde pública ao se considerar que bactérias enterotoxigênicas e patogênicas como *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. são comumente encontradas em derivados (SENA *et al.*, 1999).

O queijo coalho, por ser elaborado em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, que não adotam as boas práticas de fabricação, não apresenta segurança microbiológica e padronização de qualidade, o que aliado à elaboração a partir de leite cru, sem os devidos cuidados de higiene assume destacada relevância para a saúde pública, pelo potencial risco de causar doenças transmitidas pelo alimento (BORGES *et al.*, 2003; FEITOSA *et al.*, 2003).

Esta fabricação se dá, na maioria dos casos, por pequenos produtores que o fazem de maneira informal e que não se encontram regulamentados por nenhum órgão de fiscalização, ficando por sem receber nenhuma inspeção sanitária. Estes produtores nem sempre tomam as devidas precauções para evitar a contaminação do produto, onde a falta de critérios na obtenção da matéria-prima e das técnicas de processamento, fazem com que acabem levando ao mercado um produto de baixa qualidade, tanto do ponto de vista higiênico-sanitário como da padronização do produto, colocando em risco a saúde do consumidor (DANTAS, 2012).

Dantas (2012) ressaltou que manter a qualidade desta matéria prima é o requisito principal que o produtor de queijo deve ter, para evitar prejuízos econômicos, para ele e para quem vende, e a saúde pública para quem consome. Para isso deve adotar cuidados que deve ir da ordenha do leite a fabricação do queijo, com a inclusão da higienização adequada dos materiais (utensílios, tanques, entre outros) e dos funcionários envolvidos no processo (lavagem correta das mãos, higiene de uniformes e botas). Não devendo esquecer que isso inclui também a sanidade do rebanho.

Alimentos obtidos por processos artesanais têm grande possibilidade de se apresentarem contaminados, devido ao uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias e armazenamento e comercialização em temperaturas inadequadas, fatores que contribuem para aumentar o risco de causarem enfermidades (OLIVEIRA *et al.*, 2010a).

Para a verificação da contaminação do alimento, busca-se averiguar a presença de microrganismos indicadores de má qualidade higiênica e de microrganismos patogênicos (SALOTTI *et al.*, 2006). Como o queijo apresenta características nutritivas que o tornam alimento muito importante para os humanos, também é ótima fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos, destacando-se bactérias mesófilas aeróbicas, como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras. Estes, quando presentes nos

alimentos, além de reduzirem a qualidade do produto, podem causar danos à saúde do consumidor (SALVADOR *et al.*, 2001).

Uma análise microbiológica deste alimento se faz necessária, pois a ingestão de queijos com condições inadequadas para consumo pode trazer graves consequências para a população, sendo, portanto, um problema de Saúde Pública (OLIVEIRA *et al.*, 2010a). É necessário também, durante todo o processo de produção, manter as propriedades físico-químicas do queijo, chegando até o consumidor com suas características nutritivas preservadas, uma vez que não há um padrão definido que seja seguido por todos os produtores.

Segundo a Resolução nº 12 de 2001 da ANVISA, que aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, queijos de alta umidade, incluindo o queijo coalho, deve ter um número máximo de  $5 \times 10^3$  coliformes termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva por grama de amostra, além de ausência de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em 25 gramas de amostra (BRASIL, 2001a).

Trabalhos sobre qualidade do queijo coalho já foram realizados em outras regiões. Salotti *et al.* (2006), analisando a qualidade microbiológica de queijo minas frescal, detectou que 83,3% dos queijos fabricados sem passar por processo de inspeção, encontravam-se fora dos padrões, quanto à contaminação por coliformes fecais, demonstrando o contato do produto com fezes humanas ou de outros animais. Estudos realizados por Borges *et al.* (2003) constataram que queijos coalho produzidos no Estado do Ceará, apresentavam altos níveis de contaminação por bactérias patogênicas, como *S. aureus*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. Assim como Santana *et al.* (2008), pesquisando qualidade microbiológica de queijo coalho comercializado em Aracaju, SE, detectaram 16 amostras (26,7%) positivas para *Salmonella* spp. e 28 (46,7%) positivas para estafilococos coagulase positiva. Quanto à contaminação por coliformes totais, 56 (93,3%) das amostras apresentaram valores entre  $8,0 \times 10^2$  e  $1,23 \times 10^4$  NMP/g, e de  $2,72 \times 10^2$  a  $1,12 \times 10^3$  NMP/g para coliformes termotolerantes. Para Silva *et al.* (2010), ficou evidente a má qualidade higiênico-sanitária das amostras de queijo coalho produzidas no sertão de Alagoas. Todas apresentaram elevadas contagens de coliformes a 35 °C, coliformes termotolerantes, bolores e leveduras, *E. coli* e *S. aureus*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas no Laboratório de Ciências da Saúde do Campus Manaus Zona Leste do Instituto Federal do Amazonas (IFAM) e a composição centesimal das amostras foi analisada no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

#### 3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Nesta pesquisa descritiva, foram analisadas 40 amostras de queijo coalho, adquiridas em feiras e supermercados da cidade de Manaus, Amazonas, de julho de 2018 a março de 2019. Foram realizadas 10 coletas de maneira uniforme nas quatro regiões (Norte, Sul, Leste e Oeste) da cidade de Manaus, Amazonas, Brasil, e os queijos foram produzidos em Manaus ou cidades vizinhas. A amostragem foi dividida em dois grupos: 20 amostras adquiridas em feiras, queijos coalho que não foram inspecionados por órgãos governamentais e 20 amostras de supermercados, que comercializavam queijos inspecionados pelas autoridades competentes.

