



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



PPGCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIA ANIMAL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARLOS EDUARDO FONSECA GOMES

**Avaliação da influência do uso de culturas lácticas no controle de
Escherichia coli em queijo minas frescal fabricados com leite cru**

SÃO LUÍS

2022

CARLOS EDUARDO FONSECA GOMES

Avaliação da influência do uso de culturas lácticas no controle de *Escherichia coli* em queijo minas frescal fabricados com leite cru

Orientadora: Dra. Francisca Neide Costa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, como requisito à obtenção de título de Mestre em Ciência Animal..

Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva

Linha de Pesquisa: Epidemiologia, Patogênese e Controle de Doenças de Animais e Microbiologia de Alimentos

SÃO LUÍS
2022

G633u Gomes, Carlos Eduardo Fonseca
Avaliação da influência do uso de culturas lácticas no controle de *Escherichia coli* em queijo minas frescal fabricados com leite cru / Carlos Eduardo Fonseca Gomes 63f.

Dissertação (Mestrado) — Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientador(a): Dra. Francisca Neide Costa

1. Microbiologia 2. Micro-organismos 3. Fermento

CDU 619:636.2

CARLOS EDUARDO FONSECA GOMES

**Avaliação da influência do uso de culturas lácticas no controle de
Escherichia coli em queijo minas frescal fabricados com leite cru**

Dissertação apresentada em: ____/____/____ pela banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Cecília Teresa Muniz Pereira/IFMA
1º membro

Profa. Isabel Azevedo Carvalho
2º membro

Profa. Dra. Francisca Neide Costa
Orientadora

DEDICATÓRIA

Com gratidão, dedico este trabalho a Deus.
Sem ele nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

À minha família, a minha esposa Isabela Nogueira e filha Alice Fonseca por todo o carinho e suporte e em especial aos meus pais Maria José e Denizar Gomes os quais perdi nesse período de pandemia.

À professora Dr.^a Francisca Neide Costa, pela oportunidade, atenção e orientação.

À professora Dr.^a Isabel Azevedo Carvalho, pela supervisão durante o estágio docente no Ensino Superior.

À UEMA por toda estrutura disponibilizada ao longo desta pesquisa.

À Bolsista de apoio técnico institucional, Rayara Cristina Viana da Silva, pelo o empenho e comprometimento com a pesquisa.

Aos Laboratórios de Pesquisa em Controle de Qualidade de Alimentos e Água (LAMP) e de Microbiologia de Alimentos e Água pelo espaço, estrutura e equipamentos cedidos.

À Coordenação e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro à pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do pela concessão da bolsa de estudos durante o período do mestrado.

Ao grupo de estudo em Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública, técnicos e estagiários de laboratório, pela colaboração, companheirismo e amizade.

Por fim, sou grato a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta pesquisa e ajudaram a concluir mais uma etapa importante da minha vida.

“É muito melhor ousar fazer coisas grandiosas, triunfar gloriosamente, mesmo que com alguns fracassos no meio do caminho, do que se igualar àquelas pobres almas que não aproveitam nem sofrem muito, pois vivem na penumbra cinza de quem não sabe o que é a vitória nem a derrota”.

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

O queijo é um dos principais produtos, sendo o queijo minas frescal o segundo tipo de queijo mais consumido no país. A contaminação microbiana dos queijos que utilizam leite cru é um problema de saúde pública. Na fabricação de queijos a cultura láctica tem como uma das finalidades, o controle das contaminações pela acidificação do meio. Essa pesquisa teve como objetivo avaliar a influência da adição de dois fermentos lácticos distintos para o controle de *Escherichia coli* em queijo minas frescal produzido a partir do leite cru. Foram utilizados os fermentos (*Lactobacillus casei* e *Lactococcus lactis*) inoculados na fabricação do queijo minas frescal, em concentrações de 1%, 1,5% e 2%, analisados durante oito dias de armazenamento e submetidos a avaliações microbiológicas de coliformes totais e termotolerantes. Foi observada uma redução de 49,48% na contagem de UFC/g de *E.coli* em relação ao controle, no experimento 1, com a utilização do fermento *Lactobacillus casei* a 1,5%, assim como no experimento 2, onde houve uma redução de 35,25% em relação ao controle na contagem de UFC/g de *E.coli*, com a utilização do fermento *Lactococcus lactis* na concentração de 2% em relação ao controle. Considerando os dados obtidos na pesquisa, os fermentos lácticos utilizados mostraram que são eficientes no controle da *E. coli*, em queijos minas frescal.

Palavras-chave: Microbiologia, micro-organismos, fermento.

ABSTRACT

Cheese is one of the main products, with minas frescal cheese being the second most consumed type of cheese in the country. Microbial contamination of cheeses that use raw milk is a public health problem. In the manufacture of cheese, one of the purposes of lactic culture is to control contamination by acidification of the medium. This research aimed to evaluate the influence of the addition of two different lactic cultures for the control of *Escherichia coli* in fresh cheese made from raw milk. The starter cultures (*Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis*) inoculated in the production of Minas Frescal cheese were used at concentrations of 1%, 1.5% and 2%. They were analyzed during eight days of storage and submitted to microbiological evaluations for total and thermotolerant coliforms. A reduction of 49.48% in the CFU/g of *E.coli* was observed in experiment 1, with the use of yeast *Lactobacillus casei* at 1.5%%, as well as in experiment 2, where there was a reduction of 35.25% in the CFU/g of *E.coli*, with the use of yeast *Lactococcus lactis* at a concentration of 2% compared to the control. Considering the data obtained in the research, the lactic ferments used showed that they are efficient in controlling *E. coli* in minas frescal cheeses.

Key words: Microbiology, microorganisms, yeast.

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição do leite de vaca | 17 |
| Tabela 2 - Média de NMP/mL de Coliformes totais e <i>E. coli</i> em leite cru utilizado na fabricação do queijo minas frescal. | 38 |
| Tabela 3 - Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de fermento lácteo (<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>) para controle de <i>E. coli</i> em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C | 39 |
| Tabela 4 - Comportamento dos níveis de crescimento de <i>E. coli</i> em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteo (<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i>) por um período de 8 dias a 10°C | 40 |
| Tabela 5 - Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de fermento lácteo (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>) para controle de <i>E. coli</i> em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C. | 42 |
| Tabela 6 - Determinação da contagem d UFC/g de <i>E. coli</i> em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermento lácteo <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> armazenado por 8 dias a 10°C. | 43 |
| Tabela 7 - Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de cultura mista (TIPO 1 <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1,5% + FERMENTO TIPO 2 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 2%) para controle de <i>E. coli</i> em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C. | 46 |
| Tabela 8 - Determinação da contagem d UFC/g de <i>E. coli</i> em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de cultura mista (<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>ramnosus</i> 1,5% + <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 2%) armazenado por 8 dias a 10°C. | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Escherichia coli</i> no microscópio ampliada 10.000 vezes | 19 |
| Figura 2 - Distribuição dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos de DTHA, Brasil 2016 -2021 | 30 |
| Figura 3 - Distribuição temporal dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos, Brasil, 2016 – 2019. | 30 |
| Figura 4 - Distribuição temporal dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos, Brasil, 2007 – 2015. | 31 |
| Figura 5 - Distribuição percentual de redução do crescimento de <i>E. coli</i> em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteo (<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>) por um período de 8 dias a 10°C. | 40 |
| Figura 6 - Distribuição percentual de redução do crescimento de <i>E. coli</i> em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteo (<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>) por um período de 8 dias a 10°C. | 44 |
| Figura 7 - Distribuição percentual de redução do crescimento de <i>E. coli</i> em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de cultura mista por um período de 8 dias a 10°C. | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
APHA - American Public Health Association
Aw – Atividade de Água
DIC – Delineamento Inteiramente Casualizado
DTHA – Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar
EA_gEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
EC – Caldo *Escherichia coli*
EIEC – *Escherichia coli* enteroinvasiva
EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EMB – Agar Eosina Azul de Metileno
ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
FDA – Food and Drug Administration
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LST – Caldo Lauril Sulfato Triptose
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade
STEC - *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga-like
UEMA – Universidade Estadual do Maranhão
UFMA – Universidade Federal do Maranhão
VB – Caldo verde Brilhante
VTEC - *Escherichia coli* produtora de toxina Verotoxina
°D – Graus Dornic

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 15 |
| 2.1 LEITE | 15 |
| 2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE | 16 |
| 2.3 MICROBIOTA DE LEITE E DERIVADOS | 18 |
| 2.3.1 <i>Escherichia coli</i> | 19 |
| 2.4 PASTEURIZAÇÃO DO LEITE E DERIVADOS | 21 |
| 2.5 QUEIJO | 23 |
| 2.5.1 História do Queijo | 23 |
| 2.5.2 Conceitos | 23 |
| 2.5.3 Classificação | 24 |
| 2.5.4 Queijo Minas Frescal | 25 |
| 2.6 FERMENTOS LÁCTEOS | 26 |
| 2.7 DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR E ALTERAÇÕES NOS QUEIJOS | 28 |
| 2.8 CONTAMINAÇÃO EM QUEIJOS MINAS FRESCAL | 31 |
| 3. OBJETIVOS | 33 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS | 33 |
| 4.1 PREPARO DA CULTURA DE <i>E.coli</i> (8789) | 33 |
| 4.2 PREPARO DA DILUIÇÃO DE 10 ⁻⁵ UFC/ml | 33 |
| 4.3 PREPARO DO FERMENTO LÁTICO | 34 |
| 4.4 FABRICAÇÃO DO QUEIJO | 34 |
| 4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS | 36 |
| 4.5.1 Preparo da Amostra | 36 |
| 4.5.2 Contagem de Coliformes Totais, Termotolerantes e <i>Escherichia.coli</i> .. | 36 |
| 4.6 ANÁLISES DE DADOS | 37 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 37 |
| 5.1 EXPERIMENTO 1: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 1) <i>Lactobacillus casei subsp. Rhamnosus</i> | 39 |
| 5.2 EXPERIMENTO 2: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 2) <i>Lactococcus lactis subsp. Cremoris</i> . .. | 42 |

| | |
|---|----|
| 5.3 EXPERIMENTO 3: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 1) <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> 1,5% + fermento (tipo 2) <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 2% | 45 |
| 6. CONCLUSÃO | 49 |
| REFERÊNCIAS | 50 |

1- INTRODUÇÃO

No Brasil, a atividade leiteira é desempenhada em todas as regiões, composta em sua maioria por pequenos e médios produtores. O leite é, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta e em condições de higiene de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

Apesar de ser um alimento de alto valor nutricional, é considerado um produto de alta perecibilidade, sendo um ótimo meio de crescimento de micro-organismos desejáveis e indesejáveis, devido à sua composição. Possui alto teor de umidade, gorduras, proteínas, lactose, vitaminas, sais minerais e sólidos totais (RODRIGUES, 2013).

Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos, tendo, ademais, alta demanda de consumo. É um concentrado protéico-gorduroso, cuja obtenção é feita mediante a coagulação do leite e posterior retirada do soro (SILVA, 2016).

O queijo minas frescal é um queijo típico do Brasil, sendo o segundo tipo de queijo mais consumido no país. Esse tipo de queijo é considerado um dos mais populares, pois tem uma ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar de grande parte da população em todas as regiões do país (BRITO, 2019). Esse é um queijo de massa mole, com pH alto e umidade elevada, que permite o desenvolvimento de muitos micro-organismos, que podem ocorrer a partir do leite utilizado como matéria-prima, ou por contaminações cruzadas durante ou após o processamento (SILVA, 2016).

As contaminações, aliadas às alterações decorrentes, podem, em poucos dias, tornar o queijo inaceitável ou até mesmo impróprio para o consumo. Sendo assim, ele é um produto com uma curta vida de prateleira, devendo ser comercializado logo após a sua fabricação (CAMARGO, 2020).

A contaminação microbiana dos queijos que utilizam leite cru é um grave problema de saúde pública, sendo considerado um dos principais veículos capazes de causar doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) (TOZZO *et al*, 2015), relacionadas principalmente à presença de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus sp.* (DORES *et al*, 2013).

Na fabricação de queijos, é conhecida a utilização de cultura láctica, que tem como uma das finalidades, o desenvolvimento da acidez, que tem importância fundamental no controle das contaminações e, conseqüentemente beneficia a ação

da renina. As bactérias do fermento, ao transformarem a lactose em ácido láctico, causam transformações bioquímicas evitando que a lactose seja utilizada como substrato para fermentações indesejáveis ao mesmo tempo em que, com a diminuição do pH, inibem o crescimento de certos micro-organismos nocivos. *E. coli* é inibida quando o pH do queijo cai para 5,0-5,2 (FURTADO, 1991). (FURTADO, 1991).

Avaliar a influência da adição de fermentos lácticos para o controle de *Escherichia coli* em queijo minas frescal produzido a partir do leite cru, visando a utilização de medidas alternativas, é de fundamental importância, considerando que a implantação de um pasteurizador exige muito recurso, juntamente com a falta de boas práticas de fabricação, impossibilitando a fabricação de queijos biologicamente seguros, por pequenos produtores.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 LEITE

Segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

Segundo a Instrução Normativa nº76 de 26 de Novembro de 2018, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, para fins de regulamentação, define leite cru refrigerado, como leite produzido em propriedades rurais refrigerado e destinado aos estabelecimentos de leite e derivados sob serviço de inspeção oficial.

Além do valor nutricional incontestável do leite, destaca-se também sua importância socioeconômica. O leite, é produzido em todas as regiões brasileiras, sendo importante gerador de empregos, rendas e tributos. No ano de 2020, a disponibilidade de leite no Brasil aumentou 2,8% com volume de 734,08 milhões de litros superior ao ano anterior, totalizando uma produção anual de 35,4 bilhões de litros produzidos formalmente. Atualmente esse número caiu 2,2% em 2021, porém, ainda assim um número bastante expressivo (EMBRAPA, 2021).

No primeiro trimestre de 2022, segundo a Embrapa/IBGE o número relacionado a produção, se comparado ao mesmo período de 2021, apresenta uma queda no volume de 10,3%, muito provavelmente devido aos custos de produção,

preço do dólar, bem como as incertezas políticas e econômicas nos mercados nacionais e internacionais em decorrência da pandemia (EMBRAPA, 2022).

