

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CAMPUS DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ÉVELLY VITÓRIA OLIVEIRA DE JESUS

QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO ADQUIRIDOS
EM FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE MACEIÓ-AL

Rio Largo - AL

2023

ÉVELLY VITÓRIA OLIVEIRA DE JESUS

**QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO ADQUIRIDOS
EM FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE MACEIÓ-AL**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Bacharel em
Zootecnia pela Universidade Federal de
Alagoas.**

**Orientadora: Profa. Dra. Yamina
Coentro Montaldo**

**Coorientadora: Paula Cibelly Vilela da
Silva**

Rio Largo - AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Campus de Engenharias e Ciências Agrárias
Bibliotecário Responsável: Erisson Rodrigues de Santana - CRB4 - 1512

J58q Jesus, Évelly Vitória Oliveira de.

Qualidade microbiológica de queijo coalho adquiridos em feira livre no município de Maceió - AL. / Évelly Vitória Oliveira de Jesus. – 2023.

30f.: il.

Orientador(a): Yamina Coentro Montaldo.

Coorientadora: Paula Cibelly Vilela da Silva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) – Graduação em Agronomia, Campus de Engenharias e Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas. Rio Largo, 2023.

Inclui bibliografia

1. *Salmonell spp.* 2. Coliformes. 3. Mesófilos totais. I. Título.

CDU: 637.3

FOLHA DE APROVAÇÃO

ÉVELLY VITÓRIA OLIVEIRA DE JESUS


QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJO COALHO ADQUIRIDOS EM FEIRA LIVRE NO MUNICÍPIO DE MACEIÓ-AL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao *Campus* de Engenharias e Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Alagoas como parte dos
requisitos para obtenção do título de bacharel em
Zootecnia.


Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yamina Coentro Montaldo

Resultado: Aprovada


Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 YAMINA COENTRO MONTALDO
Data: 04/08/2023 09:20:25-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a Yamina Coentro Montaldo (CECA/UFAL)
Orientadora

Documento assinado digitalmente
 PAULA CIBELLY VILELA DA SILVA
Data: 07/08/2023 08:41:06-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

MsC.. Paula Cibelly Vilela da Silva (Renorbio/UFAL)
Examinadora Externa

Documento assinado digitalmente
 TANIA MARTA CARVALHO DOS SANTOS
Data: 07/08/2023 11:40:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Tania Marta Carvalho dos Santos (CECA/UFAL)
Examinadora Interna

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos que me auxiliaram durante esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela oportunidade de concluir este trabalho. Agradeço também aos meus pais, meu irmão e minhas queridas avós Maria Vitória e Josefa Freire. Principalmente minha avó Vitória, hoje *in memoriam*, porém levo no coração e em meu nome, essa que me deu amor, carinho, incentivo para acabar essa caminhada e iniciar tantas outras. Sou grata, pelo estímulo desde que a pequena ideia de estar em uma universidade surgiu, pelo seu amor por mim, pelos dias de aconchego, te amarei hoje e sempre.

Agradeço aos meus pais por terem sido minha base mesmo durante os terremotos que assolaram nossas vidas. O mais sincero e querido obrigada à minha mãe pelo estímulo, pela alegria desde que soube da possibilidade de me ver estudar nesta universidade, por ser meu alicerce e ter batalhado para minha permanência no curso. Agradeço ao meu pai por se esforçar em conjunto com a minha mãe mesmo não entendendo a situação.

Meus mais sinceros agradecimentos também aos colegas de laboratório, o ar descontraído e as conversas divertidas deixaram o processo mais leve. Expresso enorme gratidão as minhas orientadoras professoras Yamina Montaldo, Paula Vilela e Tania Marta por me acompanharem e direcionarem minhas descobertas durante este projeto e mostrarem que reconhecer que precisar de ajuda é uma virtude.

Não podia deixar de demonstrar minha gratidão a Lívia, que foi minha companheira de curso e amiga durante tantas situações, obrigada por relevar minhas tolices. Sou grata também a Júlia, uma amiga de longa data desde o ensino médio, que me ajudou a lidar com as ideias de desistir do curso e por rir das minhas besteiras.

“Antes que houvesse dia, eu sou: e ninguém há que possa fazer escapar das minhas mãos: operando eu, quem impedirá?”

Isaías 43:13

“Se os teus olhos forem bons, todo o teu corpo terá luz.”