Cada amostra consistiu em duas unidades analíticas. Uma unidade teve a temperatura medida com termômetro tipo espeto no momento da compra e o restante do queijo foi reservado para análise físico-química, armazenado com a segunda amostra em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável em temperatura não superior a 8 °C. Foram transportadas na embalagem comercial originária do próprio local de venda até o laboratório para análise. No laboratório, alíquotas da segunda amostra foram coletadas assepticamente para realizar diluições em série e pré-enriquecimento para isolamento de *Salmonella* spp.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO

A metodologia empregada para as análises microbiológicas foi de acordo com o que versa a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do MAPA que Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água (BRASIL, 2003). A contagem de microrganismos psicotróficos foi realizada de acordo com a ISO 17410:2001.

### 3.2.1 Preparo das amostras

Para as análises microbiológicas, inicialmente foram pesadas assepticamente 30 g de cada amostra e colocadas em saco plástico estéril, contendo 270 mL de solução salina peptonada a 1% tamponada, homogeneizada por dois minutos, considerando esta a diluição  $10^{-1}$ . A partir da primeira diluição, foram realizadas diluições seriadas até  $10^{-9}$ , em água peptonada 0,1%.

### 3.2.2 Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis e de microrganismos psicotróficos aeróbios estritos e facultativos

Foi inoculado 1 mL das diluições selecionadas ( $10^{-3}$  a  $10^{-8}$ ) em placas de Petri estéreis. Em seguida, foi adicionado às placas inoculadas, de 18 mL do meio “Plate Count Agar” (PCA), previamente fundido e resfriado entre 44 e 46 °C. As placas sofreram homogeneização com movimentos suaves na forma de oito. Após a completa solidificação do ágar, as placas foram invertidas e incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas para mesófilos e a  $7 \pm 1$  °C por dez dias para psicotróficos. Foram consideradas para contagem, somente as placas que apresentaram de 25 a 250 colônias, multiplicada pelo respectivo fator de diluição e expressado o resultado em Unidades Formadoras de Colônias/g de amostra (UFC/g) (BRASIL, 2003).

### 3.2.3 Contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva

Foi inoculado 0,1 mL, por espalhamento, das diluições selecionadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em placas contendo meio Ágar Baird-Parker (BPA), suplementado com emulsão de gema de ovo 5% e telurito de potássio 0,01%, e espalhado sob a superfície do meio com auxílio de alça de Drigalski. Após completa absorção, as placas foram incubadas a  $36 \pm 1$  °C por 48 horas e as placas que continham entre 20 e 200 colônias foram selecionadas para contagem, verificando a presença de colônias típicas e colônias atípicas. Foram selecionadas de três a cinco colônias, confirmadas pela técnica de Gram como cocos Gram-positivos, semeadas em tubos contendo Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) para a multiplicação das bactérias com incubação de 36 °C por 24 horas. A prova de catalase foi realizada com a utilização de uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% como prova confirmativa. Para verificar a produção de coagulase, foi adicionado 0,3 mL da cultura em tubos estéreis com 0,3 mL de plasma de coelho e incubado a 35 ou 37 °C por 4 a 6 horas e, caso negativo, deixados em incubação até 24 horas. Os tubos foram inclinados, sendo

considerados os testes em que o coágulo ocupa mais da metade do volume original (BRASIL, 2003).

### 3.2.4 Determinação do número mais provável de coliformes termotolerantes

A partir da amostra da homogeneização e das diluições, foi realizada a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes (CTT). Para a análise das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$  foi pipetado 1 mL para uma série de três tubos para cada amostra contendo 9 mL do Caldo Lauril Sulfato Triptose, sendo homogeneizados e incubados a  $36 \pm 1$  °C até 48 horas. Transcorrido este tempo foi observada presença de efervescência e/ou gás nos tubos de Durham nos tubos positivos. Dos tubos positivos, foi inoculada uma alíquota com a ajuda de uma alça de platina estéril em tubos contendo Caldo EC, incubando os tubos em banho-maria a  $45 \pm 0,2$  °C por 48 horas. Foram considerados como positivos para a presença de coliformes termotolerantes todos os tubos que apresentaram presença de efervescência e/ou gás nos tubos de Durham. A partir do número de tubos positivos, foi determinada o NMP com base em tabela específica, considerando as diluições utilizadas. Os valores obtidos foram expressos em NMP/g (BRASIL, 2003).

### 3.2.5 Pesquisa de *Salmonella* spp.

Após a retirada das alíquotas para as demais análises microbiológicas, o restante foi utilizado para a etapa de pré-enriquecimento da amostra. O pré-enriquecimento foi feito com incubação das amostras preparadas a  $36 \pm 1$  °C por 16 a 20 horas. Após o procedimento de pré-enriquecimento, foram inoculados os caldos seletivos Rappaport Vassiliadis (RV), 0,1 mL em tubos contendo 10 mL, e Selenito-cistina (SC), 1 mL em 10 mL de caldo, ambos incubados a  $41 \pm 0,5$  °C em banho-maria por 24 a 30 horas. A partir dos caldos de enriquecimento seletivo, a superfície de placas contendo Ágar Verde Brilhante (VB) e Ágar Xilose, Lisina, Desoxicolato (XLD) foram inoculadas estriando de forma a se obter colônias isoladas. Foram selecionadas de três a cinco colônias suspeitas de *Salmonella* spp., repicadas em ágar não seletivo e incubadas a 36 °C por 18 a 24 horas a fim de verificar a sua pureza. A partir do crescimento foram realizadas as provas bioquímicas nos ágares “Triple Sugar Iron Agar” (TSI), “Lisine Iron Agar” (LIA) e Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) (BRASIL, 2003).