A região Sudeste se apresenta na liderança entre as regiões produtoras com 34,35% da produção nacional, seguida pela região Sul com 34% e a região Nordeste com 14% da produção nacional. O estado do Maranhão ocupa a sexta colocação dentre os estados produtores de leite da região Nordeste, com a participação de 0,98% na produção brasileira, gerando uma quantitativo de cerca de 365 milhões de litros por ano (CNA, 2021).

Entre as regiões produtoras de leite no Maranhão, o sul e o oeste se apresentam como as maiores bacias leiteira apresentando, respectivamente 59% e 20% da produção, porém marcada pela escassez de tecnologias na produção e pela informalidade na comercialização do leite e derivados (RIBEIRO, 2022).

O leite obtido em circunstâncias naturais é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada de odor suave e ligeiramente adocicado. É um produto das glândulas mamárias e é um alimento indispensável aos mamíferos nos primeiros meses de vida, enquanto não pode digerir outras substâncias necessárias a sua subsistência (BEHMER, 1999).

Por se tratar de um excelente meio de cultura para micro-organismos, devido às suas características naturais, como alta atividade de água, pH próximo à neutralidade e composição rica em nutrientes, a qualidade do leite e seus derivados dependerá das condições microbiológicas nos processos de obtenção, armazenamento e transporte. As alterações causadas pelas falhas nesse processo implicam em mudanças no sabor e odor, alterações na viscosidade, produção de gás e acidificação (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

2.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO LEITE

O leite é secretado como uma solução aquosa de lactose, sais orgânicos e inorgânicos que estão dispersos caseínas, proteínas e lipídeos emulsificados, dentre outros, e a mistura desses e suas propriedades são mais complexas que a soma de seus componentes individuais. A composição do leite varia entre diferentes espécies de mamíferos e mesmo entre indivíduos da mesma espécie (GONZÁLEZ, 2005).

Dentro de uma espécie, a composição depende de muitos fatores como raça, período de lactação, tipo de alimento, manejo da alimentação, entre outros, dificultando definir uma composição padrão do leite, sendo a nutrição animal

responsável aproximadamente por 50% das variações de gordura e proteínas. Entretanto, as relações entre seus diversos constituintes são muito estáveis e podem ser usadas para indicar, se houver, qualquer adulteração na sua composição (CARDOSO *et al*, 2017).

O leite é uma combinação de várias substâncias que se encontram dissolvidas, em suspensão ou emulsão, como água, proteínas, lactose, minerais, vitaminas hidrossolúveis e a gordura que se encontra em emulsão distribuída no líquido em forma de glóbulos minúsculos que podem unir-se uns aos outros formando uma capa de creme quando o leite fica em repouso (ROSA *et al*, 2017). Na tabela 1 é apresentada a composição média do leite de vaca.

TABELA 1 composição do leite de vaca

| COMPONENTES | MÉDIA % |
|--------------------|----------------|
| Água | 87,4 |
| Extrato seco | 12,6 |
| Lipídeos | 3,9 |
| Caseínas | 2,7 |
| Albuminas | 0,4 |
| Globulina | 0,12 |
| Lactose | 4,7 |
| Sais | 0,7 |

Fonte: ROSA *et al* (2017)

As principais constantes físico-químicas utilizadas para determinar a qualidade do leite são o pH (20°C), que pode variar de 6,5 a 6,7; acidez titulável com variação de 15° a 18°D, a densidade variando de 1,028 g/mL a 1,036 g/mL e a temperatura de congelamento que varia de -0,510°C a -0,550°C (GOURSAUD, 1991).

Do ponto de vista de saúde pública, o leite, ocupa lugar de destaque em nutrição humana, pois representa um alimento essencial para todas as idades, principalmente recém-nascidos, o mesmo se aplicando para todos os derivados lácteos. Porém, as mesmas características que o tornam um alimento importante, também favorecem o crescimento de micro-organismos, tanto deteriorantes quanto patogênicos potenciais, que promovem prejuízos econômicos e colocam em risco a saúde do consumidor (NASCIMENTO, 2001).

Este fato indica que o leite se torna um excelente meio de cultura natural para micro-organismos, tanto desejáveis como no caso das bactérias lácteas como

indesejáveis como no caso de *Escherichia coli* que é um dos micro-organismos mais frequente no leite (SOUZA, *et al*, 2016).

2.3 MICROBIOTA DE LEITE E DERIVADOS

O leite contém abundante e variada microbiota procedente de várias fontes, como a microbiota do interior do úbere e da contaminação externa do leite, onde o leite a partir do momento que sai do úbere fica exposto a contaminações do ar, do exterior das tetas, de esterco, dos materiais das camas, das águas de limpeza, das condições do ordenhador se a coleta for manual e dos utensílios da ordenha, que constituem a principal fonte de contaminação de bactérias lácticas e psicrotróficas, sendo comum a presença de coliformes em grandes quantidades (ORDOÑEZ, 2007).

Deve-se garantir o resfriamento do leite logo após a ordenha de modo a reduzir o metabolismo da microbiota natural. Atenção especial deve ser dada à temperatura e ao período de armazenamento do leite, posto que estes fatores interferem na multiplicação dos micro-organismos no leite, alterando o número de bactérias totais. Destaca-se que longos períodos de armazenamento podem favorecer a proliferação de micro-organismos psicrotróficos, independentemente de qual seja a temperatura ótima de crescimento (DIAS *et al*, 2018).

Dito isto, é sabido que, o tipo e a carga microbiana inicial, juntamente com a temperatura de armazenamento do leite, são parâmetros que influenciam a proliferação das bactérias durante o armazenamento do leite cru. A microbiota láctica e os coliformes são os mais abundantes na temperatura de 25 a 30°C, por isso é imprescindível a refrigeração a 4°C para inibir a multiplicação dos micro-organismos (JAY, 2005).

Como estão presentes no leite micro-organismos, que são termófilos, mesófilos e psicrotróficos; destes a maioria são termolábeis, mas alguns são termodúricos. O estudo da microbiota do leite é tão complexo que pode ser analisado de diversos pontos de vista, como a pesquisa conformes, os elementos que predominam nos diferentes produtos lácteos, o que dá uma idéia muito clara dos micro-organismos mais importantes em cada produto (ORDOÑEZ, 2007).

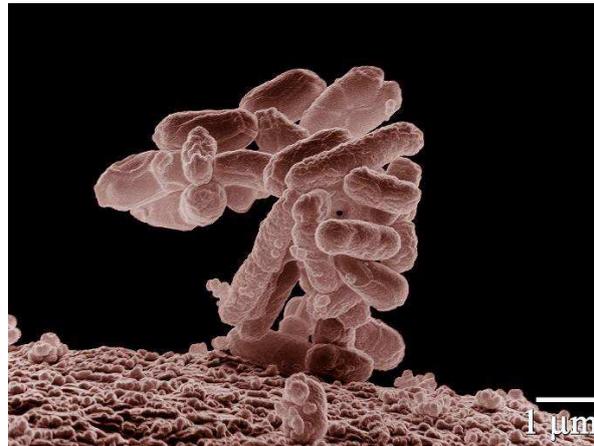
Escherichia coli, são indicadores de contaminação fecal e sua presença pode ser relacionada com bactérias patogênicas. A contaminação do leite por esses micro-organismos se dá tanto por secreção intramamária, quanto por contaminação fecal do úbere ou de equipamentos de ordenha (MENEZES *et al*, 2014).

A família Enterobacteriaceae compreende os gêneros *Escherichia*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* e *Yersinia*. Esses micro-organismos são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos e sensíveis à alta temperatura, sendo destruídos na pasteurização do leite. Em condições favoráveis, *Escherichia coli* pode alterar as características do leite e da maioria dos produtos lácteos, uma vez que fermenta a lactose e outros carboidratos produzindo ácido láctico, ácido acético, gás carbônico e hidrogênio (LAVEN *et al*, 2003).

2.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) é uma espécie de bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, cuja espécie citada é uma das mais pesquisada mundialmente, devido à sua importância para a saúde pública e à sua recorrência em doenças entéricas. São bastonetes gram-negativos, não esporulados, móveis ou não, anaeróbios facultativos e fermentadores de açúcares. Sua imagem é que é apresentada na figura 1 (MELO *et al*, 2018).

FIGURA 1. *Escherichia coli*



Fonte: USDA, ARS, EMU. – ARS 2005

Esta espécie é considerada como um habitante comensal da microbiota entérica de mamíferos e aves. Após o reconhecimento de diversas patologias entéricas e extraintestinais causadas por diversos sorotipos de *E. coli* é apontada como um dos agentes bacterianos mais frequentes em Doenças de transmissão hídrica e alimentar – DTHA (MACEDO *et al*, 2018).

A presença de *E. coli* em um alimento deve ser avaliada de duas perspectivas. Inicialmente, *E. coli*, por ser uma enterobactéria, uma vez encontrada em um alimento, indica que esse alimento tem uma contaminação microbiana de origem fecal e, portanto, está em condições higiênicas insatisfatórias. O outro

aspecto a ser considerado é que diversas linhagens de *E. coli* apresentam patogenicidade responsável por enfermidades e são classificadas de acordo com seus mecanismos de virulência (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

E. coli enterotoxigênica (ETEC) é responsável por causar uma diarreia aquosa, que pode ser chamada diarreia dos viajantes. A doença se dá como resultado da fixação da bactéria à mucosa intestinal e produção de toxinas. Dentre os sintomas apresentados podem ser citados febre baixa, cólicas abdominais, náuseas e fadiga, com duração entre 3 a 19 dias (DRUMOND *et al*, 2018).

E. coli enteropatogênica (EPEC) causa diarreia aquosa em crianças e bebês, sendo os principais sintomas observados vômitos, febre e diarreia aquosa com muco. Esta bactéria coloniza as microvilosidades intestinais e produz lesões características de ligação ou desaparecimento das bordas, não produzindo toxinas nem causando doença invasiva (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) pode causar diarreia sanguinolenta, colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e púrpura trombótica trombocitopênica, que em casos mais severos progride para colite hemorrágica podendo levar a óbito. Estas bactérias também são conhecidas como STEC, produtora de toxina Shiga-like ou VTEC, produtora de verotoxina (termos referentes à mesma toxina) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

As cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) apresentam sintomas como arrepios, febre, fezes com sangue, dores abdominais e de cabeça. São bactérias que colonizam o cólon e quando são fagocitadas por enterócitos se multiplicam e invadem outras células desse tipo, levando à sua morte (DRUMOND *et al*, 2018).

Escherichia coli enteroagregativa (EA_gEC) é uma linhagem patogênica e alguns relatos indicam que cepas, são capazes de produzir toxinas, genericamente chamadas de LT e ST de acordo com sua resistência térmica, mas que são genética e imunologicamente diferentes das enterotoxinas produzidas por ETEC. Sabe-se também que as EA_gEC interferem no metabolismo celular dos enterócitos, com ação na absorção de sais e eletrólitos e parecem estar associadas com casos crônicos de diarreia (diarreia protraída) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A propagação das infecções causadas por *E. coli* pode ocorrer por meio do contato direto com animais ou humanos atingidos pela infecção ou ainda por meio do consumo de alimentos contaminados. Os principais alimentos envolvidos em

contaminações são carne, salsicha, leite cru, queijo, alface, melão, rabanete e água (CALDORIN *et al*, 2013).

A identificação de bactérias desta espécie em alimentos é um dado muito importante, uma vez que sua presença além de indicativa de contaminação fecal ainda pode compreender cepas patogênicas que possibilitarão o desenvolvimento de casos ou surtos de DTHA (FIB, 2011).

E. coli, assim como ocorre para a atividade de água, tem valores de pH mínimo, ótimo e máximo para sua multiplicação. Verifica-se que pH em torno da neutralidade, entre 6,0 e 8,0, é o mais favorável para seu crescimento, tendo como faixa máxima de 9,0 a 10,0 e mínima 4,3 a 4,4 (BARNARD, 1981).

A fabricação de queijos artesanais realizadas em pequenas propriedades rurais ou em pequenas indústrias, sem a adoção de boas práticas de fabricação, acabam colocando em risco a saúde do consumidor, independente do tipo de queijo. Como foi relatado por Evangelista-Barreto *et al* (2016), na pesquisa que tem por título Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistente a antimicrobianos, que encontraram elevada carga microbiana em todas amostras de queijos artesanais pesquisadas, com 50% das amostras contaminadas por *Escherichia coli*.

Assim como Fonseca *et al*, (2020), na pesquisa Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijo minas frescal artesanal produzidos na zona rural da baixada fluminense, estado do Rio de Janeiro, que concluíram que 100% das amostras apresentaram uma contagem de UFC/ml acima dos limites aceitáveis pela legislação.

É notório que tratamento térmico do leite, como o emprego da pasteurização normalmente elimina *E. coli*, por serem termotolerantes, e quando elas estão presentes no leite pasteurizado, geralmente indicam contaminação pós processamento (BARNARD, 1981).

2.4 PASTEURIZAÇÃO DO LEITE

A pasteurização é um processo no qual o alimento é aquecido a uma determinada temperatura inferior ao ponto de ebulição, durante um determinado período de tempo e, logo em seguida, resfriado (BEHMER, 1999).

Existem dois processos de pasteurização mais comumente usados: pasteurização lenta e pasteurização rápida. A pasteurização lenta consiste no aquecimento do leite com agitação constante, a 65°C e manutenção dessa

temperatura por 30 minutos. O aquecimento é feito através de água quente circulando nas paredes duplas do tanque e em seguida resfria-se a 4° a 5° C. Já a pasteurização rápida, consiste no aquecimento e resfriamento do leite, circulando entre as placas, em camadas muito finas, em circuito fechado, ao abrigo de ar e da luz sob a pressão, à temperatura de aquecimento de 71 a 75°C, durante 15 segundos e resfriamento a uma temperatura de 2° a 3°C (LOPES *et al.*, 2018).

Diante dos riscos sanitários, relativos à ingestão de leite obtido e processado em condições insatisfatórias, se torna indispensável a aplicação de um tratamento térmico eficiente, tanto no ponto de vista tecnológico como de saúde pública. Como consequência, a pasteurização do leite elimina micro-organismos patogênicos e reduz a quantidade de micro-organismos totais presente na matéria-prima, desta forma a qualidade do produto final depende da carga microbiana inicial presente no leite (LEITE *et al.*, 2002).