Mateus 6:22

RESUMO

Objetivou-se determinar aspectos relativos à qualidade higiênico-sanitário de amostras de queijo coalho comercializados em uma feira livre do bairro Tabuleiro dos Martins na cidade de Maceió-AL. Avaliou-se a presença de coliformes totais e termotolerantes, mesófilos totais, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*. As amostras foram submetidas a análise para determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais (35°C por 24 horas) e termotolerantes (45°C por 24 horas). Para detecção de *Salmonella*, foi feito o pré-enriquecimento com água peptonada a 1%, seguido pelo enriquecimento em selenito-cistina (SC) e caldo Tetracionato (TT). O isolamento foi feito em ágar Hektoen (HE) e ágar Salmonella-Shigella (SS). Para detecção dos mesófilos totais, foi utilizado a técnica das diluições em séries e plaqueamento em Agar Padrão Contagem (PCA), e incubação em 28°C. Todas as amostras apresentaram crescimento em diferentes níveis, na amostra um a presença de coliformes 35 °C foi de < 3 NMP/g, 3 NMP/g na amostra 2 e 21 NMP/G na amostra 3. No caso dos coliformes termotolerantes as amostras apresentaram crescimento de 21 NMP/g na amostra 1, 75 NMP/g na amostra 2 e de 43 NMP/g na amostra 3. Não foi detectada a presença de *Salmonella spp.* em nenhuma das amostras. Quanto aos mesófilos a média foi de $4,33 \times 10^9$, $4,34 \times 10^9$ e $4,36 \times 10^9$ UFC/g. As amostras de queijo avaliadas, se encontram dentro dos padrões recomendados pelos órgãos de regulação.

Palavras-chave: *Salmonella spp.*, coliformes, mesófilos totais.

ABSTRACT

The objective was to determine aspects related to the hygienic-sanitary quality of samples of coalho cheese sold in a street market in the Tabuleiro dos Martins neighborhood in the city of Maceió-AL. The presence of total and thermotolerant coliforms, total mesophiles, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. The samples were submitted to analysis to determine the most likely number (MPN) of total (35°C for 24 hours) and thermotolerant (45°C for 24 hours) coliforms. For *Salmonella* detection, pre-enrichment with 1% peptone water was performed, followed by enrichment in selenite-cystine (SC) and Tetrathionate broth (TT). Isolation was performed on Hektoen agar (HE) and Salmonella-Shigella agar (SS). For the detection of total mesophiles, the technique of serial dilutions and plating on Agar Standard Count (PCA) was used, and incubation at 28°C. All samples showed growth at different levels, in sample one the presence of coliforms at 35 °C was < 3 MPN/g, 3 MPN/g in sample 2 and 21 MPN/G in sample 3. In the case of thermotolerant coliforms, the samples showed growth of 21 MPN/g in sample 1, 75 MPN/g in sample 2 and 43 MPN/g in sample 3. The presence of *Salmonella* spp. in any of the samples. As for mesophiles, the average was 4.33×10^9 , 4.34×10^9 and 4.36×10^9 CFU/g. The evaluated cheese samples are within the standards recommended.

Keywords: *Salmonella* spp., coliforms, total mesophiles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Fluxograma de produção do queijo coalho.....	8
Figura 2- Amostras de queijos pesadas e separadas	13
Figura 3- Fluxograma das análises para determinação da quantidade de coliformes.....	14
Figura 4- Fluxograma das etapas de análises para detecção da presença de <i>Salmonella spp.</i> nas amostras de queijo adquiridas.....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padrão microbiológico para coliformes e <i>Salmonella sp.</i>	10
Tabela 2- Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes 35 °C e coliformes termotolerantes.....	17
Tabela 3- Ocorrência de <i>Salmonella spp.</i> em amostras de queijo coalho.....	18
Tabela 4- Quantificações de Unidades Formadoras de Colônias mesófilos por grama (UFC/g) de amostras de queijo coalho.....	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	7
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1	O leite e seus derivados: contaminações.....	9
2.1.1	Queijo Coalho.....	9
2.2	Micro-organismos Indicadores.....	10
2.2.1	Coliformes a 35°C e termotolerantes.....	10
2.2.2	<i>Salmonella spp.</i>	11
2.2.3	Mesófilos.....	12
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1	Local de investigação.....	13
3.2	Preparo das amostras.....	13
3.3	Análise das amostras.....	13
3.3.1	Determinação do NMP/g de coliformes.....	13
3.3.1.1	Teste confirmatório para coliformes 35 °C.....	14
3.3.1.2	Teste confirmativo para coliformes termotolerantes.....	15
3.3.2	Teste para <i>Salmonella spp.</i>	15
3.3.3	Micro-organismos Mesófilos.....	15
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1	Coliformes totais e termotolerantes.....	17
4.2	<i>Salmonella spp.</i>	19
4.3	Micro-organismos Mesófilos.....	19
5	CONCLUSÕES.....	21
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
	ANEXOS.....	25
	ANEXO A- Composição de soluções e meios de cultura.....	25

1 INTRODUÇÃO

Segundo Martinelli (2022), para a cultura nordestina o queijo coalho é fruto secular e que até os dias atuais representa um símbolo de tradição, persistência e bravura. Ao longo dos anos a produção deste queijo esteve vinculada à sobrevivência dos participantes do sistema produtivo e comercial, sendo responsável por manter o produtor, o vendedor e o comprador. Se mostrando como única ou principal fonte de renda para diversas famílias do agreste e sertão por ser produzido majoritariamente nessas regiões.