### 3.2.6 Contagem de bolores e leveduras

Foi inoculado 0,1 mL, das diluições selecionadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-5}$ ) em placas contendo meio Ágar Batata dextrose (BDA) acidificado em pH  $3,5 \pm 0,2$  pela adição de 1,5 mL de solução de ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio. A alíquota foi espalhada com auxílio de alça de Drigalski, até sua completa absorção e as placas foram incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por período de 5 a 7 dias. Foram consideradas para contagem, somente as placas que apresentaram entre 15 e 150 colônias. As contagens foram registradas, multiplicando a sua média aritmética pelo respectivo fator de diluição e expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônia/1,0 g de amostra (UFC/g) (BRASIL, 2003b).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DE QUEIJO COALHO

Para as análises físico-químicas e composição centesimal as amostras foram separadas em quantidades suficientes conforme a necessidade de cada análise. A metodologia utilizada foi preconizada conforme a Instrução Normativa do MAPA n. 68 de 2006 e os métodos descritos por Zenébon *et al.* (2008). A determinação de lipídeos seguiu a metodologia descrita por Bligh-Dyer (1959). A composição centesimal das amostras foi analisada no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Amazonas.

#### 3.3.1 Temperatura de exposição do produto

No momento da aquisição das amostras, foi realizada a medição da temperatura do queijo com auxílio de um termômetro digital tipo espeto.

#### 3.3.2 Preparo das amostras

Foram retiradas alíquotas para as análises de acidez, determinação do pH e 10,0 g para determinação de umidade, sendo o restante secado em estufa a 105 °C durante 24 horas para as análises de proteína, lipídeos e cinza. Após secagem, as amostras foram trituradas em multiprocessador e acondicionadas em recipiente hermeticamente fechado, devidamente identificado com o número da amostra correspondente.

### 3.3.3 Acidez

Foi transferido 10 g da amostra para um béquer de 150 mL, acrescentado cerca de 50 mL de água morna isenta de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) (40 °C) e agitado com bastão de vidro até dissolução possível. Foi transferido quantitativamente para balão volumétrico de 100 mL, esfriado em água corrente e completado o volume. Foi recolhido uma alíquota de 50 mL e transferido para um béquer de 150 mL, acrescentando 10 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 1% e foi titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N até leve coloração rósea persistente por aproximadamente 30 segundos. Logo após foi realizado o cálculo (BRASIL, 2006).

### 3.3.4 Determinação de pH

O pHmetro foi calibrado com as soluções tampões pH 4 e 7. Adicionado cerca de 20 mL de água em um béquer de 50 mL e acrescentado quantidade suficiente de amostra previamente preparada, misturando com bastão de vidro de modo a obter uma pasta homogênea e posteriormente o pH foi medido (BRASIL, 2006).

### 3.3.5 Umidade

Foram aquecidas cápsulas de alumínio por uma hora em estufa à 105 °C e em seguida colocadas num dessecador durante dez minutos para esfriar. Cada cápsula vazia foi pesada numa balança analítica e colocado 3 g da amostra e repetido o procedimento com as demais cápsulas para se obter a triplicata. Posteriormente, cada cápsula foi colocado na estufa a 105 °C até obter peso constante e levado ao dessecador pra esfriar completamente e novamente pesadas (ZENÉBON *et al.*, 2008).

Cálculo

$$(100 \times N) / P = \text{umidade por cento}$$

N= perda de peso em grama

P= n.º de gramas da amostra

### 3.3.6 Cinzas

Em balança analítica foi pesada cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550 °C e resfriada em dessecador até a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos. Posteriormente foi pesado 2 g de amostra seca em balança analítica e colocada a cápsula em mufla pré-aquecida a 550 °C até que o resíduo se apresentasse branco ou cinza claro. A cápsula foi transferida para um dessecador, deixado esfriar por cerca de 30 minutos e pesado o material frio na balança analítica (ZENÉBON *et al.*, 2008).

Cálculo

$(100 \times N) / P =$  cinzas por cento

N= nº de gramas de cinzas

P= nº de gramas da amostra

### 3.3.7 Determinação de lipídeos (método de Bligh-Dyer)

Em balança analítica, foi pesado 3 g da amostra seca e em seguida transferida para os tubos de ensaio de 70 mL e adicionado 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada (1:2:0,8), e tampado hermeticamente. Os tubos foram colocados em agitador rotativo por 30 min. Em seguida adicionado exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL da solução de sulfato de sódio (1,5%) e agitado por mais dois minutos. A adição de mais clorofórmio e água, muda a proporção para 2:2:1:8, causando a separação total do clorofórmio que carrega os lipídios (camada inferior). Os lipídios da amostra ficaram dissolvidos em 20 mL de clorofórmio. Sugado a camada superior (água+metanol) com um sifão, foi adicionado 1 g de sulfato de sódio anidro em papel de filtro com funil pequeno para tubos de 30 mL e filtrado rapidamente para obtenção de filtrado límpido. Foi medido em pipeta, 5 mL do filtrado e despejado em béquer de 50 mL, previamente pesado. Logo após, foi colocado numa estufa à 100 °C até evaporação do solvente. Em seguida colocado para esfriar em dessecador e feita a pesagem (BLIGH-DYER, 1959).

Cálculo

% de lipídeos totais =  $(P \times 4 / g) \times 100$

P = peso dos lipídeos (g) contidos em 5 mL de clorofórmio (x 4 para 20 mL de clorofórmio);

g = Peso da amostra (g).

### 3.3.8 Proteína

Foi pesado 0,20 g de amostra seca, enrolada em pedaço de papel vegetal e colocado no interior dos tubos de digestão semi-micro Kjeldahl. Acrescentou-se 2 g de mistura catalítica (Sulfato de potássio  $K_2SO_4$  e Sulfato de Cobre  $CuSO_4$ ) + 5 mL de  $H_2SO_4$  (ácido sulfúrico) nos tubos. Em bloco digestor os tubos foram aquecidos inicialmente a  $50^\circ C$ - $100^\circ C$  e aumentado a temperatura de  $50^\circ C$  a cada 15 minutos até atingir  $350 / 400^\circ C$ . As amostras foram digeridas até que o conteúdo dos tubos ficou transparente, de cor verde-azulado e a partir daí foi aquecido mais 30 minutos. Após esfriar, foram adicionados 10 mL de água destilada por tubo.