A qualidade do leite pasteurizado está ligada diretamente as condições higiênico-sanitárias da ordenha; limpeza e sanitização dos equipamentos; bem como à manutenção da matéria-prima em condições de temperatura adequadas (MACEDO *et al.*, 2014).

Segundo as Instruções Normativas 76 e 77, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o leite pasteurizado é definido como produto submetido a tratamento térmico em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle em termorregistrador e termorregulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetro e torneira de prova, seguindo-se de resfriamento imediato em aparelhagem a placas até a temperatura igual ou inferior a 4°C e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (BRASIL, 2018).

O leite pasteurizado deve ser classificado de acordo com o conteúdo da matéria gorda, como: leite pasteurizado integral, leite pasteurizado semidesnatado e leite pasteurizado desnatado. Assim como o leite cru, o leite refrigerado deve atender às características sensoriais de líquido branco opalescente homogêneo e odor característico (BRASIL, 2018).

A pasteurização é uma das etapas mais importantes no beneficiamento do leite. Entretanto, sozinha, não se consegue garantir a inocuidade que o produto necessita, sua eficácia está diretamente ligada com a execução de etapas anteriores e posteriores à pasteurização, que devem receber a mesma atenção,

bem como o uso de tecnologia alternativas para a fabricação de derivados, como o uso da fermentação aumentando a durabilidade do produto, valor nutricional e produzindo transformações desejáveis (TONINI, 2014).

Estudos evidenciaram que o processo de pasteurização permite eliminar os micro-organismos patogênicos, porém não recupera um leite que já apresenta má qualidade, tendo em vista que permanece uma microbiota viável de 0,1 a 0,5 % da contagem inicial. Sendo assim, quanto maior a contaminação microbiana antes da pasteurização, proporcionalmente maior será sua microbiota residual (OLIVEIRA *et al*, 2006).

Corroborando com o fato de que o controle da carga microbiológica do leite pasteurizado no Brasil deixa em muito a desejar, pois apesar do leite passar pela pasteurização ainda sim, não há tanta eficácia, pela falta de boas práticas de higiene do meio, dos equipamentos e até mesmo nas indústrias beneficiadoras como foi possível verificar através do trabalho de Ferreira (2020), onde fala da contagem de bacteriana totais e confirmaram contagens bem acima do que preconiza a legislação.

2.5 QUEIJO

2.5.1 História do Queijo

Não se pode precisar a origem do queijo e de sua fabricação. As primeiras atividades relatadas do homem referente a vacas e ao leite, referem-se aos transcritos sumérios (4000 anos a.C.) e dos babilônios (2000 anos a.C.). A preparação do queijo provavelmente se realizou há muitos séculos, quando tribos nômades dos países do Leste do Mediterrâneo transportavam leite de mamíferos domesticados em sacos confeccionados com pele de animais, cabaças e outros recipientes como estômagos e bexigas (ROBISON, 1987).

Em um dado momento se observou que a secreção do estômago dos ruminantes jovens tinha a capacidade de coagular o leite. Essa observação levou a utilização do coalho (um extrato enzimático da secreção do quarto estômago dos bezerros, cordeiros e cabritos) para a coagulação do leite, processo que constitui uma etapa de fabricação do queijo (ROBISON, 1987).

2.5.2 Conceitos

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da Portaria nº 146 de 07 de março de 1996, entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite

reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Entende-se por queijo fresco o que está pronto para consumo logo após sua fabricação e por queijo maturado o que sofreu as trocas bioquímicas e físicas necessárias e características da variedade do queijo (BRASIL, 1996).

Diante dos vários derivados do leite, o queijo assume uma posição de destaque, devido ao seu valor nutricional, entretanto deve-se tornar uma série de cuidados para evitar possíveis contaminações tanto no leite quanto no seu produto final, no caso o queijo (BORELLI, 2020).

Do que é sabido, o primeiro queijo produzido no Brasil foi o Minas Artesanal, no século XVII, com a importação de gado da raça holandesa para Minas Gerais, nas encostas da serra da Mantiqueira, por ser uma região de clima favorável. Devido à grande disponibilidade de leite, o produtor decidiu fazer queijo com o excesso da produção (AMARANTE, 2015).

O queijo é um alimento concentrado de proteínas, lipídeos, carboidratos sais minerais, cálcio, fósforo e vitaminas entre elas A e B. Os queijos que são fabricados a partir de leite integral representam a forma ideal de proteína animal por serem capazes de veicular a proporção equilibrada desses componentes na dieta humana (EPAMIG, 1989).

2.5.3 Classificação

A classificação dos queijos em diferentes tipos não segue um único padrão. Na verdade, há diversas maneiras de separar os queijos em tipos. Os critérios mais usados para distinguir os tipos de queijo são: país de origem, tipo de leite, tempo de maturação e grau de umidade. Existem ainda outras classificações como por teor de gordura, processo de produção, tipo de casca, ou forma de obtenção da massa (AMARANTE, 2015).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo da Portaria nº 146 de 07 de março de 1996 a classificação a ser descrita se aplica a todos os queijos e não impede o estabelecimento de designar uma denominação e

requisitos mais específicos, característicos de cada variedade de queijo que aparecerá, nos padrões individuais.

a. De acordo com o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, em percentagem, os queijos classificam-se em:

- Extra Gordo ou Duplo Creme: quando contenham o mínimo de 60%
- Gordos: quando contenham entre 45,0 e 59,9%
- Semigordo: quando contenham entre 25,0 e 44,9%
- Magros: quando contenham entre 10,0 e 24,9%
- Desnatados: quando contenham menos de 10,0%

b. De acordo com o conteúdo de umidade, em percentagem, os queijos classificam-se em:

- Queijos de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa dura): umidade de até 35,9%.

- Queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijo de massa semidura): umidade entre 36,0 e 45,9%.

- Queijos de alta umidade (geralmente conhecido como de massa branda ou “macios”): umidade entre 46,0 e 54,9%.

- Queijos de muita alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou “mole”): umidade não inferior a 55,0%.

c. Quando submetidos ou não a tratamento térmico logo após a fermentação, os queijos de muita alta umidade se classificarão em:

- Queijos de muita alta umidade tratados termicamente.
- Queijos de muita alta umidade.

2.5.4 Queijo Minas Frescal

Segundo a Portaria nº 352 de 4 de setembro de 1997, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que dispõe sob o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, se entende como, queijo fresco o queijo obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas (BRASIL, 1997). Classificado como um queijo semi-gordo, de muito alta umidade, a ser consumido fresco, apresenta 25,0 a 44,9% de matéria gorda no extrato seco, umidade superior a 55% e sais entre 1 e 1,6%, de acordo com a classificação estabelecida no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos (BRASIL,2004).

O queijo minas frescal é um queijo branco, semelhante ao “queso blanco” fabricados em outros países da América Latina, produzidos a partir de leite de vaca, pasteurizado, caracterizado por alta atividade de água, baixo pH (5,1 – 5,6) e 1 a 1,6% de cloreto de sódio. Possui cerca de 43% a 55% de umidade e uma vida de prateleira de 10 a 14 dias (FURTADO, 2017).

É um produto que apresenta um grande valor socioeconômico e cultural no Brasil, por ser um dos queijos não curados mais populares e produzidos. Sua produção não necessita de grandes aparatos tecnológicos, de elevado consumo, tem ampla aceitação comercial e faz parte do hábito alimentar da população das diversas regiões do país (SILVA, 2015).

Como o queijo minas frescal é um produto que possui vida de prateleira muito curta, este queijo deve ser consumido rapidamente em poucos dias, sendo recomendado para a sua fabricação o processo de pasteurização como determina a legislação brasileira, porém, muitas vezes, esse regulamento não é respeitado (BOAS *et al*, 2020).

Os queijos frescos e macios apresentam fatores intrínsecos que contribuem para a multiplicação microbiana, como atividade de água (A_w), pH neutro e presença de nutrientes. O uso do leite cru pode implicar na contaminação por micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Um micro-organismo muito comum encontrado nos queijos minas frescal é *Escherichia coli* e a sua presença está associada a práticas de higiene e manipulações inadequadas, principalmente durante a obtenção da matéria prima e processo de fabricação (SOUZA, *et al*, 2016).

2.6 FERMENTOS LÁCTEOS

Um método de preservação que é largamente utilizado, desde os primórdios da civilização, é a fermentação, seja pela ausência de refrigeração ou pasteurização. Historicamente, o processo de fermentação envolvia a coagulação do leite por micro-organismos presentes no meio, obtendo-se um produto final com características e propriedades físico-químicas diferentes da matéria-prima (ALM, 1991).

As culturas lácticas mesófilas são amplamente utilizadas na fabricação de queijos frescos, de massa crua e massa semicozida. Os queijos podem ter olhaduras ou massa compacta, sem aberturas. A cultura láctica pode ter poder

acidificante, aromatizante ou uma combinação dos dois, e ainda incrementa a vida de prateleira (FURTADO, 1991).

Fermento, inóculo e cultura láctea são sinônimos e são usados na elaboração de produtos lácteos fermentados. Essas culturas são micro-organismos ativos, que crescem no leite ou soro (SALMINEM, 1998), sendo o primeiro ingrediente adicionado ao leite destinado a fabricação de queijo. O fermento é uma cultura de bactérias convenientes, que favorecem características próprias aos diferentes tipos de queijos. Fermentam a lactose com produção de ácido láctico, sendo as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* as mais utilizadas (AQUARONE, 2001).

A cultura láctica pode ser constituída de uma só espécie bacteriana, conhecida por cultura simples, ou pode reunir várias espécies, sendo chamada assim, de cultura mista ou múltipla (SALMINEM, 1998).

As bactérias ácido-láticas utilizadas atualmente para a produção de leites fermentados pertencem principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, entre outros, e são assim denominadas por fermentarem açúcares, produzindo ácido láctico como principal produto do metabolismo. Estas bactérias agem acidificando os produtos alimentares, impedindo o desenvolvimento de bactérias indesejáveis e aumentando o período de conservação dos produtos fermentados em relação à matéria-prima não fermentada (PIARD *et al*, 1997).

As bactérias ácido lácticas são Gram-positivas, microaerofílicas, não esporuladas, catalase negativa e apresentam colônias pequenas e apigmentadas. São nutricionalmente exigentes para o crescimento e são tolerantes a baixos valores de pH (SALMINEN, 1998).

Conforme Freire *et al.* (2021), as bactérias lácticas possuem capacidade de crescer em pH de 3,8, produzem grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes em compostos com propriedades sensoriais desejáveis. Além de enzimas, as bactérias lácticas produzem vários fatores antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, bacteriocinas, diacetil e acetaldeído, que atuam favoravelmente nos produtos alimentares, influenciando na textura, viscosidade e aroma, fazendo parte dos micro-organismos capazes de exercer efeitos benéficos ao hospedeiro, além de contribuir para a estabilidade do produto final.

A cultura láctea tem várias funções no processamento do queijo. O ácido láctico formado reduz o pH, colaborando com a dessora, exerce efetiva inibição no crescimento de micro-organismos indesejáveis, ajuda na ação do coalho, na coagulação da massa, conferindo firmeza e melhorando o rendimento final do queijo, bem como a padronização de processos (SERRANO, 2018).

Para a utilização de culturas lácteas, a Portaria nº146 de 7 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, estabelece o uso de fermentos lácteos até o valor máximo de 2% em relação ao volume leite pasteurizado utilizado, para a fabricação de queijo minas frescal.

2.7 DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR E ALTERAÇÕES NOS QUEJOS

Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) é identificada quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas similares, após a ingestão de água ou alimentos contaminados de mesma origem. Essa contaminação pode ser decorrente de bactérias, vírus, toxinas, parasitas, agrotóxicos, produtos químicos ou metais pesados e sinaliza falta de qualidade dos alimentos, especialmente a qualidade microbiológica (WHO, 2007).

Um surto de DTHA, pode ser descrito pelo aparecimento, em um curto período de tempo, de casos de afecções gastroentéricas entre indivíduos que consumiram os mesmos alimentos ou água (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Dentre os sintomas mais comuns das DTHA's causadas por micro-organismos, estão as manifestações gastrointestinais, como a diarreia. Dependendo da patogenicidade do micro-organismo envolvido no processo e das condições gerais do indivíduo afetado, a doença pode ser aguda ou crônica. Porém as DTHA's podem afetar outros órgãos causando distúrbios no sistema nervoso central, na corrente circulatória, no pulmão, no fígado, nos rins, nos olhos, no feto, etc. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

No entanto, a maioria das DTHA's são de intensidade leve a moderada, em que grande parte das pessoas que são acometidas, não buscam tratamento com profissionais de saúde, o que contribui, entre outros fatores, em subnotificações nos sistemas de vigilância e na dificuldade de se estimar a verdadeira incidência de DTHA na população (BRASIL, 2010; WHO, 2015).

Diversos fatores estão envolvidos na emergência das DTHA como a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, urbanização

desordenada, produção de alimentos em grande escala, deficiências no controle da qualidade dos alimentos, consumo de alimentos em vias públicas, aumento no uso de aditivos, mudanças ambientais, globalização e a facilidade de deslocamento da população (BRASIL, 2010).