Quando um produto alimentício é comercializado sem a avaliação prévia da qualidade microbiológica, a presença de alguns micro-organismos pode não ser constatada. A ingestão desses agentes pode desencadear diversas patologias de diferentes gravidades, umas leves e autolimitantes e outras podem levar à morte (FERREIRA, 2017).

Os clientes que se submetem a comprar à alimentação fornecida por locais que não seguem os critérios de higiene e profilaxia determinados pela legislação ficam susceptíveis a patologias. Há a possibilidade de o leite ser um desses alimentos causadores de doenças, pois a contaminação pode ocorrer até o processamento e produção dos seus derivados, nesse caso especificamente o queijo coalho.

Então deve-se salientar, que alimentos não produzidos conforme as Boas Práticas de Fabricação, reguladas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contaminados por vários tipos de micro-organismos. As bactérias são consideradas as maiores agentes de contaminação alimentar. Estas contaminações podem causar doenças genericamente conhecidas como doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (ALVES, 2012).

A presença de um número elevado de micro-organismos nos alimentos representa um risco para vários indivíduos imunodeprimidos que, devido à baixa imunidade possuem maior probabilidade de óbito (SILVA, 2017). Geralmente, os agentes causadores de DTAs são a *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, fungos, componentes tóxicos de origem vegetal e produtos químicos. As contaminações do leite e consequentemente dos seus derivados podem ocorrer de maneiras distintas, por razão do armazenamento incorreto, falta de higienização dos alimentos, alimentos mal-cozidos e contaminações ocasionadas má manipulação durante o preparo dos alimentos.

A ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos causadores de DTAs está relacionada casos de intoxicações alimentares que além do desconforto intestinal causam desidratação piora da saúde nos indivíduos. Muitos desses alimentos são comercializados de forma errônea, então neste trabalho objetivou-se a avaliação da qualidade microbiológica do

queijo coalho necessária para verificar e quantificar a presença de coliformes 35°C e termotolerantes, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* e os mesófilos totais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O leite e seus derivados: contaminações

Quando as pessoas consomem leite e derivados que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento, como a pasteurização, ficam vulneráveis a uma ampla quantidade de micro-organismos e toxinas capazes de causar intoxicações alimentares. Esse fato deve ser considerado, pois a parcela da população consumidora de leite são crianças e idosos (MILLER, 2008).

De acordo com Brasil (2001) na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 12 de 02 de janeiro de 2001 as empresas devem seguir os limites e critérios nela descritos, com a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população e a regulamentação dos padrões microbiológicos para alimentos. Além disso, transmite a garantia de fornecer à sociedade um alimento com padrão de qualidade constatada.

Segundo Forsythe (2013), os coliformes foram historicamente utilizados como indicadores que mediam os níveis de contaminação fecal e, assim, a presença potencial de patógenos entéricos em água doce.

Na Europa, em razão do critério alimentar SANCO (Saúde e Proteção dos Consumidores), o grupo das Enterobacteriaceae, que é o mais amplo, tem sido mais utilizado, mas o termo “coliformes” foi mantido no Brasil devido a seu uso frequente. Já que os coliformes podem ser destruídos com certa facilidade pelo calor, sua contagem é útil em testes de contaminações pós-processamento (FORSYTHE, 2013).

As DTAs podem ser prevenidas se a preparação dos alimentos seguirem, as Boas Práticas de Fabricação (BPF), evitando contaminações cruzadas, e permitindo uma higienização correta de acordo com cada tipo de alimento. Outrossim, após 12 horas do preparo, o alimento deve ser armazenado em local adequado e em temperatura que não permitam o crescimento de micro-organismos. É de suma importância, que haja a capacitação dos colaboradores que manipulam os alimentos de acordo com as BPF assim, vetando contaminações (SILVA, 2017).

2.1.1 Queijo Coalho

De acordo com Brasil (2001) na Instrução Normativa N° 30 de 26 de junho de 2001 entende-se por queijo coalho, o queijo que se obtém por coagulação do leite por meio do

coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas e comercializado normalmente com até 10 (dez) dias de fabricação. O queijo coalho é um queijo de média a alta umidade, de massa semi-cozida ou cozida e apresentando um teor de gordura nos sólidos totais variável entre 35% e 60%.