Para destilação, foi colocado o tubo com a amostra diluída em destilador de nitrogênio Tecnal TE-0363, e em seguida neutralizado com NaOH 50% (15 mL). Foi colocado um Erlenmeyer no suporte de coleta do destilador com 10 mL de ácido bórico e recolhido 50 mL do destilado (A cor vermelha do ácido bórico, durante a destilação muda para a cor azul). Para titulação, utilizou-se bureta com 25 mL de HCl 0,02 N (ácido clorídrico) e titulado o destilado até que o indicador virasse da cor azul para rosa clara (Foi anotado o volume gasto de HCl da bureta) (ZENÉBON *et al.*, 2008). A quantidade de nitrogênio total da amostra foi obtida através da seguinte equação:  $\%P = \%N \times \text{Fator de conversão (6.25)}$

$$\% N = \frac{(V_a - V_b) \times N \times f \times 0.014 \times 100}{PA} \text{ onde:}$$

PA

$\%P$  = Porcentagem de proteína total em matéria seca

$\%N$  = Porcentagem de nitrogênio total

$V_a$  = Volume de HCl gasto na titulação com a amostra.

$V_b$  = Volume de HCl gasto na titulação do branco

N = Normalidade de HCl

f = Fator de correção da solução de HCl

PA = Peso da amostra

### 3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados da quantificação microbiológica foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste t não pareado. As relações entre a contagem de microrganismos e as variáveis físico-químicas foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software InStat 3.1 (Graphpad), com nível de significância de 5%.

#### 4 RESULTADO E DISCUSSÃO

A análise microbiológica mostrou diferenças ( $p < 0,05$ ) para microrganismos psicrotróficos, leveduras e bolores, estafilococos e estafilococos coagulase positivos com maiores contagens observadas em queijos obtidos em feiras. Não foram observadas diferenças entre os microrganismos mesófilos e coliformes termotolerantes em relação à origem das amostras, embora tenham apresentado maiores contagens nos queijos das feiras. Esses resultados demonstram a importância de um rigoroso controle de qualidade desde a fazenda até o comerciante local. Além das más práticas de higiene observadas *in loco* durante as amostragens, a principal razão possível para os resultados foi devido à alta temperatura de exposição dos produtos (Tabela 1). Os queijos comercializados nas feiras não eram refrigerados, permitindo o amplo crescimento de microrganismos, representando risco real para os consumidores.

O número de bactérias mesófilas encontradas foi o esperado. Sabe-se que os microrganismos presentes no queijo, especialmente as bactérias ácido-láticas, crescem rapidamente em grandes números nos primeiros dias. De acordo com Montel *et al.* (2014), geralmente possui de 9 a 10 log UFC/g em queijos já no primeiro dia.

O único parâmetro microbiológico mais baixo para queijos de feiras foi a contagem de microrganismos psicrotróficos (Tabela 1). Isso pode ser explicado porque os queijos desses locais são feitos de leite cru e não são armazenados em temperaturas de refrigeração, portanto, esses microrganismos não são selecionados durante o crescimento. O oposto pode ser observado nos queijos de supermercado, com temperatura média de 9,57 °C, fazendo os psicrotróficos serem parte considerável de seus microrganismos.

A origem do queijo não influenciou ( $p > 0,05$ ) o número de coliformes termotolerantes presentes. Os números também foram altos para esse tipo de bactérias, indicando risco potencial de segurança para os consumidores. Foram encontrados valores de  $2,2 \times 10^6$  e  $4,1 \times 10^5$  NMP/g para feiras e supermercados, respectivamente, enquanto os padrões brasileiros definem um máximo de  $5,0 \times 10^3$  (BRASIL, 2001a). Considerando resultados individuais, 70% das feiras e 55% das amostras de supermercados estavam acima do máximo permitido por lei. Um alto número de coliformes é um problema recorrente nesse tipo de queijo e foi relatado por outros autores em diferentes regiões do Brasil. Oliveira *et al.* (2010a) e Sousa *et al.* (2014) encontraram 100 e 33% em queijos de coalho sem inspeção e 76,5 e 28% em queijos inspecionados, respectivamente. Santana *et al.* (2008) e Evangelista-Barreto *et al.* (2016) encontraram 93 e 50% das amostras acima do limite preconizado, respectivamente. Dias *et al.* (2015)

compararam queijos que foram refrigerados ou não e tiveram 25 e 44% das amostras como inadequadas, respectivamente.

Bolores e leveduras também foram encontrados em grandes quantidades nos estabelecimentos estudados, com valor médio maior ( $p < 0,05$ ) para as feiras. Isso pode ocorrer devido à maior acidificação desses queijos, verificada pelo pH e pela acidez titulável (Tabela 1), uma vez que leveduras têm boa tolerância a ambientes salgados e habilidade de fermentar a lactose e assimilar ácidos cítricos e lácticos (FLEET, 1990). Durante os cultivos foi percebida predominância de leveduras sobre bolores nas placas. Leveduras podem influenciar no sabor, aroma e na textura dos queijos, também podendo estar relacionadas à deterioração, se houver um número alto (BORELLI *et al.*, 2006). Estes autores identificaram resultados semelhantes em queijos após cinco dias de maturação à temperatura ambiente, com resultados variando de 3,4 a 7,9 Log UFC/g.

