

DETERMINAÇÃO DE COLIFORMES E *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA EM QUEIJOS MINAS FRESCAL

DETERMINATION OF COLIFORMS AND COAGULASE POSITIVE *Staphylococcus* IN MINAS FRESCAL CHEESE

Eduardo da Silva Martins¹; Nadabya Elizabeth Ventura Reis²

¹Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Frutal – Brasil edusmartins@yahoo.com.br

²Universidade do Estado de Minas Gerais – UEMG – Frutal – Brasil nadabya@hotmail.com

Resumo

O queijo Minas Frescal possui grande susceptibilidade a contaminações por substâncias tóxicas micro-organismos patogênicos, que podem estar presentes no leite, ou que de alguma forma tenham sido veiculadas durante os processos de produção, armazenamento e distribuição. Diversos micro-organismos podem ser encontrados contaminando o queijo Minas Frescal, dentre eles destacam-se coliformes totais e termotolerantes e Staphylococcus. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de amostras de queijos Minas Frescal comercializados no município de Frutal/MG. No período de Setembro de 2010 a Junho de 2011, foram avaliadas 40 amostras coletadas em feiras e supermercados da cidade, por meio da determinação de coliformes totais e termotolerantes e de Staphylococcus coagulase positiva. Das 40 amostras avaliadas, 21 (52,5%) apresentaram-se fora dos padrões para contagem de coliformes termotolerantes e 18 (45,0%) para Staphylococcus coagulase positiva. No conjunto, 30 amostras (75,0%) estavam em impróprias para o consumo, por apresentar-se fora dos padrões em pelo menos uma das análises bacteriológicas. Os resultados demonstraram a necessidade de adoção de medidas para melhorar a qualidade dos queijos comercializados, bem como para garantir a saúde dos consumidores.

Palavras-chave: queijos minas frescal; coliformes; *Staphylococcus* coagulase positiva.

1 Introdução

No Brasil, existe a tradição do consumo de produtos artesanais por serem considerados, pela população, mais naturais e saborosos. A venda destes produtos é uma das principais fontes de renda de pequenos produtores que os comercializam diretamente ao consumidor. Dentre os produtos artesanais mais apreciados está o queijo, cuja fabricação, como a de outros alimentos, necessita seguir normas rigorosas de higiene. Além disso, a matéria-prima deve originar-se de animais em condições sanitárias adequadas. Falhas no controle de qualidade tanto da matéria prima,

quanto no seu beneficiamento e estocagem, podem resultar em um produto de má qualidade e em risco de infecções e intoxicações nos consumidores (ZAFFARI et al., 2007).

Os queijos frescos são muito populares e devido ao bom rendimento que proporcionam na fabricação, são comercializados a preços acessíveis a uma maior faixa da população (FURTADO, 1980; SENA et al.; ABREU, 2005).

Queijos artesanais podem conter micro-organismos de origens diversas (animal, ambiente, homem), que podem causar doenças, resultar em alterações físico-químicas no produto, influenciar na eficiência dos processos utilizados no seu beneficiamento e nas suas características sensoriais. A maioria dos micro-organismos presentes na matéria-prima pode ser eliminada através da pasteurização que, em condições artesanais, pode não ser efetiva. Por outro lado, queijos industriais também podem ter problemas relacionados à sua qualidade microbiológica, dependendo do processamento térmico utilizado e principalmente das condições de armazenamento. Assim, é fundamental que se tenha um acompanhamento da qualidade destes produtos, visando minimizar riscos potenciais aos consumidores (CÂMARA et al., 2002; OLIVAL et al., 2002).

O queijo Minas Frescal é caracterizado pela Portaria n °352 de 1997 pela Instrução Normativa n ° 04 de 2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) como “o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. É um queijo semi-gordo (25,0 a 44,9% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (maior que 55,0%), a ser consumido fresco” (BRASIL, 2004).

Por apresentar elevado teor de umidade, ser produto altamente perecível e passar por uma grande manipulação, o queijo Minas Frescal apresenta condições propícias para contaminação, sobrevivência e multiplicação bacteriana, sendo que muitas dessas bactérias podem ser patogênicas ou produzir metabólitos microbianos e causar intoxicações e/ou infecções alimentares nos seres humanos (CÂMARA et al., 2002). Este fato é agravado levando-se em consideração que boa parte dos queijos produzidos de forma artesanal são produzidos com leite não pasteurizado, o que proporciona maior chance de contaminação.