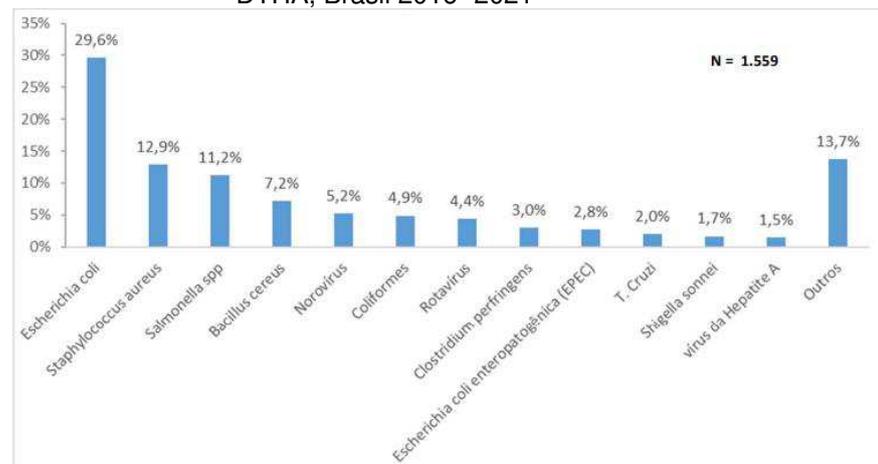
Em decorrência da fragilidade dos programas de controle existentes ou da ausência de sistemas de vigilância sanitária, as informações existentes a respeito das DTHA's não representam a real magnitude do problema. No Brasil, mesmo com criação do Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (VE-DTHA), implantado em 1999 para reduzir a incidência e subsidiar medidas de prevenção e controle para as DTHA's o desempenho entre os estados ainda é heterogêneo, havendo até os que nunca identificaram surtos (FIOCRUZ, 2013).

As bactérias constituem um grupo de micro-organismos de alta incidência que apresenta ampla diversidade e virulência, o que proporciona grande importância associada à sua capacidade de provocar danos à saúde humana (SILVA *et al*, 2017).

De acordo com o tipo de manifestação clínica as bactérias causadoras DTHA's podem ser divididas em grupos. As infecciosas mais importantes são *Salmonella*, *Campylobacter* e *Escherichia coli*, as principais intoxicantes são *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* e no grupo das toxigênicas *Escherichia coli* enterotoxigênica, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Clostridium perfringens* e *Bacillus* (BRASIL, 2010).

Segundo o informe sobre surtos notificados de doenças transmitidas por água e alimentos – Brasil 2016 – 2021, houve um comportamento estável considerando o número de notificações. Entre os surtos notificados, que tiveram os agentes etiológicos identificados, entre os mais prevalentes estão *Escherichia coli* com 29,6%, *Staphylococcus* com 12,9%, *Salmonella* com 11,2%, *Bacillus cereus* com 7,2%, *Norovírus* com 5,2%, e rotavírus com 4,4%, entre outros com menos de 3,0% cada como pode ser observado na Figura 2 (BRASIL, 2022).

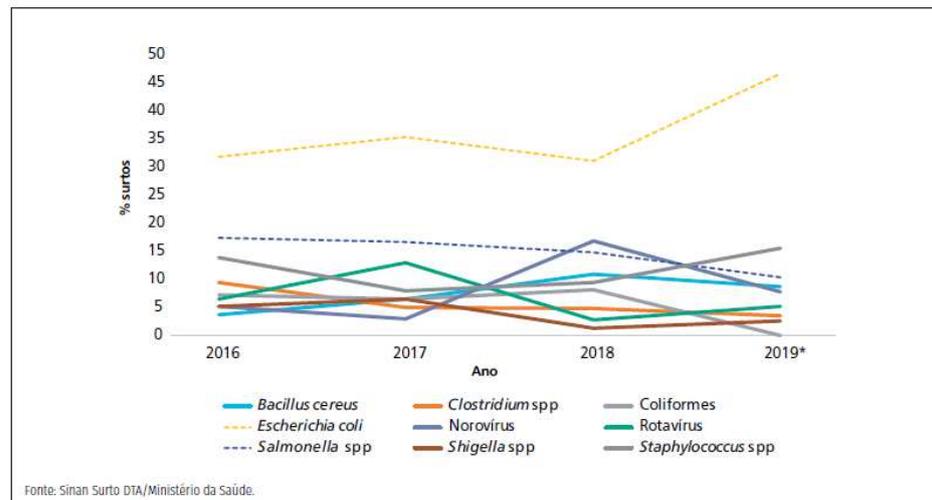
FIGURA 2. Distribuição dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos de DTHA, Brasil 2016 -2021



Fonte: Ministério da saúde, 2021.

Como pode-se observar na Figura 3, os surtos com presença da *Escherichia coli* é crescente e mais prevalente, o que mantém o perfil do período analisado anteriormente, entre 2007 a 2015, que também apresentou o crescimento constante na identificação deste agente Figura 4 (BRASIL, 2020).

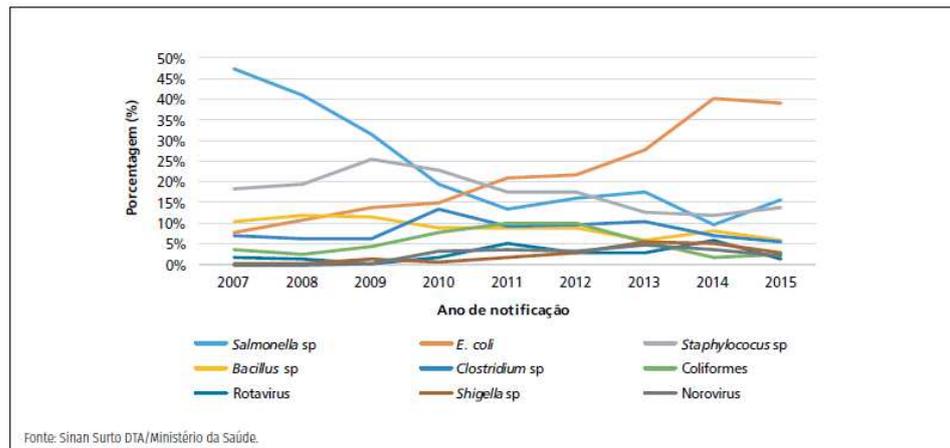
FIGURA 3. Distribuição temporal dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos, Brasil, 2016 – 2019.



Fonte: Sinan Surto DTA/Ministério da Saúde.

Fonte: Ministério da saúde, 2019.

FIGURA 4. Distribuição temporal dos principais agentes etiológicos identificados nos surtos, Brasil, 2007 – 2015.



Fonte: Ministério da saúde, 2015.

2.8 CONTAMINAÇÃO EM QUEIJOS MINAS FRESCAL

O queijo Minas frescal produzido em setor informal, normalmente é produzido a partir do leite cru, comercializado em feiras livres ou de forma autônoma, o que muitas vezes põe em risco a qualidade e segurança do alimento (LOGUERCIO; ALEIXO, 2001).

A contaminação microbiana dos queijos que utilizam leite cru é um grave problema de saúde pública, sendo considerado um dos principais veículos capazes de causar DTHA's (TOZZO *et al*, 2015), relacionados principalmente à presença de patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus* (DORES *et al*, 2013).

Dentre os fatores que normalmente levam à contaminação do queijo durante sua fabricação ou armazenamento estão: uso do leite cru, tratamento térmico inadequado, inexistência de controle higiênico-sanitário, e não utilização da cultura *starter*. Assim, as boas práticas de fabricação e as medidas de sanificação durante o processamento são cruciais para a garantia de um produto de qualidade bem como a utilização de cultura láctica (BUFFA *et al.*, 2001).

Sousa *et al*, (2016) ao pesquisarem a Ocorrência de *Escherichia coli* em queijos minas frescal comercializados na zona da mata mineira detectaram que 32% das amostras avaliadas apresentaram positivas para este micro-organismo, verificando que houve maior incidência de contaminação, nas amostras de produção informal, o que confirma o reflexo de más condições higiênico-sanitárias na produção, ressaltando que a aplicação de boas práticas da fabricação, são de fundamental importância.

Fermento, inoculo e cultura lácteas são sinônimos de culturas *starter*, usadas na elaboração de produtos lácteos fermentados. Essas culturas são micro-organismos ativos, que crescem no leite (SERRANO,2008).

Uma das finalidades da utilização de cultura láctica na fabricação de queijos é o desenvolvimento da acidez, que tem importância fundamental no controle das contaminações e, conseqüentemente beneficia a ação da renina. As bactérias do fermento, ao transformarem a lactose em ácido láctico, causam transformações bioquímicas evitando que a lactose seja utilizada como substrato para fermentações indesejáveis ao mesmo tempo em que, com a diminuição do pH, inibe-se o crescimento de certos micro-organismos nocivos. Segundo o autor *E. coli* é inibida quando o pH do queijo cai para para 5,0-5,2 (FURTADO, 1991).

O que se fortalece quanto ao uso de culturas lácticas na fabricação de derivados do leite, quando Oliveira *et al*, (2016), pesquisou em seu trabalho a avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijos minas frescal de leite de cabra desenvolvido por acidificação direta e fermentação láctica, que concluíram que independente da forma de acidificação, a produção de queijo minas frescal com leite de cabra se mostrou viável, assim como uma alternativa para agregação de valor a matéria-prima, aumentando a vida de prateleira, melhorando o rendimento e controlando as bacterias indesejáveis.

Considerando a importância de medidas alternativas, essa pesquisa teve como objetivo avaliar a influência da adição de fermentos lácticos para o controle de *Escherichia coli* em queijo Minas frescal produzido a partir do leite cru, visto que, a implantação de um pasteurizador exige um investimento elevado, juntamente com a falta de boas praticas de fabricação, impossibilitando a fabricação de queijos biologicamente seguros por pequenos produtores.

3. OBJETIVOS

a) Geral:

Avaliar a influência do uso de culturas lácticas no controle de *E. coli* em queijos minas frescal fabricados a partir do leite cru.

b) Específicos:

- Avaliar a carga microbiana inicial da matéria prima (leite) usado para a fabricação dos queijos minas frescal.

- Determinar o tipo e a quantidade de cultura láctica a ser utilizada no processamento de queijo minas frescal, a partir de leite cru;

- Avaliar microbiologicamente os queijos minas frescal obtidos a partir de leite cru inoculados com *E. coli* e cultura láctica (tipo e quantidade), nos dias 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias de armazenamento refrigerado;

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Pesquisa em Controle de Qualidade de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão e laboratórios parceiros da Universidade Federal do Maranhão.

4.1 PREPARO DA CULTURA DE *E.coli* (8789).

Foi utilizada cultura de *E.coli* (8789), ativada em tubos contendo ágar nutriente inclinado. Estes foram incubados em estufa a 35 °C durante 24 – 48hs. Após o crescimento da cultura, foi retirada uma alçada de um tubo e estriada em placas contendo meio seletivo para *E.coli*, EMB (Eosina Azul de Metileno) a fim de se obter colônias isoladas. As placas foram incubadas em estufa a 35 °C durante 24 – 48hs. Após o crescimento das colônias a placa foi mantida em temperatura de refrigeração até o início do preparo da diluição, o que ocorreu no mesmo dia de fabricação do queijo.

4.2 PREPARO DA DILUIÇÃO

Foi retirada com a alça, uma colônia da placa de *E. coli* e inoculada em um tubo contendo 10 mL de solução salina 0,85% e homogeneizado. Para diluição de 10^{-1} foi transferido assepticamente 1,0 mL do tubo contendo a colônia inoculada, para um tubo com 9,0 mL do diluente, este foi homogeneizado, sendo as diluições subsequentes obtidas da mesma forma até que se encontrasse um número viável para contagem nas placas que no caso do experimento 1 e 3 foram até a diluição de 10^{-5} UFC/ml e no experimento 2 foi de 10^{-6} UFC/mL, conforme as técnicas especificadas por Silva *et al*, (1997).

4.3 PREPARO DO FERMENTO LÁTICO

Foram adquiridos da empresa Rica Nata no comércio local, por serem apresentados de forma liofilizada como também serem de baixo custo, dois tipos de fermento os Tipos 1 (*Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus*) e Tipo 2 (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*). Para ativação dos fermentos, foi transferido um sachê para 20l do fermento em forma liofilizada para um frasco estéril contendo 200 mL de leite pasteurizados, cada um para o preparo da isca. Ambos foram mantidos em temperatura ambiente, respectivamente até “viragem” ou coagulação por aproximadamente 15h e armazenado em temperatura de refrigeração (SILVA, 2005). Para a repicagem foram retiradas alíquotas de 1%, 1,5% e 2%, respectivamente para cada tipo de fermento e transferidos para 200mL de leite pasteurizado, mantidos em temperatura ambiente por aproximadamente 15h e armazenado em temperatura de refrigeração até a fabricação do queijo, realizado no dia seguinte ao preparo do fermento.

4.4 FABRICAÇÃO DO QUEIJO

O leite para a fabricação do queijo foi adquirido em uma vacaria localizado na avenida Lourenço Vieira da Silva, bairro do tirirical, São Luis, Maranhão, por ser um local estratégico, para o transporte da matéria-prima, com maior agilidade e rapidez para a fabricação do queijo.

Ao chegar no laboratório, primeiramente, foram coletados assepticamente 100 mL da amostra do leite cru usada para o processamento do queijo, e realizada análise para coliformes totais e termotolerantes, conforme preconizado por (VANDERZANT *et al*, 1992). Para fabricação do queijo o leite foi aquecido a temperatura de 35 °C, em seguida foram adicionados o fermento, a diluição da cepa de *E.coli* e o coalho. Após a coagulação, a massa foi cortada em cubos de 1,5 a 2,0cm de aresta, depois de três minutos foi feita a agitação lenta durante 25 minutos, até obter firmeza nos grãos que tendem a se tornar arredondados. Em seguida, foi efetivada a eliminação do soro e realizada a enformagem. Após um repouso de 10 – 20 min, os queijos foram virados e armazenados em temperatura de 5 a 10°C para a salga e completo dessoramento. A fim de se obter uma salga uniforme, foi utilizada salga em salmoura a temperaturas de 10 a 12 °C, com 2% de sal por período de 90 minutos, sendo esta renovada em cada fabricação do queijo tipo fresca (SILVA, 2005).

No dia seguinte os mesmos estavam prontos para análises, os quais foram acondicionados individualmente em embalagens plásticas fechadas e mantidas em temperatura de refrigeração (8 e 10°C) até o momento de realização das análises. Os queijos foram armazenados durante 8 dias, sendo que as avaliações foram realizadas a cada 48h.

EXPERIMENTO 1 – Fabricação de queijo minas frescal com utilização de fermento (tipo 1) *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

Os queijos foram elaborados com as seguintes concentrações: [1] controle (sem fermento láctico); [2] cultura láctica 1%; [3] cultura láctica 1,5%; [4] cultura láctica 2%.

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 4 x 5, quatro concentrações diferentes de fermento e cinco dias de análises (0, 2º, 4º, 6º, e 8º dias). Foram utilizadas três repetições (porções) por tratamento, onde cada uma constava aproximadamente 100 g do produto.