Com relação aos resultados individuais das contagens de estafilococos coagulase positivos, 20% das amostras de supermercados e 60% das feiras apresentaram números superiores aos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001a). Foi observado que estas bactérias potencialmente perigosas tinham contagem média significativamente mais alta para queijos obtidos de feiras e a chance de uma amostra ser inadequada foi seis vezes maior se proveniente de feiras do que de supermercados (Odds ratio,  $p < 0,05$ ). O valor médio obtido de queijos de feiras foi 4.892 vezes maior que o máximo de 3,0 Log UFC/g definido na legislação brasileira (BRASIL, 2001a). Considerando que é necessário o mínimo de 6,0 Log UFC/g para a produção de toxinas (MEDVEĎOVÁ; VALÍK, 2012), 5% das amostras dos supermercados e 55% das feiras estariam potencialmente contaminadas. Esse resultado corrobora pesquisas anteriores que mostraram que o queijo coalho foi responsável por 29% de todos os surtos de origem alimentar de 2005 a 2009 em Manaus. O risco relativo para ocorrência de surtos alimentares em função do consumo de queijo coalho foi 2,77 maior do que em comparação com qualquer outro alimento. Nesse cenário, estafilococos coagulase positivos foram associados a 25% dos surtos (RUWER *et al.*, 2011).

Em outras regiões, resultados semelhantes de amostras com contagens superiores às permitidas pela legislação foram encontrados por outros pesquisadores. Oliveira *et al.* (2010a) e Sousa *et al.* (2014) determinaram 71,4 e 98,1% em queijos de coalho sem inspeção e 77,1 e 92% nos queijos inspecionados, respectivamente. Evangelista-Barreto *et al.* (2016) e Pereira *et al.* (2017) obtiveram 70 e 100% das amostras, com contagens médias de 5,9 e 6,0 Log UFC/g, respectivamente.

Nenhuma das cepas obtidas em placas para isolamento de *Salmonella* spp. foi confirmada na triagem bioquímica. O alto número de coliformes termotolerantes deve indicar a presença de *Salmonella* spp., no entanto, é possível que a bactéria não tenha se multiplicado no produto devido à competição com outros microrganismos, principalmente bactérias ácido-láticas e leveduras fermentadoras que acidificam o queijo e produzem bacteriocinas. Santana *et al.* (2008); Oliveira *et al.* (2010a); Sousa *et al.* (2014) e Evangelista-Barreto *et al.* (2016) também encontraram semelhantes níveis de contaminação por salmonelas, com 26,7; 9,5; 1,0; e 0,0%, respectivamente.

Em relação aos resultados físico-químicos, ocorreram diferenças ( $p < 0,05$ ) para todas as variáveis analisadas, exceto Gordura na matéria seca e Teor de proteínas (Tabela 1). O queijo coalho é padronizado pela legislação brasileira, que determina valores mínimos e máximos de umidade, gordura na matéria seca e temperatura de armazenamento (BRASIL, 2001b). A maior diferença entre os tratamentos foi observada quando analisada a temperatura do queijo na compra. Foi observado que 35% das amostras de supermercado tiveram acima de 12 °C, enquanto 100% das amostras de feiras estavam acima deste valor, sendo o máximo permitido pela legislação para a conservação desse tipo de queijo (BRASIL, 2001b). O queijo coalho é rico em nutrientes e possui alta atividade de água, portanto, a baixa temperatura é essencial para manter as bactérias perigosas em baixos números e diminuir o processo de deterioração (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Valores de umidade e gordura na matéria seca, estavam conforme preconizados pela legislação, apesar da diferença significativa observada para a umidade. A diferença no teor de gordura pode ser explicada pela diferença observada na umidade e pelo fato de que as amostras de supermercados provêm de estabelecimentos maiores, geralmente padronizando o leite em 3% de gordura antes de fabricar o queijo, procedimento não realizado por produtores informais. Uma diferença menor e não significativa pode ser observada quando analisado o teor de gordura na matéria seca. A diferença observada no teor de cinzas ( $p < 0,05$ ) também pode ser explicada pelo percentual de umidade (Tabela 1), mas também pela falta de padronização na etapa de salga pelos produtores informais.

Foi verificado que queijos de feiras tiveram maior concentração de ácidos que os queijos de supermercados, observado pelas diferenças ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros de acidez titulável, com 2,09 e 0,83%, respectivamente, e o pH com 5,01 e 5,58, respectivamente (Tabela 1). Isso provavelmente ocorreu devido às contagens mais altas de microrganismos mesófilos, dos quais as bactérias lácticas ácidas e leveduras compõem o grupo principal. Não há norma ou legislação que defina os melhores valores para essas variáveis. Como referência, outros pesquisadores

encontraram valores um pouco mais altos que os encontrados neste trabalho. Sousa *et al.* (2014) encontraram pH 5,18 e 5,68 para amostras com e sem inspeção, respectivamente. Os valores de acidez variaram de 0,16 a 0,74% para queijos inspecionados a 0,12 a 1,01% para queijos sem inspeção. Oliveira *et al.* (2010b) ao analisar queijos coletados diretamente de produtores de queijo encontraram valores mais altos, com acidez variando de 0,13 a 0,57% e pH variando de 5,62 a 6,45. Esses dados concordam com as informações de que a microbiota do queijo coalho continua a crescer e modificar o produto durante o armazenamento, tornando essencial o controle de temperatura.