Inúmeras indústrias sob inspeção por órgãos competentes produzem o queijo minas frescal respeitando as normas vigentes, inclusive as de boas práticas de fabricação, buscando a obtenção de um produto compatível com o padrão de qualidade estabelecido. Por outro lado, a contaminação do leite pós-pasteurização, devido à incorretas condições de manufatura e armazenamento, contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final, mesmo nos queijos produzidos nas indústrias (ALMEIDA FILHO, 1999; PEREIRA et al., 1999).

As contaminações microbianas dos alimentos são indesejáveis e inclusive nocivas. Este aspecto é encarado com tal rigor que para se conhecer a existência de possíveis deficiências

higiênicas, as quais implicariam em contaminações alimentares, voltam-se as atenções para grupos de micro-organismos, desde aqueles considerados indicadores, como também para os patogênicos que encontram no alimento um meio propício para o desenvolvimento e até mesmo a liberação de substâncias tóxicas (FRANCO, ALMEIDA; 1992; SALOTTI et al., 2006).

Para avaliar a qualidade microbiológica de um alimento, podem ser usados microorganismos indicadores, bem como pode ser avaliada diretamente a presença de micro-organismos patogênicos, que encontram no alimento um meio propício para o desenvolvimento e até mesmo para a liberação de substâncias tóxicas (FRANCO; ALMEIDA, 1992, CATÃO; CEBALOS, 1991).

Um dos principais grupos de micro-organismos indicadores da qualidade microbiológica em alimentos é o dos coliformes, formado por bactérias de família Enterobacteriaceae, gram-negativas, não formadoras de endósporos e capazes de degradar a lactose com produção de gás a 35-37 °C (coliformes totais, que indicam deficiência na higiene de forma geral) ou a 44,0-45,5 °C (coliformes termotolerantes, que indicam contaminação do alimento por material de origem fecal) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Outro grupo de micro-organismo usado na avaliação de alimentos é o das *Staphylococcus* coagulase positivas, pela qual sua presença indica deficiências de higiene durante a manipulação, uma vez que o homem e os animais são os principais reservatórios desta espécie. No homem, a cavidade nasal é o seu principal habitat e, a partir deste foco, pode atingir, por exemplo, as mãos de quem manipula o alimento e, dessa forma, contaminá-lo (BISHOP; WHITE, 1986; FRANCO; LANDGRAF, 2008; KINTON et al., 1999).

As estafilococos coagulase positivas, especialmente *S. aureus*, tem ampla capacidade de multiplicação nos tecidos e de liberação de toxinas, podendo assim provocar toxiinfecções alimentares. As células de *S. aureus* são termolábeis, podendo ser eliminadas em processos que utilizam altas temperaturas. Por outro lado, suas toxinas são termoestáveis e portanto resistentes às temperaturas usualmente utilizadas no processamento de produtos lácteos (DE FREITAS; MAGALHÃES, 1990).

A análise microbiológica do queijo Minas Frescal constitui uma forma de verificar as suas condições de higiene, bem como de avaliar se o consumo desse alimento está apropriado ou não, estabelecendo assim uma análise do risco potencial para os consumidores (FORSYTHE, 2002; SALOTTI et al., 2006). Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a presença de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo do tipo Minas Frescal, comercializadas no município de Frutal/MG, visando estabelecer sua qualidade em relação aos micro-organismos avaliados.

2- Material e Métodos

Coleta e preparação das amostras

Entre Setembro de 2010 e Junho de 2011, foram coletadas 40 amostras de queijos Minas Frescal, comercializadas em supermercados e feiras, localizados no município de Frutal/MG. De cada local, foram adquiridas uma ou mais amostras, coletadas aleatoriamente. Foram realizadas diferentes visitas em cada estabelecimento.

As amostras foram transportadas em caixa de material isotérmico, contendo cubos de gelo, até o Laboratório de Microbiologia da Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), campus de Frutal, sendo mantidas sob baixa temperatura até o momento das análises microbiológicas, as quais foram realizadas no máximo em 2 horas. As embalagens foram desinfetadas com álcool etílico 70% antes de serem abertas.

Determinação de coliformes totais e termotolerantes

Para as análises bacteriológicas, 25 gramas da parte interna de cada amostra foram acondicionados em sacos plásticos esterilizados contendo 225 mL de água peptonada 0,1%. As amostras foram homogeneizadas e diluídas, em diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-3} .