EXPERIMENTO 2 – Fabricação de queijo minas frescal com utilização de fermento (tipo 2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Os queijos foram elaborados com as seguintes concentrações: [1] controle (sem fermento láctico); [2] cultura láctica 1%; [3] cultura láctica 1,5%; [4] cultura láctica 2%.

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 4 x 5, quatro concentrações diferentes de fermento x cinco dias de análises (0, 2º, 4º, 6º, e 8º dias). Foram utilizadas três repetições (porções) por tratamento, onde cada uma constava aproximadamente 100 g do produto.

EXPERIMENTO 3 – Fabricação de queijo minas frescal com utilização de fermento (melhor tipo 1) *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1,5% + fermento (melhor tipo 2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%

Os queijos foram elaborados com cultura mista (melhor do tipo 1 + melhor do tipo 2) nas seguintes concentrações: [1] Controle (sem fermento láctico); [2] cultura láctica mista 1%; [3] cultura láctica mista 1,5%; [4] cultura láctica mista 2%.

O experimento foi conduzido seguindo um delineamento inteiramente casualizado, num esquema fatorial 4 x 5, quatro concentrações diferentes de fermento x cinco dias de análises (0, 2º, 4º, 6º, e 8º dias). Foram utilizadas três

repetições (porções) por tratamento, onde cada uma constava aproximadamente 100 g do produto.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O protocolo microbiológico incluiu a enumeração de coliformes totais e termotolerantes, segundo metodologia estabelecida pela American Public Health Association (APHA, 2001) e Food and Drug Administration (FDA, 2002). Para avaliar a adequação dos resultados das análises, adotaram os limites microbiológicos dispostos na Resolução IN nº 60 de 23 de Dezembro de 2019 /ANVISA/MS (BRASIL, 2019).

4.5.1 Preparo da Amostra

Foram pesados assepticamente 25 gramas da amostra e colocados em frasco contendo 225mL de solução salina-peptonada para o preparo das diluições seriadas. Após homogeneização do frasco contendo a amostra obteve-se a diluição de 10^{-1} . Para preparação da segunda diluição (10^{-2}) foram transferidos assepticamente 1,0mL da diluição 10^{-1} para 9,0mL do diluente e, assim sucessivamente até a diluição 10^{-5} .

4.5.2 Contagem de Coliformes Totais, Termotolerantes e *Escherichia.coli*.

Para as contagens de coliformes totais, termotolerantes e *E.coli*, foi utilizada a metodologia descrita por APHA, 1992.

Após as amostras serem preparadas, estas passaram para a etapa seguinte, o teste presuntivo, as quais foram transferidas 1ml das diluições para tubos contendo o meio Caldo LST (Lauril Sulfato Triptose), com tubos de Durhan invertidos. Incubados a 35°C/24 - 48h e os tubos considerados positivos, com crescimento e produção de gás passaram para a etapa subsequente, teste confirmativo.

A partir de cada tubo com LST positivo, foi transferido um alçaçada bem carregada da cultura, para os tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile (VB) e tubos contendo Caldo *E. coli* (EC), os quais foram incubados a 35°C e 44,5°C respectivamente, por 24 -48h.

Os tubos contendo caldo VB, que apresentaram crescimento com produção de gás, foram dados como positivos, sendo determinado o Número Mais Provável, posteriormente. Para os tubos contendo o caldo EC, foi tomado uma aliquota

de 0,1ml da cultura obtida de cada tubo com produção de gás e crescimento para a etapa de confirmação e quantificação de *E. coli*.

Na intenção da confirmação e quantificação de *E. coli*, foi inoculado em placas contendo Eosina Azul de Metileno (EMB), 0,1ml dos tubos positivos do caldo EC, e incubados a 35°C/24 – 48, sendo observado o crescimento de colônias típicas de *E. coli* (nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico)

4.6 ANÁLISES DE DADOS

A pesquisa foi conduzida seguindo um delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial com 2 fatores, constituído de 4 tratamentos e 5 avaliações (0, 2, 4, 6, e 8 dias), com 3 repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste F para verificar o efeito dos tratamentos e o teste de Tukey para a comparação de médias entres os tratamentos.

Nas análises estatísticas foi empregado o programa Agroestat versão 1.1, desenvolvido por Barbosa; Maldonado Junior (2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos das análises microbiológicas para pesquisa de coliformes totais nas amostras de leite cru usado para fabricação dos queijos, encontram-se na tabela 2. Pelos dados encontrados, verifica-se que houve crescimento de coliformes totais com contagem de $2,4 \times 10^3$ e $1,1 \times 10^3$, para os experimentos 1 e 2, respectivamente. Esses valores revelam a carga microbiana inicial da matéria-prima para fins de comparação com o derivado do leite (Queijo minas frescal) e verificação do grau de contaminação. No Brasil, a comercialização do leite cru é proibida, porém por falta de informação e questões culturais, principalmente em regiões subdesenvolvidas, seu consumo nesta forma é muito comum. Além do risco à saúde, a contaminação microbiológica do leite pode ocasionar alterações físico-químicas e sensoriais devido à presença de enzimas e toxinas produzidas por algumas espécies bacterianas (OLIVEIRA, 2016).

TABELA 2. Média de NMP/mL de coliformes totais e *E. coli* em leite cru utilizado na fabricação do queijo minas frescal.

| Amostra | Coliformes Totais | <i>E.coli</i> |
|---------------|----------------------|----------------------|
| | (NMP/ml)* | (UFC/ml)* |
| Experimento 1 | 2,4 x10 ³ | INC* |
| Experimento 2 | 1,1 x10 ³ | 1,3 x10 ⁴ |
| Experimento 3 | 1,1 x10 ³ | 1,2 x10 ⁴ |

NMP/mL: Número mais provável por grama da amostra; UFC/ml: Unidades formadoras de colônias por grama da amostra; INC: Incontáveis

A presença de coliformes totais não indica necessariamente contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos, porém a alta carga microbiana para *E. coli* (incontáveis) em amostras do leite cru usado para a fabricação dos queijos fornece, com maior segurança, informações de falhas nas condições higiênicas de obtenção do produto e manipulação sem cuidados de higiene e/ou armazenamento inadequado (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Por ser um alimento nutritivo e amplamente consumido, o leite é um substrato ideal para o desenvolvimento de grupo de bactérias que podem causar danos graves à saúde, pelo seu consumo sem tratamento térmico, o que leva à possibilidade de doenças que podem ser veiculadas pelo consumo do leite cru e seus derivados. Entre as doenças que podem ser veiculadas pelo consumo de leite cru estão a tuberculose, brucelose, listeriose, salmonelose, yersiniose, campilobacteriose, infecção por *Escherichia coli*, entre outras (LIMA, 2021).

Montanhini e Hein (2013), quando avaliam a qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Piraí do Sul, estado do Paraná, Brasil, evidenciaram o perigo que o consumo de leite cru representa para a saúde do consumidor, além do problema de adulteração no leite, que visa aumentar o rendimento e/ou mascarar problemas causados pelas inadequadas ou inexistentes práticas de higiene e refrigeração.

Sandoval e Ribeiro (2021), apontam para a importância da qualidade do leite do produto final, que podem apresentar alterações em sua composição físico-química devido a fatores como origem do animal, alimentação, idade, dentre outros e por isso existem padrões que são estabelecidos para detectar erros e fraudes que comprometem a qualidade do produto final, bem como as boas práticas e tratamento térmico eficiente para obtenção de um produto seguro.

Visto que as boas praticas de fabricação visam minimizar os riscos em diferentes etapas no processo de produção, quando Ulisses *et al*, (2022),

comparam propriedades com ordenha mecânica e com ordenha manual, e verificaram que o tipo de ordenha não contribui para a obtenção do leite com qualidade, caso não estejam associados as boas práticas, ou seja, na pesquisa, as amostras coletadas tanto por meio de ordenha manual quanto por ordenha mecânica apresentaram valores acima do permitido. Apresentando apenas duas amostras em conformidade, uma por ordenha manual e uma por ordenha mecânica.

Isto nos mostra a extrema importância na contagem de bactérias, pois é indicativo de qualidade higiênico-sanitário e manejo. Sendo que a ocorrência de resultados elevados fornece indicativo de existência de falhas nos procedimentos como o de ordenha, refrigeração, transporte dentre outros.

5.1 EXPERIMENTO 1: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 1) *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*

Em relação à contagem de *E. coli* obtida nas amostras de queijo minas frescal produzidos a partir de leite cru inoculadas com a concentração 10^{-5} UFC/mL, no experimento 1 utilizando o fermento *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*, foi constatado que o tratamento com a concentração de fermento a 1% diferiu, significativamente dos demais tratamentos e controle ao longo dos dias de avaliação. Quando utilizada a concentração de fermento *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* a 1% ocorreu uma redução de 46,1% de *E. coli*, enquanto na concentração de 1,5% apresentou uma diminuição *E. coli* de 49,48% e a concentração de 2% um decréscimo de 48,8% de *E. coli* em relação ao controle, conforme tabela 3.

TABELA 3. Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de fermento lácteos (*Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus*) para controle de *E. coli* em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C.

| TRATAMENTOS | UFC/g |
|-----------------|----------------------|
| Controle | 122,35 ^{a*} |
| Ferm. a 1% | 65,91 ^{b*} |
| Ferm. a 1.5% | 61,9 ^{c*} |
| Ferm. a 2% | 62,6 ^{c*} |
| DMS (5%) | 1,3 |
| CV (%) | 1,69 |

*Médias seguidas de letras iguais, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P > 0,05$). UFC/g = Unidade formadora de colônias por grama da amostra; DMS = Diferença média significativa; CV = Coeficiente de Variação; Ferm = Fermento.

Na tabela 4, estão apresentados os resultados ao longo do período (dias) de armazenamento. Observa-se uma tendência de diminuição da contagem de UFC/g para *E. coli* nos tratamentos em que foram utilizados fermento *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* nas concentrações de 1,5% e 2% , destacando-se a concentração de 1,5% que apresentou uma redução de 49,48% em relação ao controle.

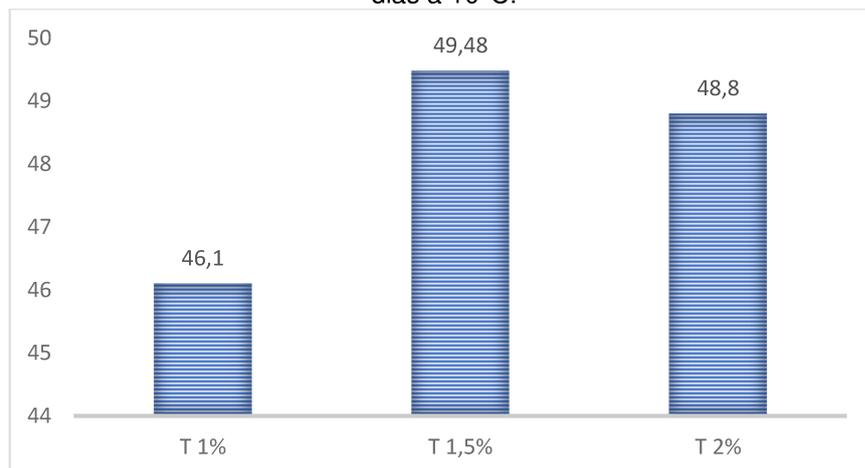
TABELA 4. Comportamento dos níveis de crescimento de *E. coli* em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteos (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*) por um período de 8 dias a 10°C.

| DIAS | TRATAMENTOS (UFC/g) | | | |
|------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | CONTROLE | FERM. 1% | FERM. 1,5% | FERM. 2% |
| 0 | 1,22 x10 ⁷ | 6,7 x 10 ⁶ | 6,35 x 10 ⁶ | 6,4 x 10 ⁶ |
| 2 | 1,23 x10 ⁷ | 6,71 x 10 ⁶ | 6,25 x 10 ⁶ | 6,3 x 10 ⁶ |
| 4 | 1,23 x10 ⁷ | 6,5 x 10 ⁶ | 6,13 x 10 ⁶ | 6,25 x 10 ⁶ |
| 6 | 1,21 x10 ⁷ | 6,5 x 10 ⁶ | 6,13 x 10 ⁶ | 6,2 x 10 ⁶ |
| 8 | 1,22 x10 ⁷ | 6,42 x 10 ⁶ | 6,1 x 10 ⁶ | 6,15 x 10 ⁶ |

UFC/g= Unidade formadora de colônia por grama; Ferm.= Fermento

Na figura 5 se observa o percentual de redução para cada concentração de fermento utilizado neste experimento na fabricação do queijo minas frescal.

FIGURA 5. Distribuição percentual de redução do crescimento de *E. coli* em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteo (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*) por um período de 8 dias a 10°C.



T1% = Fermento a 1% T1,5% = Fermento a 1,5% T2% = Fermento a 2%

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, delimitou os níveis de contaminação microbiológica em alimentos para consumo humano por meio da Instrução Normativa nº60 de 23 de Dezembro de 2019. Nesta resolução são especificados os limites toleráveis de micro-organismos, obedecendo aos padrões individuais e a variedade de cada produto. Em queijos de alta umidade, como o

queijo minas frescal, os parâmetros toleráveis obedecem aos valores de m 102 e M 103 para *Escherichia coli*/g, (BRASIL, 2019).

De acordo com os resultados dessa pesquisa, nenhuma amostra foi considerada própria para o consumo uma vez que todas as amostras (100%) superaram o limite tolerável estabelecido pela legislação brasileira para *E. coli*. O elevado nível de contaminação dos queijos pode estar relacionado à alta carga microbiana inicial (Incontáveis) do leite usado para fabricação dos queijos. Esse fato ressalta a necessidade da implementação de boas práticas de fabricação na obtenção, manipulação e armazenamento da matéria prima (SOUZA,2016).

O mecanismo de ação dos fermentos está nas bactérias ácido-láticas, principalmente aquelas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Estas são reconhecidas por fermentarem açúcares produzindo ácido lático como principal produto do metabolismo. A acidificação do alimento, neste caso, o queijo, pode impedir o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, contribuindo para a melhoria das qualidades sensoriais, como também para a conservação do produto por mais tempo (BEHMER, 1999).