Tabela 1. Contagem de microrganismos e médias dos parâmetros físico-químicos e erro padrão das médias (MEV) do queijo coalho obtidos em diferentes tipos de estabelecimentos.

| Análises                                     | Estabelecimentos   |                          | P                        |                         |
|--|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
|  | Feiras   | Supermercados            |                          |                         |
| Análises microbiológicas                     | Microrganismos mesófilos ( <i>Log</i> UFC/g)                 | 9,90±0,20 <sup>ns</sup>  | 9,72±0,30 <sup>ns</sup>  | 0,0540                  |
|  | Microrganismos psicrotróficos ( <i>Log</i> UFC/g)            | 6,59±0,31 <sup>b</sup>   | 9,56±0,47 <sup>a</sup>   | 0,0011                  |
|  | Coliformes termotolerantes ( <i>Log</i> NMP/g)               | 6,35±0,41 <sup>ns</sup>  | 5,62±0,44 <sup>ns</sup>  | 0,3108                  |
|  | Bolores e leveduras ( <i>Log</i> UFC/g)                      | 6,53±0,21 <sup>a</sup>   | 4,65±0,24 <sup>b</sup>   | 0,0001                  |
|  | <i>Staphylococcus</i> spp. ( <i>Log</i> UFC/g)               | 7,25±0,37 <sup>a</sup>   | 6,84±0,23 <sup>b</sup>   | 0,0106                  |
|  | <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva ( <i>Log</i> UFC/g) | 6,69±0,77 <sup>a</sup>   | 5,96±0,54 <sup>b</sup>   | 0,0052                  |
|  | Análises físico-químicas                                     | Umidade (% , m/m)        | 44,83±0,76 <sup>b</sup>  | 49,17±0,79 <sup>a</sup> |
| Gordura (% , m/m)                            |  | 26,55±0,56 <sup>a</sup>  | 23,23±0,81 <sup>b</sup>  | 0,0018                  |
| Gordura na matéria seca (% , m/m)            |  | 48,01±0,98 <sup>ns</sup> | 45,73±1,07 <sup>ns</sup> | 0,1242                  |
| Cinza (% , m/m)                              |  | 4,43±0,11 <sup>a</sup>   | 3,76±0,14 <sup>b</sup>   | 0,0007                  |
| Proteína (% , m/m)                           |  | 21,09±0,57 <sup>ns</sup> | 21,26±0,51 <sup>ns</sup> | 0,8268                  |
| Temperatura (°C)                             |  | 31,25±0,99 <sup>a</sup>  | 9,57±0,69 <sup>b</sup>   | 0,0001                  |
| Acidez titulável (% , g ácido láctico/100 g) |  | 2,09±0,24 <sup>a</sup>   | 0,83±0,39 <sup>b</sup>   | 0,0118                  |
| pH   |  | 5,01±0,10 <sup>b</sup>   | 5,58±0,11 <sup>a</sup>   | 0,0004                  |

Médias na mesma linha seguidas de letras diferentes são diferentes no teste t Não pareado (P <0,05)

A influência dos parâmetros físico-químicos no crescimento microbiano é bem conhecida, portanto, foram analisados os coeficientes de correlação das relações entre os

parâmetros microbiológicos e físico-químicos e algumas correlações foram estatisticamente significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficiente de correlação de Pearson para relações entre a contagem de microrganismos e variáveis físico-químicas do queijo coalho obtido em estabelecimentos de varejo.

|   | <b>Temperatura</b> | <b>pH</b> | <b>Acidez titulável</b> | <b>Umidade</b> |
|---|--------------------|-----------|-------------------------|----------------|
| <b>Microrganismos mesófilos</b>                 | 0.3204             | -0.5335   | 0.4335                  | -0.2690        |
| <b>P-valor<sup>1</sup></b>                      | 0.0438             | 0.0004    | 0.0052                  | 0.0932         |
| <b>Microrganismos psicotróficos</b>             | -0.5337            | 0.2001    | -0.2700                 | 0.3891         |
| <b>P-valor</b>                                  | 0.0004             | 0.2158    | 0.0920                  | 0.0131         |
| <b>Coliformes termotolerantes</b>               | 0.1708             | -0.0512   | -0.1530                 | 0.3489         |
| <b>P-valor</b>                                  | 0.2920             | 0.7535    | 0.3460                  | 0.0274         |
| <b>Contagem de bolores e leveduras</b>          | 0.6730             | -0.5536   | 0.4169                  | -0.2862        |
| <b>P-valor</b>                                  | 0.0001             | 0.0002    | 0.0074                  | 0.0734         |
| <b><i>Staphylococcus</i> spp.</b>               | 0.3414             | 0.0787    | -0.0047                 | -0.2514        |
| <b>P-valor</b>                                  | 0.0311             | 0.6293    | 0.9772                  | 0.1176         |
| <b><i>Staphylococcus</i> coagulase positiva</b> | 0.4411             | -0.2234   | 0.2254                  | -0.5075        |
| <b>P-valor</b>                                  | 0.0044             | 0.1658    | 0.1619                  | 0.0008         |

<sup>1</sup> A correlação é significativa quando  $P < 0,05$ .

A temperatura teve influência ( $p < 0,05$ ) em todas as contagens microbiológicas, com exceção do número de coliformes termotolerantes (Tabela 2). Provavelmente isso aconteceu devido à forte concorrência que os coliformes encontraram devido a grandes quantidades de bactérias e leveduras mesófilas. Foi observada correlação negativa moderada entre a temperatura e o número de microrganismos psicotróficos. Esta associação era esperada, pois embora cresçam bem à temperatura ambiente, em geral a melhor temperatura para crescimento é de 25 °C. Portanto, como a temperatura média foi de 31 °C para amostras de feiras, os mesófilos se aproximaram mais de sua temperatura ideal de crescimento. Por outro lado, nas amostras de supermercados foi possível o crescimento de psicotróficos, competindo com os mesófilos, além da inibição pela menor temperatura. As temperaturas mais altas das amostras de feiras também revelaram correlação positiva com leveduras e de estafilococos coagulase positivos. Além disso, foi observada fraca correlação positiva para mesófilos e contagens de *Staphylococcus* spp.

A acidez titulável e o pH apresentaram padrão semelhante em relação às correlações com as contagens microbianas, mostrando correlação negativa moderada entre esses parâmetros (Tabela 2). Quanto mais ácido era o ambiente, melhor para leveduras e mesófilos, provavelmente representados por bactérias lácticas ácidas, ambos adaptados ao crescimento em ambientes ácidos.