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais, de cada diluição (10^{-1} a 10^{-3}), foram tomadas três porções de 1 mL cada e inoculadas, respectivamente, em três tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose, contendo um tubo de Durham invertido, obtendo-se três séries de três tubos. Foi utilizado um tubo controle do meio de cultura e outro controle do meio de cultura e diluente, os quais foram incubados em estufa a 35-37 ° C, por 24 - 48 horas.

Os subcultivos positivos foram semeados em tubos contendo 8 mL de Caldo Verde Brilhante Bile 2% com tubo de Durham invertido, incubando-os a 35 °C, durante 24 a 48 horas. A prova foi considerada positiva somente quando se verificava turvação do meio e produção de gás nos tubos de Durham, dentro de um período de incubação máximo de 48 horas. A determinação quantitativa foi realizada de acordo com a técnica do NMP, recomendada pela American Public Health Association (1992).

Uma alçada de cada cultura foi tomada dos tubos positivos de Caldo Verde Brilhante Bile 2% e transferida para tubos de Caldo *E. coli* (EC MERCK), contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 45,5 °C, em banho-maria, para determinação de coliformes termotolerantes. Após a incubação por 24 a 48 horas, foi realizada a leitura, e os tubos que apresentavam turvação do meio e produção de gás foram considerados positivos para bactérias do grupo.

Para cada diluição, o número de tubos positivos foi anotado e quantificado através da tabela do Número Mais Provável (NMP), determinando, assim, o NMP de bactérias coliformes termotolerantes por grama de queijo analisado.

Determinação de Staphylococcus coagulase positiva

Para a contagem de *Staphylococcus coagulase positiva*, foram selecionadas 3 diluições de cada amostra, em triplicata, das quais 0,1 mL foi semeado na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker, com o inóculo sendo espalhado com o auxílio da alça de Drigasky. As placas foram invertidas e incubadas a 35° C durante 48 h. Foram selecionadas as placas contendo entre 20 e 200 colônias para contagem.

Com as colônias típicas foram feitas as provas bioquímicas de catalase e coloração de Gram. Três colônias típicas de cada placa foram selecionadas e inoculadas em tubos contendo Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), os quais foram incubados a 37°C por 24 horas. A partir do subcultivo crescido em BHI, foram realizadas as provas bioquímicas de catalase e coagulase.

A prova de catalase foi feita pela adição, em uma lâmina de microscópio, de uma gota de peróxido de Hidrogênio a 3% em uma gota de BHI, sendo consideradas catalase positivas as amostras que apresentaram formação de bolhas.

A prova de coagulase foi feita, em tubo de ensaio, pela adição de 0,3 mL de plasma de coelho liofilizado (Coagu-plasma) em 0,3 mL do subcultivo em BHI. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram formação de coágulo. A detecção da coagulase funciona como um marcador para diferenciar cepas de *S. aureus* das demais espécies do gênero, sendo que sua presença caracteriza-se como uma identificação presuntiva de *S. aureus*, e é um forte indício, porém não conclusivo de que as cepas de *Staphylococcus coagulase positiva* sejam *S. aureus* (CASTRO et al., 2007).

3 Resultados

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de queijo Minas Frescal estão exibidos na tabela 1.

Com relação à contagem de coliformes termotolerantes, observou-se que 21 amostras (52,5%) estavam fora do padrão da legislação ($\leq 5.10^2$ NMP.g⁻¹). Quanto à presença de *Staphylococcus coagulase positiva*, 18 amostras (45,0%) estavam em desacordo com a legislação em relação à sua contagem, uma vez que o limite é $\leq 5.10^2$ UFC. g⁻¹.

No conjunto de amostras do presente trabalho, 30 (75,0%) estavam impróprias para o consumo, por apresentar-se fora dos padrões em pelo menos uma das análises bacteriológicas. Esse

resultado corrobora estudos de análises microbiológicas recentes, os quais relatam altos índices de amostras fora dos padrões estabelecidos pela legislação.