Tal mecanismo é confirmado no trabalho de Chioda *et al*, (2017) que, ao analisar a inibição de *Escherichia coli* isolada de queijo minas frescal por *Lactobacillus acidophilus* concluiu que, a competição promovida pelas bactérias lácticas assume um papel importante na tecnologia de alimentos, pois está diretamente relacionado com a capacidade de produzir e tolerar uma concentração elevada de ácido lático, permitindo a inibição de outros micro-organismos, favorecendo a competição com eles em um ecossistema.

Contrariamente Pehrson (2017), que referente ao uso das cultura lácticas, observaram que sobre as concentrações de coliformes, não foi possível verificar diferenças passíveis de interferência entre os tratamentos, uma vez que as amostras se mantiveram dentro dos parâmetros legais, provavelmente devido as condições da microbiota inicial. Mas quando se compara a ação dos fermentos lácticos em relação a microbiota inicial, se percebe a diminuição de bactérias da família *Enterobacteriaceae*.

Com isso se percebe a extrema importância de ser ter uma matéria prima de qualidade, com condições higiênico-sanitárias satisfatórias e conforme a legislação, com tratamento térmico adequado. Porém, a cadeia produtiva do leite possui uma complexidade singular que se inicia na produção primária, com

aquisição de insumos e equipamentos para produção, sendo o pasteurizador o principal equipamento responsável pelo tratamento térmico do leite usado para fabricação de queijos. Os custos da implantação do sistema de tratamento térmico, incluem o valor do próprio equipamento, manutenção, limpeza específica e, também, custos com energia elétrica, o que torna o processo ainda mais oneroso (LIMA, 2021)

Apesar de no Brasil, atualmente, haver legislação que regulamenta a produção e comercialização de queijos tradicionais feitos a partir de leite cru, esta não contempla os queijos minas frescal, pois não se trata de um produto que passa por período de maturação. Portanto, a utilização dos fermentos viabiliza a produção de queijos minas frescal biologicamente seguros para o consumo a custos menores para o pequeno produtor.

5.2 EXPERIMENTO 2: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Atentando para a importância socioeconômica na fabricação de queijos produzidos a partir de leite cru e levando em consideração a saúde pública, a utilização de bactérias ácido-láticas tem sido cada vez mais difundida no controle de micro-organismos indesejados como por exemplo *E. coli*.

A tabela 5 apresenta o resultado da diferença entre os tratamentos utilizando fermento com *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* em diferentes concentrações adicionados na formulação de queijos minas frescal, onde todos os tratamentos diferem significativamente entre si, ao longo do período de 8 (oito) dias de avaliação das amostras de queijos inoculadas com uma concentração de 10^{-6} de *E. coli*.

TABELA 5. Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de fermento lácteo (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) para controle de *E. coli* em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C.

| TRATAMENTOS | UFC/g |
|-----------------|---------------------|
| Controle | 79,11 ^{a*} |
| Ferm. a 1% | 64,64 ^{b*} |
| Ferm. a 1.5% | 62,02 ^{c*} |
| Ferm. a 2% | 51,22 ^{d*} |
| DMS (5%) | 1,12 |
| CV (%) | 1,79 |

*Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). UFC/g = Unidade formadora de colônias por grama da amostra; DMS = Diferença mínima significativa; CV = Coeficiente de Variação; Ferm. = Fermento

Os dados encontrados estão de acordo com Assis (2010), em sua pesquisa sobre o efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis* isolados de queijo coalho na viabilidade e produção de enterotoxinas tipo B por *Staphylococcus aureus* FRI S-6 em queijo, concluindo que, o uso de bactérias inibidoras do crescimento de enteropatógenos, é uma solução pertinente para a produção de queijos produzidos a partir de leite cru, uma vez que esses probióticos, além de reduzirem o crescimento desses patógenos, promovem efeitos benéficos para a saúde do consumidor, já que o consumo de queijos fabricados a partir de leite cru, é uma realidade no Brasil.

Assim como no experimento anterior, os tratamentos utilizando fermento com *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* em diferentes concentrações, indicam redução no crescimento de *E. coli*, o que pode ser verificado na tabela 6.

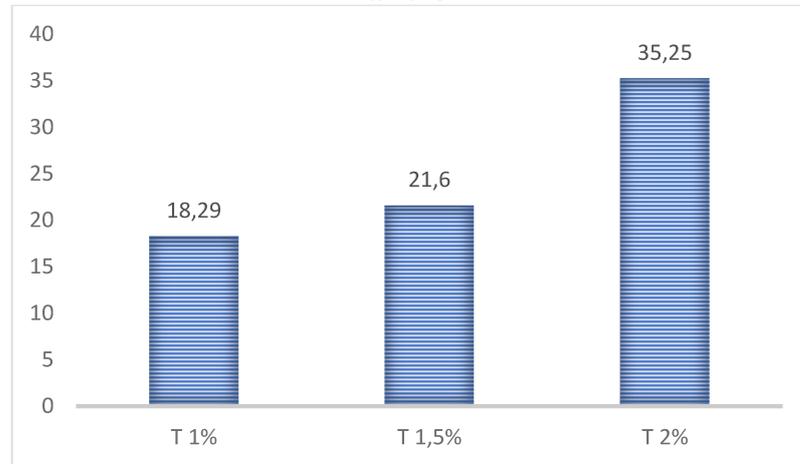
TABELA 6. Determinação da contagem d UFC/g de *E. coli* em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermento lácteo *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* armazenado por 8 dias a 10°C.

| DIAS | TRATAMENTOS (UFC/g)* | | | |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | CONTROLE | FERM. 1% | FERM. 1,5% | FERM. 2% |
| 0 | 7,94 x 10 ⁶ | 6,38 x 10 ⁶ | 6,16 x 10 ⁶ | 5,16 x 10 ⁶ |
| 2 | 7,95 x 10 ⁶ | 6,37 x 10 ⁶ | 6,21 x 10 ⁶ | 5,14 x 10 ⁶ |
| 4 | 7,88 x 10 ⁶ | 6,60 x 10 ⁶ | 6,20 x 10 ⁶ | 5,13 x 10 ⁶ |
| 6 | 7,96 x 10 ⁶ | 6,47 x 10 ⁶ | 6,10 x 10 ⁶ | 5,08 x 10 ⁶ |
| 8 | 7,82 x 10 ⁶ | 6,50 x 10 ⁶ | 6,17 x 10 ⁶ | 5,07 x 10 ⁶ |

UFC/g= Unidade formadora de colônia por grama; Ferm.= Fermento

O tratamento com concentração de fermento lácteo a 2% apresentou uma redução de 35,25% em relação ao controle ao longo do período de armazenamento por 08 (oito) dias, enquanto a concentração de fermento de 1% apresentou uma redução de *E. coli* de 18,29% em relação ao controle, assim como a concentração de 1,5% de fermento, que apresentou uma redução de 21,60% no controle do mesmo micro-organismo como pode ser visto na Figura 6.

FIGURA 6. Distribuição percentual de redução do crescimento de *E. coli* em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de fermentos lácteo (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*) por um período de 8 dias a 10°C.



T1% = Fermento a 1% T1,5% = Fermento a 1,5% T2% = Fermento a 2%

A produção de leite no Brasil é regida pelas Instruções Normativas nº 76 e 77 de 26 de Novembro de 2018 do MAPA (BRASIL, 2018) que recomendam para elaboração de derivados, apenas a utilização de leite pasteurizado. Além disso, há outras recomendações como, por exemplo, a manutenção do resfriamento a 4 °C e a proibição da adição de outras substâncias que não sejam inerentes ao leite.

No entanto o uso do pasteurizador deve estar aliado as boas práticas e as condições higiênico-sanitárias, Lopes *et al* (2018), ao analisar a eficiência e monitoramento da pasteurização do leite em indústria de laticínios na região de Rondônia verificaram que 75% das amostras apresentaram-se acima do permitido para mesófilos, pois sua presença no leite está diretamente ligada as falhas de higiene durante as etapas de processamento.

Afirmar que um alimento é seguro significa dizer que ele não oferece risco à saúde do consumidor, ou seja, é um produto fabricado com os cuidados higiênico-sanitários necessários, livre de qualquer perigo físico, químico ou biológico (RESENDE, 2014).

Uma das principais causas de contaminação de alimentos é a manipulação inadequada, tanto da matéria-prima quanto dos utensílios de trabalho, devido a uma higienização deficiente dos equipamentos e pessoal, como higienização incorreta das mãos, conversar ou tossir durante o preparo dos alimentos, e a não utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPI), como toucas, aventais, máscaras e luvas (SILVA, 2015).

Para que os queijos produzidos com leite cru sejam considerados seguros é necessário que o leite seja originário de um rebanho sadio, que a água destinada

à produção do queijo seja de qualidade e o processamento e estocagem sejam feitos de maneira higiênica, a fim de cumprir os parâmetros microbiológicos recomendados (RESENDE, 2014; DINIZ, 2013).

Já o fermento lácteo, utilizado na fabricação do queijo acelera o processo de coagulação do leite e contribui para o desenvolvimento das características sensoriais do queijo, como o sabor, aroma e textura. Porém, uma das principais funções do ácido e de outros metabólitos produzidos com a fermentação é a atividade antimicrobiana e a conservação dos alimentos (RAFAEL, 2017; ANDRADE, 2009).

Esses parâmetros, bem como a utilização dos fermentos lácteos prezam pela saúde do consumidor e a idoneidade da comercialização na cadeia produtiva, tendo em vista a importância da cadeia agroindustrial do leite no Estado do Maranhão. Do ponto de vista, tanto econômica quanto a social o estudo da viabilidade de alternativas para produção de derivados do leite seguros se torna indispensável para sobrevivência de pequenos produtores (BARROS, 2014).

Na Ilha de São Luís - MA, as propriedades leiteiras ainda são classificadas como pequenas propriedades, sem assistência técnica veterinária e fornecem leite a pequenos laticínios, para a fabricação de iogurtes e queijos, ao setor de panificação, comercializam informalmente aos consumidores de “porta em porta” ou comercializam na própria propriedade. Essas características de produção, a forma de comercialização e a cultura do consumo desse tipo de leite podem favorecer o aparecimento de zoonoses, tais como a brucelose, ainda podem ser veiculadores de DTHA's, e expor a população ao risco de contaminações físicas, químicas, com as possíveis fraudes existentes, o que vem a ser um sério problema de saúde pública (BARROS, 2014).

5.3 EXPERIMENTO 3: FABRICAÇÃO DE QUEIJO MINAS FRESCAL COM UTILIZAÇÃO DE FERMENTO (TIPO 1) *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* 1,5% + FERMENTO (TIPO 2) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%

Os fermentos lácteos desempenham muitas funções na fabricação e maturação do queijo, atuando favoravelmente, sendo utilizadas em diversos tipos de queijos, sendo uma tecnologia viável (FURTADO, 1995).

Neste experimento foi utilizado os fermentos em destaque no experimento 1, *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* com concentração a 1,5%, adicionado do fermento em destaque do experimento 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremosis* 2%.

Na tabela 7 pode ser verificado o resultado das diferenças entre os tratamentos utilizando a cultura mista em diferentes concentrações adicionados na fabricação do queijo minas frescal, onde observa-se a diferença significativa entre os tratamentos, sendo que o tratamento com fermento com concentração de 1% e 1,5% não diferiram entre si significativamente ao longo dos dias de avaliação. Com destaque para o tratamento com concentração a 2% de cultura mista, que houve um decréscimo maior, na contagem de *E. coli* em relação ao controle, que os outros tratamentos, apresentando um percentual de 31,72% de redução.

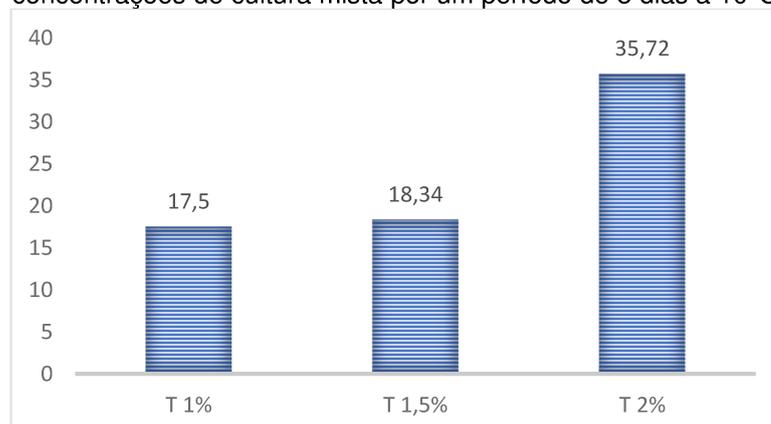
TABELA 7. Comparação de médias dos tratamentos em diferentes concentrações de cultura mista (TIPO 1 *Lactobacillus casei* subsp. *rahamnosus* 1,5% + FERMENTO TIPO 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%) para controle de *E. coli* em queijos minas frescal produzido a partir de leite cru armazenado por 8 dias a 10°C.

| TRATAMENTOS | UFC/g |
|-----------------|---------------------|
| Controle | 85,91 ^{a*} |
| Ferm. a 1% | 70,87 ^{b*} |
| Ferm. a 1,5% | 70,15 ^{b*} |
| Ferm. a 2% | 58,66 ^{c*} |
| DMS (5%) | 1,03 |
| CV (%) | 1,52 |

*Médias seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). UFC/g = Unidade formadora de colônias por grama da amostra; DMS = Diferença mínima significativa; CV = Coeficiente de Variação; Ferm. = Fermento

Para comparar a redução de contagem de *E. coli* entre os tratamentos neste experimento, a figura 7 mostra a redução para o tratamento com concentração de 1% de cultura mista de 17,5%, para o tratamento com concentração de 1,5% de fermento uma redução de 18,34%, e em destaque a concentração de fermento com cultura mista de 2%, com uma redução de 35,72%.

FIGURA 7. Distribuição percentual de redução do crescimento de *E. coli* em relação a amostra controle de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de cultura mista por um período de 8 dias a 10°C.