A unidade mostrou correlação negativa moderada com a contagem de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva (Tabela 2). Isso pode ser explicado pela tolerância natural dessas bactérias para ambientes de baixa atividade de água, especialmente com alta concentração de sal, dando a vantagem em seu crescimento quando comparável a outros microrganismos. Houve também uma fraca correlação positiva com psicrotóxicos e coliformes termotolerantes, revelando maior suscetibilidade desses microrganismos à baixa atividade da água.

## **5 CONCLUSÃO**

O queijo coalho comercializado em Manaus possui qualidade físico-química de acordo com a legislação e a origem do queijo não influenciou suas porcentagens dos constituintes. Quanto ao risco microbiológico para os consumidores, os queijos não inspecionados na feira representam um risco maior do que os queijos inspecionados em supermercados. A qualidade microbiológica geral do queijo coalho deve ser melhorada.

## 6 REFERÊNCIAS

- ADAM, M. R.; MOSS, M. O. Microbiología de los alimentos. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A. 1997. 464p.
- ALMEIDA FILHO, E. S.; NADER FILHO, A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. Revista de Saúde Pública, v. 34, n. 6, p. 578-580, dez., 2000.
- AMAZONAS. Agência de Defesa Agropecuária e Florestal do Amazonas (ADAF). Ofício n. 1185/2017/ADAF-AM. Manaus. 7 p. Dados não publicados. 2017.
- ANDRADE, A. A. Estudo do perfil sensorial, físico-químico e aceitação de queijo de coalho produzido no estado do Ceará. 104p. 2006. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of Analysis. 16 ed. 3 rev. Washington. AOAC, 1997.
- ÁVILA, C. R.; GALLO, C. R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado queijo tipo "minas frescal" comercializados no município de Piracicaba, SP. Sci. Agric., v.53, p.159-163, 1996.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v.37, p.911-917, 1959.
- BORELLI, B. M. *et al.* Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.22, p.1115-1119, 2006.
- BORGES, M. F. *et al.* Microorganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, v.21, n.1, p.31- 40, 2003.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 30, de 26 de junho de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Manteiga da Terra ou Manteiga de Garrafa; Queijo de Coalho e Queijo de Manteiga, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. 2001b.

BRASIL. MAPA. Instrução Normativa nº 68, de 12 dez. 2006. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. 2006.

BRASIL. MAPA. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. 1996.

BRASIL. MAPA. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior (MDIC). Cadeia Agroindustrial do Leite. Diagnóstico dos Fatores Limitantes à Competitividade. Brasília: MDIC, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 2001a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVA). Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVA. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2018. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>> Acesso em: 23 janeiro 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. SVA. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresentao-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>> Acesso em: 03 março 2019b.

CÂMARA, S. A. V. *et al.* Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas Frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Higiene Alimentar, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 32-36, out., 2002.

- CAMARGO, M. B. A origem dos queijos. *Revista Alimentos e Tecnologia*. v. 10, n. 61. p. 32-33, 1995.
- CARVALHO, J. D. G. Caracterização da microbiota láctica isolada de queijo de Coalho artesanal produzido no Ceará e de suas propriedades tecnológicas. 154f. Tese de Doutorado em Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2007.
- CASCUDO, L. C. História da Alimentação no Brasil. 1ª ed. São Paulo: Global, 2004.
- CAVALCANTE, J. F. M. *et al.* Processamento do queijo coalho regional empregando leite pasteurizado e cultura láctica endógena. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, n. 1, p. 205-214, 2007.
- CLIVER, D. O. *Foodborne Diseases*. San Diego: Academic Press, INC. 1990. 395p.
- COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.33, p.342-346, 2002.
- CUNHA NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus enterotoxigênicos* em alimentos in natura e processados no estado de Pernambuco, Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.22, p.263-271, 2002.
- D'AOUST, J.I. Salmonella. In: DOYLE, M.P. (ed.). *Foodborne Bacterial Pathogens*. New York: Marcel Dekker, INC, 1989, cap.9, p.327-445.
- DANTAS, D. S. Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município de Patos, PB. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. 80p; 2012.
- DIAS, J.N. *et al.* Avaliação das condições higiênico-sanitárias de leite cru e queijo coalho comercializados em mercados públicos no norte do Piauí. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.8, p.277-284, 2015.
- DUARTE, D. A. M. *et al.* Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijo-coalho produzido e comercializado no estado de Pernambuco. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 72, n. 3, p. 297-302, 2005.

EUTHIER, S. M. F.; TRIGUEIRO, I. N. S.; RIVERA, F. Condições higiênico-sanitárias do queijo de leite de cabra tipo Coalho, artesanal elaborado no Curimataú paraibano. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 18, n. 2, 1998.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *et al.* 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, p.55-67, 2016.

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

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, v.68, p.199-211, 1990.

FRANCO, B. D. G. M. *Microbiologia de alimentos*. São Paulo: Atheneu, 2008.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A. B.; FRIAS, J. R. G. *Tecnologia de alimentos – princípios e aplicações*. São Paulo: Nobel, p.111-146., 2008.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. São Paulo: Varela, 2001: p.52-222.

HAJDENWURCEL, J. R. *Atlas de microbiologia de alimentos*, v. 1. São Paulo: Fonte Comunicação e Editora, 1998. 66p.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. (Coord.) ZENÉBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <[http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf?attach=true](http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf?attach=true)>. Acesso em: 10 março 2019.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). ISO 17410:2011. *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of psychrotrophic microorganisms*, 2011.

SILVA JUNIOR, E. A. *Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação*. São Paulo: Varela, 6ª ed: p.51-58; 1995.

MEDVEĐOVÁ, A; VALÍK, L. Staphylococcus aureus: Characterisation and Quantitative Growth Description in Milk and Artisanal Raw Milk Cheese Production. In: EISSA, A.A. (Ed). Structure and Function of Food Engineering. London: IntechOpen, 2012. p.71-102.