Tabela 1 - Determinação de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Staphylococcus aureus* coagulase positiva nas 40 amostras de queijo Minas Frescal avaliadas

Amostra	NMP.g ⁻¹ de Coliformes totais	NMP.g ⁻¹ de Coliformes termotolerantes	UFC.g ⁻¹ de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva
1	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
2	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	8,8.10 ⁴
3	>1,0.10 ⁴	9,3.10 ²	Ausente
4	>1,0.10 ⁴	3,6.10 ¹	Ausente
5	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
6	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
7	>1,0.10 ⁴	2,4.10 ³	Ausente
8	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
9	>1,0.10 ⁴	Ausente	Ausente
10	>1,0.10 ⁴	4,3.10 ²	1,7.10 ⁵
11	>1,0.10 ⁴	4,6.10 ³	Ausente
12	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
13	>1,0.10 ⁴	4,6.10 ³	1,6.10 ⁴
14	>1,0.10 ⁴	2,0.10 ²	1,72.10 ⁵
15	>1,0.10 ⁴	9,3.10 ²	3,12.10 ⁵
16	>1,0.10 ⁴	2,1.10 ³	2,96.10 ⁵
17	>1,0.10 ⁴	2,1.10 ²	3,5.10 ⁴
18	>1,0.10 ⁴	Ausente	3,8.10 ³
19	>1,0.10 ⁴	1,1.10 ⁴	2,54.10 ⁵
20	Ausente	Ausente	2,9.10 ²
21	Ausente	Ausente	Ausente
22	Ausente	Ausente	Ausente
23	Ausente	Ausente	Ausente
24	Ausente	Ausente	Ausente
25	>1,0.10 ⁴	Ausente	Ausente
26	>1,0.10 ⁴	Ausente	1,04.10 ⁴
27	>1,0.10 ⁴	Ausente	2,4.10 ⁴
28	>1,0.10 ⁴	3,6.10 ¹	2,1.10 ⁴
29	>1,0.10 ⁴	7,5.10 ²	3,1.10 ⁴
30	>1,0.10 ⁴	1,5.10 ²	Ausente
31	>1,0.10 ⁴	9,2.10 ¹	Ausente
32	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
33	9,3.10 ¹	>1,0.10 ⁴	Ausente
34	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
35	4,3.10 ²	>1,0.10 ⁴	4,7.10 ⁴
36	Ausente	Ausente	1,12.10 ⁵
37	>1,0.10 ⁴	3,6.10 ¹	1,52.10 ⁴
38	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	Ausente
39	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	1,12.10 ⁴
40	>1,0.10 ⁴	>1,0.10 ⁴	2,8.10 ³
Padrão	Não estabelecido	5,0.10²	5,0.10²

A contagem de coliformes totais, a 35 °C, não é exigida pela legislação sanitária vigente. No entanto, estes microorganismos geralmente são contaminantes ambientais, sendo que sua contagem elevada indica deficiência na qualidade higiênico-sanitária do produto. Utilizando o padrão para coliforme termotolerante como parâmetro ($\leq 5.10^2$ NMP.g⁻¹), nota-se que 80% das amostras (32) estariam acima deste valor. Esta elevada porcentagem de contaminação por coliformes totais é

idêntica à relatada por Brant, Fonseca e Silva (2007) em amostras de queijo produzidas na região do Serro/MG.

Assim como ocorreu no presente trabalho, na avaliação de amostras de queijos Minas frescal comercializadas em Frutal/MG, alguns autores também relatam altos índices de contaminação por coliformes termotolerantes (fecais) em amostras de queijo Minas Frescal, comercializadas em diversos municípios, de diferentes regiões do país.

Loguercio e Aleixo (2001), analisaram amostras comercializadas em Cuiabá/MT, produzidas artesanalmente, e observaram que 93,3% estavam em desacordo com a legislação.

Salotti et al. (2006) observaram que das 30 amostras de queijo artesanal 5 (16,6%) apresentaram-se dentro do padrão e 25 (83,3%) fora, enquanto que para o queijo inspecionado, 10 (33,3%) estavam dentro e 20 (66,7%) fora. Pode-se observar um número muito alto de amostras (45 ou 75%) que não se enquadram nos padrões permitidos pela Anvisa. Os autores ressaltaram que os coliformes fecais pertencem a um grupo de micro-organismos que tem *habitat* no trato intestinal do homem e outros animais, portanto sua presença neste alimento garante contato direto do produto com fezes, evidenciando assim o risco para a saúde dos consumidores, devido a alta patogenicidade do microrganismo.

Ainda de acordo com dados relatados por Salotti et al. (2006), Oliveira et al. (1998) analisaram 32 amostras de queijo minas frescal, inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal e observaram que 9,4% das amostras estavam fora do padrão permitido para o produto. Já Rodrigues et al. (1995), verificaram que 89,2% das amostras de queijo minas frescal comercializados em Viçosa (MG), apresentaram presença de coliformes fecais acima do limite permitido pela legislação. Os autores atribuíram este resultado ao fato da maioria das amostras serem provenientes de fabricação artesanal. Cruz et al. (1992) encontraram percentuais superiores, pois 98,1% das amostras de queijo minas frescal, por eles analisadas, apresentaram-se acima do padrão máximo estabelecido para coliformes fecais.