T1% = Fermento a 1% T1,5% = Fermento a 1,5% T2% = Fermento a 2%

Esses valores relativos a redução da contagem de *E.coli*, podem estar relacionados com a redução do pH, uma vez que os fermentos lácteos produzem ácido lático e outros ácidos orgânicos resultantes do seu metabolismo, não favorecendo o desenvolvimento deste patógeno por completo. Assim como na presente avaliação, esse fato é observado também em outros tipos de queijos como demonstrado por Pereira (2017), que utilizaram a cultura mista de fermentos lácteos como probióticos em queijo, uma vez que os fermentos lácteos também fornecem efeitos metabólicos ou fisiológicos, úteis na manutenção de uma nutrição saudável.

Em relação ao controle de micro-organismos indicadores de contaminação Pereira (2017), encontrou em sua pesquisa, a presença de coliformes totais em todos os tipos de queijos estudados, no primeiro dia de análise. Porém os valores foram diminuindo ao longo dos dias em temperaturas de refrigeração, o que atribui possivelmente ao uso de culturas lácteas mistas utilizadas processo de fabricação do queijo. Assim como o Buriti *et al*, (2007), relataram a inibição de contaminantes em queijos fresco cremoso na presença de cultura mista com *Lactobacillus paracasei* associado a *Streptococcus thermophilus*.

Na tabela 8 é apresentado resultado dos diversos tratamentos com diferentes concentrações da cultura mista de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1,5% associado a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%, que indicam redução no crescimento de *E. coli*, armazenados por 8 dias em temperatura de refrigeração, onde também pode ser observado o decréscimo no número de contagem de UFC/g de *E.coli* ao longo dos dias para os tratamentos com a utilização da cultura mista.

TABELA 8. Determinação da contagem d UFC/g de *E. coli* em amostras de queijos minas frescal produzido a partir de leite cru em diferentes concentrações de cultura mista (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* 1,5% + *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%) armazenado por 8 dias a 10°C.

| DIAS | TRATAMENTOS (UFC/g)* | | | |
|------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | CONTROLE | FERM. 1% | FERM. 1,5% | FERM. 2% |
| 0 | 8,74 x 10 ⁶ | 7,14 x 10 ⁶ | 7,09 x 10 ⁶ | 5,90 x 10 ⁶ |
| 2 | 8,43 x 10 ⁶ | 7,04 x 10 ⁶ | 6,98 x 10 ⁶ | 5,88 x 10 ⁶ |
| 4 | 8,34 x 10 ⁶ | 7,01 x 10 ⁶ | 7,04 x 10 ⁶ | 5,88 x 10 ⁶ |
| 6 | 8,92 x 10 ⁶ | 7,07 x 10 ⁶ | 6,99 x 10 ⁶ | 5,86 x 10 ⁶ |
| 8 | 8,51 x 10 ⁶ | 7,06 x 10 ⁶ | 6,96 x 10 ⁶ | 5,77 x 10 ⁶ |

UFC/g= Unidade formadora de colônia por grama; Ferm.= Fermento

De um modo geral, observou-se que nos três experimentos as amostras de queijos adicionadas de fermento lácteo houve redução do crescimento de *E.coli*, com destaque para tratamentos com uso de fermento *Lactobacillus casei* subsp.

rhamnosus a 1,5% e fermento *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a 2%, que apresentaram diminuição de UFC/g da amostra, aproximadamente 50% e 35%, respectivamente. Quanto ao uso da cultura mista quando comparados com o controle, observa-se a manutenção dos valores de contagem de UFC/g de *E. coli*, apresentando dentro da média, sem diferença significativa em relação ao uso de cultura simples.

Normalmente as culturas lácticas utilizadas para a fabricação de queijos e outros derivados do leite são adquiridas comercialmente. Porém estas são idênticas para todos os que as utilizam, resultando em produtos parecidos. Contudo existem micro-organismos que habitam a matéria-prima naturalmente, e que podem ser isolados e utilizados como cultura starter, o que viabiliza a elaboração de produtos com características diferenciadas (MANGIA, 2013).

O que demonstra Speranza (2015), onde foram selecionadas cepas autóctones do queijo, para o desenvolvimento de uma cultura *starter* apropriada para este produto. Isolaram duas cepas de *Lactobacillus* (*plantarum* e *casei*), além de cepas de *Pediococcus acidilactici* e *S. thermophilus*. E após vários testes individuais, também foram testadas, combinações destas cepas. Onde apresentaram acidificação quando inoculadas em leite a 30 °C, atingindo pH entre 4,53 e 4,69. Tendo como desfecho, que a combinação das culturas que foram isoladas, ou seja, culturas mistas, no estudo são alternativas promissoras para a utilização como *starters* na fabricação do queijo.

Em sua pesquisa de Desenvolvimento de tecnologia de queijo tipo Minas artesanal da microrregião do Campo das Vertentes para produção industrial com emprego de leite pasteurizado, Evangelista (2018), encontrou resultados divergentes deste trabalho, sendo que o emprego de leite pasteurizado e de culturas lácteas mistas não influenciou no perfil de textura dos queijos industriais, em relação aos artesanais ($p > 0,05$). Da mesma forma, o perfil microbiológico, analisado aos 2 e 60 dias de maturação apresentou contagens de coliformes a 30 °C, coliformes a 45 °C, abaixo dos limites estabelecidos pela legislação vigente, não apresentando diferenças entre tratamentos.

Dito isso, esses resultados podem estar associados a qualidade da matéria-prima, microbiota inicial, o uso de leite pasteurizado e o uso de culturas lácteas mistas. Uma vez que os aspectos envolvendo a cadeia produtiva do leite, a qualidade é um ponto de extrema importância devido a fatores como a garantia de

alimento seguro e de qualidade nutricional para o consumidor, aumento da vida de prateleira e rendimento de derivados lácteos (DIAS, 2016).

Com o uso dos fermentos lácteos, como uma ferramenta que agrega qualidade ao leite, no presente estudo destacou-se a sua ação positiva dos em ambos experimentos na concentração de 1,5 e 2% de distintas culturas lácteas no controle de *E.coli* que, embora não tenha reduzido a contaminação a níveis aceitáveis para consumo do produto, mostrou a capacidade de diminuição do crescimento do microorganismo, podendo ser potencialmente eficiente aliado as boas práticas de obtenção da matéria prima e processamento dos derivados lácteos. Seguindo do experimento 3 que utilizou a cultura mista proposta neste trabalho, que apresentou melhores resultados na concentração de 2% em relação ao controle.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que, quando adicionados de fermentos lácteos, os queijos minas frescal apresentam uma diminuição significativa do crescimento de *E. coli*, indicando que os fermentos lácteos são eficientes no controle desse micro-organismo em queijo.

O fermento *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* a 1,5% mostrou-se ser mais eficiente a no controle de *E. coli* nas amostras de queijos minas frescal, com uma redução de 49,48% de UFC/g da amostra em relação ao controle, que para o experimento 2 com o fermento *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a 2%, que apresentou redução de 35,25% UFC/g da amostra em relação ao controle. Para o experimento com a cultura mista de *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* 1,5% associado *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 2%, a concentração onde houve maior redução na contagem de *E.coli* nas amostras de queijo, foi a concentração de 2% com uma redução de 31,71% em relação a amostra controle.

Diante disto, o uso de fermentos lácteos para a produção de queijos minas frescal utilizando leite cru, é recomendável, visto que reduzem o crescimento de patógenos, confere melhora no rendimento, textura e aroma, bem como a obtenção de um produto com uma melhor qualidade, embora não seja permitido pela legislação, o uso de leite cru para consumo e a produção de derivados.

REFERÊNCIAS

- ALM, L.; ROBINSON, R. K., **The therapeutic effects of various cultures an overview**: Therapeutic properties of fermented milks London ed. Elsevier, 1991. p.45-64
- AMARANTE, J. O. **Queijos do Brasil e do mundo: para iniciantes e apreciadores** – São Paulo : Mescla, 2015.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of dairy products**. Washington DC: APHA, 1984. p.265-288.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3. ed. Washington DC: APHA, 1992. p.1219.
- ANDRADE, C. R. Diagnóstico da qualidade microbiológica de queijo Serra da Canastra e caracterização de bactérias do gênero *Enterococcus*. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009. Dissertação de Mestrado. 112 p.
- AQUARONE, E., **Biotecnologia agroindustrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.4.
- ASSIS, B.S. Efeito de *Lactobacillus rhamnosus* e de *Lactococcus lactis* isolados de queijo de coalho na viabilidade e produção de enterotoxina b por *Saphylococcus aureus* fri-s6 em queijo. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, 2010 Dissertação de mestrado 55p.
- BARNARD, S. E., Correcting coliform problems of pasteurized milk. **Dairy Food Sanit.**, Ames, I (1): 16-17, 1981.
- BARROS, H. O. V. Avaliação da qualidade do leite cru clandestino comercializado na Ilha de São Luís – MA. Mestrado profissional Defesa Sanitária Animal, Universidade Estadual do Maranhão. Dissertação Mestrado, 2014 49p.
- BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**. São Paulo: Nobel. 1999. 320p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Boletim epidemiológico**. Vol. 51, Nº 31 – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, Agosto, 2020 .
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **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. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Integrado de Vigilância, Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. Brasília. 2010. Disponível em <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf>. Acesso em 10 Fevereiro 2022.

BRASIL, 2004. Instrução Normativa N° 4, de 1 de março de 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2020/12/IN-04-2004-MAPA.pdf>>. Acesso em: 5 Setembro 2021.

BRASIL, 1997. Portaria N° 352, de 4 de Setembro de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=08/09/1997&jornal=1&pagina=36&totalArquivos=160>>. Acesso em: 5 Setembro 2021.

BRASIL, 2018. Instrução Normativa N° 76, de 26 de Novembro de 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em: 5 Janeiro 2022

BRASIL, 2018. Instrução Normativa N° 77, de 26 de Novembro de 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/52750137/do1-2018-11-30-instrucao-normativa-n-76-de-26-de-novembro-de-2018-52749894IN%2076>. Acesso em: 5 Janeiro 2022

BRASIL, 2017. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos/decreto-n-9013-2017_alt-decreto-9069-2017_pt.pdf/view>. Acesso em: 20 Dezembro 2021.

BRASIL, 2019. Instrução Normativa N° 60, de 23 de Dezembro de 2019. Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356f>>. Acesso em: 5 Setembro 2021.

BRITO, M. C. Efeitos da utilização de enzimas fosfolipase na fabricação de queijos minas frescal. Programa de Pós- graduação em Ciência e tecnologia do Leite e Derivados, Universidade Federal de Juiz de Fora, 2019, 76p.

BOAS, A. F. V.; BELPIEDE, E. L. S.; SILVA, N. R. F.; SILVA, M. F.; VEIGA, S. M. O. M.; Qualidade microbiológica dos queijos minas frescal artesanais e industrializados. Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 10, p. 83536-83552, oct. 2020. ISSN 2525-8761 DOI:10.34117/bjdv6n10-696 Disponível em:

<<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/19118>> Acesso em 10 Fevereiro 2022.

BORELLI, B. M.; ANTONIO, M. B.; Importancia das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos minas artesanais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 75, n. 3, p. 204-221 jul/set, 2020

BUFFA, M.; TRUJILLO, A. J.; PAVIA, M.; GUAMIS, B. Changes in textural, microstructural, and colour characteristics during ripening of cheeses made from raw, pasteurized or highpressure-treated goat's milk. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 927–934, 2001.

CARDOSO, R. B.; PEDREIRA, M. S.; RECH, C. L. S.; SILVA, H. G. O. ; RECH, J. L.; SCHIO, A. R.; AGUIAR, L. V.; SILVA, A. S.; SILVA, H. A. Produção e composição química do leite de vacas em lactação mantidas a pasto submetidas à diferentes sistemas alimentares. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.18, n.1, p.113-126 jan./mar., 2017 ISSN 1519 9940. Disponível em: <<http://mc04.manuscriptcentral.com/rbspa-scielo>> e <<http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402017000100011> >

CALDORIN, M.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; PERESI, J. T. M. & ALVES, E. C. A.. Ocorrência de *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga (STEC) no Brasil e sua importância em saúde pública. **Boletim Epidemiológico Paulista**, 10, 4-20. 2013.

CAMARGO, A. C. B.; JACINTO, I. P.; PAIVA, J. L.; PAULA, J. M.; FAÇÃO, L. R.; ALVES, L. G. K. Qualidade microbiológica do queijo tipo minas “frescal” comercializado na cidade de Fernandópolis-SP, **The Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 4, p. 10370-10382. jul./ago. 2020. ISSN 2595-6825.

CHIODA, T. P.; SCHOCKEN, R. P.; GARCIA, G. R.; PIGATTO, C. P.; RIBEIRO, C. A. M.; RAGAZZANI, A. V. F., Inibição do crescimento de *Escherichia coli* isolada de queijo minas frescal por *Lactobacillus acidophilus*. **Ciência Rural**. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), v. 37, n.2, p. 583-585, 2017.

CNA - CONFEDERAÇÃO DE AGRICULTURA E PECUARIA DO BRASIL. Comunicado técnico. Pesquisa pecuária municipal 2020. 30 ed. Outubro 2021. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/assets/arquivos/boletins/Comunicado-Tecnico-CNA-ed-30_2021.pdf> . Acesso em: 02 Fevereiro 2022.

DINIZ, M. F. S. Queijo Canastra: Um estudo envolvendo aspectos culturais e parâmetros de inocuidade do alimento. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – USP, 2013. Dissertação de mestrado 160p.

DRUMOND, S. N.; SANTIAGO, A. F.; MOREIRA, M.; LANNA, M. C. S.; ROESER, H.M.P., Roeser Molecular identification of diarrheagenic *Escherichia coli* in the watershed of Xopotó River, in Alto do Rio Doce, Brazil. **Engenharia Sanitária e Ambiental** v.23, n.3 maio/jun 2018 579-590. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1413-41522018165696> >

DORES, M. T.; DIAS, R. S.; ARCURI, E. F.; NOBREGA, J. E.; FERREIRA, C. L. L. F. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus aureus* isolated from artisan Minas cheese from the Serra da Canastra, MG, Brazil. **Food Science and Technology**, v.33, n.2, p.271-275, 2013.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Gado de leite Anuario leite 2021, Saúde única e total. Embrapa: Gado de leite. São Paulo, 2021.
Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1132875/anuario-leite-2021-saude-unica-e-total>> Acesso em: 02 Fevereiro 2022.