MENESES, R. B. *et al.* O comércio de queijo de coalho na orla de Salvador, Bahia: Trabalho infantil e segurança de alimentos. Revista de Nutrição, v. 25, n. 3, p. 381–392, maio 2012.

MONTEL, M. C. *et al.* Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. International Journal of Food Science, v.177, p.136–154, 2014.

NASSU, R. T.; MACEDO, B. A.; LIMA, M. H. P. Queijo de Coalho. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 40 p.

NUNES, M. M. *et al.* Investigation of food and water microbiological conditions and foodborne disease outbreaks in the Federal District, Brazil. Food Control, v. 34, n. 1, p. 235-240, 2013.

OLIVEIRA, E. *et al.* Qualidade microbiológica de queijos tipo coalho, comercializados em feiras livres da região metropolitana do Recife. Recife Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX 2013, 2013.

OLIVEIRA, K.A. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v.77, p.435-440, 2010a.

OLIVEIRA, W.S. *et al.* Caracterização físico-química do queijo coalho produzido no município de Jaguaribe, CE. In: Encontro de iniciação científica da Embrapa agroindústria tropical, 8., 2010, Fortaleza. Resumos. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2010b.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). Guias para o gerenciamento dos riscos sanitários em alimentos. Rio de Janeiro: Área de Vigilância Sanitária, Prevenção e Controle de Doenças - OPAS/OMS, 2009.

ORDÓÑEZ, J.A. Tecnologia de Alimentos. Alimentos de origem animal. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PEIXOTO, A. M. *et al.* A potencialidade microbiológica de coagulação do coalho líquido artesanal. Revista Verde, v.2, n.2, p. 52 – 64, 2007.

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

RAHMAN, M. S.; GUIZANI, N. G.; AL-RUZEIKI, M. H. D- and Z- values of microflora in tuna mince during moist and dry heating. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v. 37, p. 93-98, 2004.

RAMOS S. N. M.; COSTA C. A. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijo artesanal tipo coalho comercializado na cidade de Manaus-AM, Brasil. *Acta Amazônica*, v. 33, n. 4, p. 613-18, 2003.

REIS, K. T. M. G. *et al.* Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Pasteurizado Produzido no Brasil: Revisão. *UNOPAR Científica: Ciências biológicas e da saúde*, v. 15, p. 411-421, 2013.

RIEDEL, G. Controle sanitário dos alimentos. São Paulo: 3ª ed: p.73. Atheneu, 1995.

RUWER, C. M.; MOURA, J. F.; GONÇALVES, M. J. F. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos em Manaus, Amazonas (2005-2009): o Problema do Queijo Coalho. *Revista Segurança Alimentar e Nutricional*, v.18, n. 2, p. 60-66, 2011.

SALOTTI, B. M. *et al.* Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, v.73, p. 171-175, 2006.

SALVADOR, M. *et al.* Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de prato e parmesão ralado. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, v.19, n.1, p.65-74, 2001.

SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring: Harbor Laboratory Press; 1989.

SANTANA, R. F. *et al.* Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 60, n. 6, p. 1517–1522, 2008.

SEBRAE, Leite e derivados na cidade de Manaus. Manaus: Unidade de Estudos e Pesquisas. Estudo Setorial, 2016. 165 p; Il. color; 31 cm.

SENA, M. J. *et al.* Salmonelas isoladas de queijos tipo “coalho”: caracterização sorológica e resistência a agentes antimicrobianos Recife- PE. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 58, n. 1, p. 13-17, 1999.

SENA, M. J., *et al.* Características físico-químicas de queijo de Coalho comercializado em Recife, PE. Revista Higiene Alimentar, v. 14, n. 74, p. 41-44, jul. 2000.

SHINOHARA, N. K. S. *et al.* *Samonella* spp., importante agente patógeno veiculado em alimentos. Revista Ciências & Saúde Coletiva, v. 13, n. 5, p. 1675-1683. 2008.

SILVA M. C. D. *et al.* Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010.

SILVA, J. G. Características físicas, físico-químicas e sensoriais de queijo de minas artesanal da Canastra. 198p, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, 2007.

SILVA, J. P. L. *et al.* Staphylococcus spp.: incidência e surtosv– Brasília, DF: Embrapa, 2015. 90 p. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1034839/1/LivroStaphylococusspp.pdf>>. Acesso em 24 novembro 2019.

SILVA, J. V. Qualidade microbiológica e ocorrência de leveduras em diferentes amostras de queijo tipo “Minas Frescal”. Dissertação de Mestrado (Engenharia e Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual Paulista – UNESP. São José dos Campos; 2003

SILVA, M. P; CAVALLI, D. R; OLIVEIRA, T. C. R. M. Avaliação do Padrão Coliformes a 45°C e Comparação dos Tubos Múltiplos e Petrifilm EC na Detecção de Coliformes Totais e Escherichia coli em Alimentos. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, n. 26, p. 352-359, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. Métodos de análise microbiológica de alimentos. Campinas: ITAL, 228 p, 1995.

SILVA, N. *et al.* Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 5. ed, São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.

SOUSA, A.Z.B. *et al.* Aspectos físico-químicos e microbiológicos do queijo tipo coalho comercializado em estados do nordeste do Brasil. Arquivos do Instituto Biológico, v.81, p. 30-35, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 964 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6. Ed. São Paulo: Atheneu. 2015. 888p.

VENTUROSOSO, R. C. *et al.* Determinação da composição físico-química de produtos lácteos: estudo exploratório de comparação dos resultados obtidos por metodologia oficial e por ultrassom. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 43, n. 4, p. 601-613, 2007.

ZACARCHENCO, P. B. Bolors e leveduras em queijos. Revista TecnOLAT (ITAL). Expresso, ano II, n °8, set/ out de 2011.

ZENÉBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.