As bactérias do grupo coliforme são consideradas como uma dos principais agentes contaminantes em queijos, estando associados à sua deterioração, causando fermentações anormais e estufamento precoce dos produtos, além de intoxicações alimentares (OKURA et al., 2002). Por estes motivos, devem ser obedecidas as normas estabelecidas para fabricação, além de serem adotadas práticas higiênico-sanitárias, de forma a prevenir possível contaminação ou recontaminação do produto .

Assim como ocorreu nas amostras avaliadas no presente trabalho, alguns autores também relatam altos índices de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva em amostras de queijo Minas Frescal avaliadas. Rocha et al. (2006), relataram que seis em sete marcas de queijo-de-minas frescal, verificaram índices de contaminação por *S. aureus* acima do recomendado. Loguercio e

Aleixo (2001), ao pesquisarem queijo-de-minas frescal, encontraram 97% de amostras em desacordo com a legislação em relação à contagem deste micro-organismo.

Silva (1998), em trabalho semelhante, verificou que de 60 amostras de queijo minas frescal examinadas na cidade do Rio de Janeiro, 38,4% apresentaram contagem de *Staphylococcus aureus* superiores a 10^3 UFC/g, enquanto que Mandil et al. (1993) constataram que 67% das amostras do mesmo produto apresentaram contagens deste micro-organismo variando de 10^1 a 10^6 UFC/g. Valores superiores ao padrão aceitável para *Staphylococcus coagulase positiva* também foram encontrados por Wendpap e Rosa (1993) quando avaliaram a presença do agente no queijo minas frescal consumido em Cuiabá (MT) (SALOTTI et al., 2006).

Cerca de 20 a 60% da população pode ser portadora de *S. aureus* sem apresentar sintomas. O período de incubação médio da intoxicação estafilocócica é de 2 a 4 horas (30 minutos a 8 horas). Os sintomas são geralmente agudos e se caracterizam por náuseas e vômitos, cólicas abdominais e diarreia (GERMANO; GERMANO, 2001). Embora a *Staphylococcus aureus* tem sido envolvida em diversos casos de intoxicação alimentar em todo o mundo, o queijo Minas frescal desponta como um dos principais alimentos contendo essa bactéria patogênica (BANNERMAN, 2003; FERNANDES et al., 2006).

4. Conclusão

A análise microbiológica das amostras de queijos Minas Frescal comercializadas em Frutal/MG demonstrou que 75% delas encontravam-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação para os micro-organismos avaliados, o que reforça a necessidade de implantação de medidas de melhorias na sua produção e/ou comercialização, visando garantir sua qualidade e a saúde dos consumidores.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG – campus de Frutal) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Iniciação Científica concedida através do Programa de Apoio à Pesquisa (PAPq/UEMG/CNPq).

Abstract

The Minas Frescal cheese has greater susceptibility to contamination by toxic substances and pathogenic microorganisms that may be present in milk or in some way have been conveyed during the processes of production, storage and distribution. Several microorganisms can be found contaminating Frescal Minas cheese, among them total and thermo tolerant coli forms and Staphylococcus. This study aimed to assess the microbiological quality of Minas Frescal cheese samples marketed in Frutal/MG. In the period from September 2010 to June 2011, 40 samples collected at fairs and supermarkets in the

city were evaluated, through the determination of total and thermotolerant coliforms and coagulase positive *Staphylococcus*. Of the 40 samples tested, 21 (52.5%) were outside the standards for fecal coliform count and 18 (45.0%) for coagulase positive *Staphylococcus*. Altogether, 30 samples (75.0%) were unfit for consumption, for present outside the standards in at least one of the bacteriological analysis. The results demonstrated the need to adopt measures to improve the quality of the cheese sold as well as to ensure the health of consumers.

Keywords: Minas frescal cheese; coliforms; coagulase positive *Staphylococcus*.

Referências

ABREU, L. R. **Processamento do Leite e Tecnologia de Produtos Lácteos**. Lavras:UFLA/FAEPE, 2005.

ALMEIDA FILHO, E. S. **Características microbiológicas do queijo tipo minas frescal produzido artesanalmente e comercializado no Município de Poços de Caldas-MG**. 1999. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, Unesp.

APHA. American Public Health Association. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 3ed. Washington: APHA, p. 325-369, 1992.