EPAMIG – EMPRESA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Os queijos na fazenda**. 3 ed. São Paulo; Globo 1989.

EVANGELISTA-BARRETO, N.S.; SANTOS, G.C.F.; SOUZA, J.S.; BERNARDES, F.S.; SILVA, I.P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal (v.10, n.1) p. 55 – 67, jan - març (2016) Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20160006>

FERREIRA, A.P.D.; Produção, qualidade físico-química e microbiológica de leite pasteurizado comercializado no Brasil – Uma revisão 64 f. Trabalho de conclusão de curso – Curso Zootecnia. Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2020.

FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz. **A saúde no Brasil em 2030: prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro: população e perfil sanitário**. volume 2 / Fundação Oswaldo Cruz... [et al,] – Rio de Janeiro : Fiocruz/Ipea/ Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2013. 176 p., : il. ; tab. ; graf. ; mapas ISBN: 978-85-8110-003-6 FIB.; Food Ingredients Brasil (FIB). 2011. Microorganismos causadores de doenças de origem alimentar. N° 19, 51-59. Disponível em: <https://revista-fi.com.br/upload_arquivos/201606/2016060538412001465235849.pdf>

FONSECA, G.F.; HELENA, A.A.S.; MANGIAVACCHI, B.M.; NORBERG, P.R.B.M.; NORBERG, A.N. Ocorrência de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em queijos minas frescal artesanais produzidos na zona rural da baixada fluminense, estado do Rio de Janeiro. V Expociência. Publicado em 28/11/2020 - ISSN 2526-4036 Faculdade Metropolitana de São Carlos – FAMESC 2020.

FURTADO, M. M. **A arte e a ciência do queijo**. São Paulo: Globo, 1991. 297 p.

FURTADO, M. M. **Principais problemas dos queijos**. São Paulo: Setembro Editora, 2017. 256 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Ateneu, 2008. 182p.

- FREIRE, T. T.; SILVA, A. L. T e.; FERREIRA, B. K. O.; SANTOS, T. M dos. Bactérias lácticas suas características e importância: revisão. Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento, [S. l.], v. 10, n. 11, pág. e513101119964, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i11.19964. Disponível em:< <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/19964>>. Acesso em: 15 fev. 2022.
- GONZÁLES, F. H. D.; COMPOS, R. Indicadores metabólicos-nutricionais do leite. **Anais** do II Simpósio de patologia clínica veterinária da região sul do Brasil. Porto Alegre. Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005. P 31 – 47.
- GOURSAUD, J. **O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas**. Publicações Europa-America Lda, 1985, v.1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.
- JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 6 ed., 712p.
- LAVEN, R. A.; ASHMORE, A.; STEWART, C. S. Escherichia coli in the rumen and colon of slaughtercattle, with particular reference to E. coli O157. **Veterinary Journal**, v. 165, n. 1, p. 78-83, 2003.
- LIMA, C.F. Estudo do tempo de maturação do queijo minas artesanal do triângulo mineiro: análises microbiológicas e físico-químicas. Programa de Pós-graduação em engenharia de alimentos – UFU/MG, 2021. Dissertação de Mestrado 114p.
- LEITE, C. C.; GUIMARÃES, A. G.; ASSIS, P. N.; SILVA, M. D.; ANDRADE, C. S. O Qualidade bacteriológica do leite integral comercializado em Salvador – Bahia **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 3 (1):21-25, 2002.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1063–1067, 2001.
- LOPES, G. G.; VALIATTI, T. B.; ROMÃO, N. F.; MARSON, R. F.; SOBRAL, F.O.S., Análise da eficiência e monitoramento do processo de pasteurização do leite em indústria de laticínios na região de Rondônia. **South American journal of Basic Education, Technical and Tecnological**, v 5 n.2, 2018 p 5-19.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.6, p.1063-1067, 2001.
- MACEDO, E. R., FERNANDES, M. R., AMORIM, M. A., LIMA, T. L. & DE CARVALHO, L. R.. Epidemiological profile of acute diarrhea diseases notified in the municipal hospital of una-ba in the period from 2013 to 2014. **Estácio Saúde**, v. 7 (2), 25-30. 2018.
- MACEDO, R. E. F.; PFLANZER, S. B.; Avaliação microbiológica do leite pasteurizado, comercializado na região metropolitana de Curitiba, PR. **Higiene Alimentar**, v19 n 128 p. 103 –108, 2014.
- MANGIA, N. P. Suitability of selected autochthonous lactic acid bacteria cultures for Pecorino Sardo Dolce cheese manufacturing: influence on microbial composition, nutritional value and sensory attributes. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 4, p. 543-551, 2013.

MELO, E. S.; AMORIM, W. R.; PINHEIRO, R. E. E.; CORRÊA, P. G. N.; CARVALHO, S. M. R.; SANTOS, A. R. S. S.; BARROS, D. S.; OLIVEIRA, E. T. A .C.; MENDES, C. A.; SOUSA, F. V., Foodborne diseases and major bacterial agents involved in outbreaks in Brazil: review. **PUBVET- Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia** v.12, n.10, a191, p.1-9, Out., 2018 Disponível em: <<https://doi.org/10.31533/pubvet.v12n10a191.1-9>>

MENEZES, M. F. C.; SIMEONI, C. P.; ETCHEPARI, M. A.; HUERTA, K.; BORTOLUZZI, D. P.; MENEZES, C.G. **Revista eletrônica em gestão, educação e Tecnologia Ambiental REGET** -v. 18. Ed. Especial Mai. 2014, p. 76-89 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5902/2236117013033>> Acesso em 12 Janeiro 2022.

MONTANHINI, T. M.; HEIN, K. K., Qualidade do leite cru comercializado informalmente no município de Piraí do sul, estado do Paraná, Brasil **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 68, n. 393, p. 10-14, jul/ago., 2013.

NASCIMENTO, G. G. F.; MAESTRO, V.; CAMPOS, M. S. P.; Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em piracicaba - SP. **Revista de Nutrição, Pontifícia Universidade Católica., Campinas**, 14(2): 119-124, maio/ago., 2001.

OLIVEIRA, A. X.; DELFINO, N. de C.; NEVES, T. de B. S.; SILVA, M. H.; CAETANO, A. JESUS, N. M. SILVA, M. C. A. Enumeração de coliformes totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade de Salvador- Bahia. v. 21, n 150. *Revista Higiene Alimentar*, Ed. Especial, 2006 p. 235.

OLIVEIRA, K.A.M.; JARDIM D.M.; CHAVES, K.S.; OLIVEIRA, G.V.; VIDIGAL, M.C.T.R. Avaliação físico-química, microbiológica e sensorial de queijos minas frescal de leite de cabra desenvolvidos por acidificação direta e fermentação láctea. *Revista Institucional Cândido Tostes*, Juiz de Fora, v.71, n 3, p.166-178 jul/ set, 2016.

ORDOÑEZ, J. A. **tecnologia de alimentos – Origem animal**. ISBN:

9788536304311 Porto Alegre: Artmed, 2007 vol. 2 279p.

PEHRSON, M.E.S. Efeito da adição de culturas probióticas sobre aspectos microbiológicos e parâmetros fermentativos de queijo artesanal das Terras altas da Mantiqueira. Lorena, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial – USP, 2017. Dissertação de mestrado, 128p.

PIARD, J.-C.; HAUTEFORT, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, S.D.; FONS, M.; GRUSS, A. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.3068-3072, 1997.

RAFAEL, V. C. Fenótipos da microbiota predominante do fermento endógeno (pingo) relevantes para as características e segurança microbiológica do queijo Minas Artesanal da Serra da Canastra. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa, 2017 Tese de Doutorado 158p.

RESENDE, E. C. Aspectos sensoriais e microbiológicos do queijo Minas Artesanal da microrregião Campo das Vertentes. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014. Dissertação de mestrado 114p.

RIBEIRO, B. D.; PEREIRA, K.S.; NASCIMENTO, R. P.; COELHO, M. A. Z., **Microbiologia industrial**, vol 21. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2018.

RIBEIRO, E. C. B.; PEREIRA, C. A.; BEZERRA, M. D. A.; SAMPAIO, N. I. S.; CARVALHO, P. F. S. Sistema agroindustrial do leite no Maranhão: uma análise prototípica. *Revista de Economia e Sociologia Rural*, 60(4), e240762. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1806-9479.2021.240762>>. Acesso em: 02 Fevereiro 2022.

ROBINSON, R. K.; **The microbiology of milk products**. Zaragoza: vol 2 Acríbia, 1987, 122p.

RODRIGUES, E.; CASTAGNA, A. A.; DIAS, M. T.; ARONOVICH, M. Qualidade do leite e derivados: processos, processamento tecnológico e índices. Niterói: **Programa Rio Rural**, 2013.

ROSA, P. P.; ZANELA, M. B.; RIBEIRO, M. E. R.; FLUCK, A. C.; ANGELO, I. D. V.; FERREIRA, O. G. L.; COSTA, O. A. D.; PERES, P. F. Fatores etiológicos que afetam a qualidade do leite e o Leite Instável Não Ácido (LINA). *REDEVET Revista Eletrônica de Veterinária*, 2017 vol.18 n° 12 Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121217.html>> Acesso em: 03 Fevereiro 2022.

SANDOVAL, V.L. Qualidade do leite: sua influência no processamento, requisitos obrigatórios e sua importância para o produto final. *Revista gestão, tecnologia e ciências Fucamp – Centro Universitário Mário Plamério. GETEC*, v.10, n.28, p. 41-49 Monte Carmelo/MG 2021.

SALMINEN, S.; VON W.A.; MORELLI L.; MARTEAU P.; BRASSART D.; DE VOS W.M.; FONDÉN R.; SAXELIN M.; COLLINS K.; MOGENSEN G.; BIRKELAND S.E.; MATTILA-SANDHOLM T. Demonstration of safety of probiotics -- a review. **International Journal of Food Microbiology**. 1998 Oct 20;44(1-2):93-106. doi: 10.1016/s0168-1605(98)00128-7. PMID: 9849787.

SALMINEN, S. **Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects**. Edited. Atte von wright - 2th, 607p. 1998.

SERRANO, L. E. F.; Utilização de diferentes culturas lácteas na fabricação da mussarela de leite de búfala. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara, 2018. Dissertação de mestrado 66 p. SILVA, F.T. **Queijo minas frescal**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, 2005. 50 p.

SILVA, N. da.; SILVEIRA, N.F.A; JUNQUEIRA, V.C.A. **Manual de métodos de análise microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela. 1997. 295 p.

SILVA, L. M. Perfil microbiológico de queijo Minas frescal industrializado e artesanal comercializado em Goiânia, . Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde - Universidade Federal de Goiás, 2015. Dissertação de mestrado 82p.

SILVA, J. C. G., SILVA FILHO, M. M., NASCIMENTO, G. V., PEREIRA, D. A. B. & COSTA JÚNIOR, C. E. O. 2017. Incidência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no estado de Pernambuco, um acompanhamento dos dados epidemiológicos nos últimos anos. **Ciências Biológicas e de Saúde UNIT**, 3, 23-34.

SILVA, T. E.; Estudo do *Shelf Life* do queijo minas frescal artesanal e industrial. Instituto Federal De Educação, Ciência E Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde. 2015 Diretoria De Pesquisa E Pós-graduação Programa De Pós-graduação Em Zootecnia Disponível em: <https://sistemas.ifgoiano.edu.br/sq cursos/uploads/anexos_10/2017-06-14-11-38-27DISSERTA%C3%87%C3%83O%20THAMIRIS.pdf> Acesso em: 10 Janeiro 2022.

SILVA, F. T. **Queijo minas frescal**. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica (Coleção Agroindústria Familiar), 2016. 50 p.

SOUZA, I. A.; GIOVANNETTI, L. G. F.; SANTOS, S. O.; GANDRA, A.; RAMOS, L. S.; MARTINS, M. L.; BENEVENUTO, W. C. A. Ocorrência de *Escherichia coli* em queijo minas frescal comercializado na zona da mata mineira. **Anais: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Alimentação: a árvore que sustenta a vida**. Gramado – RS, 2016.

SOUZA, D. G.; SILVA, M.C.P.; MOURA, L.C.; DIAS, L.G.; PLÁCIDO, G.R.; CALIARI, M.; OLIVEIRA, K.B.; CÉLIA, J.A., Parâmetros físico-químicos e sensoriais de queijos frescos saborizados com pequi. **Global Science and Technology** ISSN 19843801, v. 10, n. 1, p. 105 - 111, JAN-ABR 2017.

SPERANZA, B. Selection of autochthonous strains as promising starter cultures for *Fior di Latte* , a traditional cheese of southern Italy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 95, n. 1, p. 88–97, 2015.

TONINI, C. B. Avaliação da qualidade do leite e caracterização de laticínio do Estado do Espírito Santo, Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos do centro de ciências agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo. Dissertação de Mestrado, 123 p.

TOZZO, K.; GUIMARAES, I.M.; CAMARGO, C.A. Avaliação microbiológica de queijos coloniais da região de Cascavel – PR. **Higiene Alimentar**, v.29, n.244/245, p.149-154, 2015.

ULISSES, A.F.; PICCOLO, M.P.; RANGEL, O.J.P.; JÚNIOR, A.C.S.; JÚNIOR, J.A.M. Leite cru refrigerado: qualidade microbiológica, físico-química e detecção de resíduos de antibióticos. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 1, e48111123708, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i1.23708>

Usda Photo by Eric Erbe, digital colorization by Christopher Pooley, both of USDA, ARS, EMU. - ARS Image Gallery Image Number K11077-1 Eric Erbe, digital colorization by Christopher Pooley, both of Image Gallery Image Number K11077-1

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, DF **Compêndio para o exame microbiológico de alimentos** American Public Health Association. 3ª edição Washington, DC., 1992. 1219 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Food safety and foodborne illness. 2007. Disponível em: < <http://www.who.int> >. Acesso em: 10 Fevereiro 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007 – 2015a. Geneva, Switzerland. 2015. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/199350/1/9789241565165_eng.pdf?ua=1> Acesso em: 10 Fevereiro 2022