BANNERMAN, T. L. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual Of Clinical Microbiology**. vol.1. 8 ed. Asm Press: Washington, p. 384-404, 2003.

BISHOP, J. R.; WHITE, C. H. Assessment of dairy product quality and potential shelf life: a review. **Journal of Food Protection**, v. 49, n. 9, p. 739-753, 1986.

BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo de minas artesanal do Serro MG. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1570-1574, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000600033>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 04 de 01/03/2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade em Queijo Minas Frescal – Alteração na “Classificação”**. Diário Oficial da União. 2004.

CÂMARA, S. A. V.; AMARAL, G. B.; MULLER, M. T.; SILVEIRA, K. C. S.; ALMEIDA, T. N.; MEDEIRO, C. F. Avaliação microbiológica de queijo tipo minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 32-36, 2002.

CASTRO, V. S.; NASCIMENTO, V. L. V.; DE OLIVEIRA, D. S. V.; SOARES, M. J. S.; DA SILVA, M. J. M. **Pesquisa de coliformes e *Staphylococcus coagulase positivo* em queijo Minas Frescal comercializado em Terezina – PI**. In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica. Anais. João Pessoa, 2007.

CATÃO, R. M. R.; CEBALLOS, B. S. O. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 281-287, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612001000300006>

DE FREITAS, M. A. Q.; MAGALHÃES, H. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus aureus* isolados de vacas com mastite. **Revista de Microbiologia**, v. 21, p. 315-319, 1990.

FERNANDES, A. M.; ANDREATTA, E.; OLIVEIRA, C. A. F. de. Ocorrência de bactérias patogênicas em queijos no Brasil: questão de Saúde Pública. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 144, p. 49-56, set. 2006.

FERREIRA, R. M.; SPINI, J. C. M.; CARRAZZA, L. G.; SANT’ANA, D. S.; OLIVEIRA, M. T.; ALVES, L. R.; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, n. 5, 2011.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

- FRANCO, R. M.; ALMEIDA, L. E. F. Avaliação microbiológica de queijo ralado, tipo parmesão, comercializado em Niterói, RJ. **Revista Higiene Alimentar**, v. 6, n. 21, p. 33- 6, 1992.
- FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- FURTADO, M. M. Queijo do Serro: tradição na história do povo mineiro. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 35, p. 33-36, 1980.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 629 p.
- KINTON, R.; CESERANI, V.; FOSKETT, D. **Enciclopédia de serviços de alimentação**. São Paulo: Varela, 1999. 703 p.
- LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. **Ciência Rural**, v. 31, p. 1063-1067, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782001000600024>
- MANDIL, A.; MORAIS, V. A. D.; PEREIRA, M. L.; FAGUNDES, J. M. S.; CARMO, L. S.; CORREIA, M. G.; CASTRO, E. P.; GOMES, M. J. V. M. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijos comercializados em Belo Horizonte, MG, no período de 1984 a 1991**. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Anais. Porto Alegre, 1993.
- OKURA, M. H., ARAUJO, P. F., JARDIM, F. B. B., SILVA, R. R., FINZER, J. R. D., FRANZÉ, S. J. Influência da atmosfera modificada sobre a qualidade do queijo Minas Frescal. **Revista Higiene Alimentar**, v. 20, n. 143, p. 84-91, 2006.
- OLIVAL, A. A., SPEXOTO, A. A., CAMPOS, S. F. D., FERREIRA, F., FONSECA, L. F. L., SANTOS, V. M., DIAS, A. R. Hábitos de consumo do leite informal, associados ao risco de transmissão de doenças, no município de Pirassununga-São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, p. 35-40, 2002.
- PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, 1999. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09351999000500005>
- ROCHA, J. S.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p.263-272, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352006000200016>
- SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006.
- SENA, M. J.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; MORAIS, C. F. A.; CORRÊA, E. S.; SOUZA, R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife-PE. **Revista Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 41-44, 2000.
- SILVA, C. A. M. **Avaliação da qualidade microbiológica de queijo minas frescal consumido na cidade do Rio de Janeiro**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17., 1998, Fortaleza. Anais. Fortaleza, 1998. p.134.
- WENDPAP, L. L.; ROSA, O. O. Presença de *Staphylococcus aureus* em queijo minas consumido no Município de Cuiabá, MT. **Revista Higiene Alimentar**, v. 7, n. 27, p. 23-29, 1993.
- ZAFFARI, C. B.; MELLO, J. F.; DA COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300040>