É um produto imensamente ligado ao Nordeste, aos nordestinos e à cultura local. O conhecimento empírico na produção do coalho, passado de geração em geração em moldes tradicionais, está apto a atualização do sistema de produção em uma troca de conhecimentos entre os produtores e capacitadores técnicos especializados. Sendo, portanto, um produto extremamente ligado ao seu território, às pessoas e consequentemente à cultura local, visto como um patrimônio cultural capaz de remeter a histórias e memórias, contribuindo para a constituição de um sentimento de identidade e de pertencimento ao espaço local, além de respeito à natureza e à experiência humana (MARTINELLI, 2022).

Os alimentos obtidos por processos artesanais, possuem enorme probabilidade de estarem contaminados, por causa do uso de matérias-primas de fontes não seguras, utensílios mal higienizados ou contaminados, elaboração em condições impróprias e armazenamento e comercialização em temperaturas inadequadas, fatores que contribuem para aumentar o risco de contaminação (OLIVEIRA et al. 2010).

As práticas de higiene para produção de queijo coalho deve estar de acordo com o Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Elaboradores / Industrializadores de Alimentos. O leite utilizado na produção do queijo deve ser higienizado e submetido à pasteurização ou algum tratamento térmico similar, para assegurar a inocuidade do produto (BRASIL, 2001).

2.2 Micro-organismos Indicadores

2.2.1 Coliformes a 35°C e termotolerantes

Os coliformes são bactérias dos gêneros *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* e *Citrobacter*. A *Escherichia coli*, pode ser encontrada no seu habitat primário, o trato intestinal dos humanos e animais. As outras bactérias do grupo são encontradas nas fezes, nos vegetais e no solo, elas persistem por mais tempo que as bactérias patogênicas de origem intestinal. (AMORIM, 2013).

Os coliformes 35 °C são bacilos gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não esporogênicos, oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de gás a $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em 24-48 horas (CONTE et al., 2004).

Os coliformes termotolerantes são caracterizados pela sua capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás, à temperatura de 45 °C. A sua presença, indica que há grande probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal (AMORIM, 2013).

A identificação de coliformes em produtos alimentícios serve como indicador de qualidade higiênico-sanitário do local em que foi produzido, das matérias prima utilizadas, bem como do indivíduo que participou da fabricação dos alimentos (SALES et al., 2015).

Além disso, segundo a Instrução Normativa nº 60 de 23 de dezembro de 2019, publicada pela ANVISA no Diário Oficial da União, queijos com umidade igual ou acima de 46% devem conter até 10^3 de *Escherichia coli* por grama em sua composição (Tabela1) (BRASIL, 2019).

Tabela 1- Padrão microbiológico para coliformes e *Salmonella spp.*

Queijo de média umidade 36% <umid< 46%	Coliformes 35°C (NMP/g ⁻¹)	Coliformes 45°C (NMP/g ⁻¹)	<i>Salmonella spp.</i>
Queijo coalho 43%	Mínimo= 10^3 Máximo= 5×10^3	Mínimo= 10^2 Máximo= 5×10^2	Ausência em 25 g

Fonte: Brasil, 2001.

2.2.2 *Salmonella spp.*

Segundo Forsythe (2013), a *Salmonella* é a causa de várias doenças de origem alimentar no mundo ocasionando perdas econômicas, morbidade e a mortalidade. A maioria das infecções humanas por *Salmonella* são associadas com transmissão de origem alimentar a partir de carne e de produtos lácteos. As bactérias do grupo das *Salmonella* são gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formam endósporos e possuem forma de bastonetes curtos. Elas fermentam a glicose produzindo gás e ácido, porém são incapazes de metabolizar sacarose e glicose.

Os significativos índices de morbidade e mortalidade em países emergentes e desenvolvidos, são atribuídas as infecções por *Salmonella spp.*, alguns pequenos e grandes surtos, envolvendo em especial o consumo de alimentos de origem animal, como ovos, aves, carnes e produtos lácteos (BRASIL, 2011).

A Salmonelose, patologia causada pela *Salmonella*, é apontada como a zoonose mais disseminada do mundo. Como a transmissão de *Salmonella* abrange todos os vertebrados e sua propagação está ligada ao consumo de alimentos, seu controle é um contratempo para a saúde pública, considerando o surgimento de novos sorovares, e o ressurgimento de outros em

certas áreas, nos países emergentes e nos industrializados (BRASIL, 2011).

2.2.3 Mesófilos

Segundo Barbosa (2020), o grupo dos micro-organismos aeróbios mesófilos, engloba grande parte das bactérias acidificantes e/ou patogênicas do leite. O resfriamento do leite após o processo de ordenha, diminui consideravelmente o aumento da população dos aeróbios mesófilos, eles se multiplicam em temperaturas moderadas, entre 20 e 40 °C. Esses micro-organismos são responsáveis pela fermentação do leite afetando a qualidade dos derivados, a sua presença em altos números sugere equívocos nos métodos de higiene. Juntamente com os coliformes, esses micro-organismos são considerados indicadores da qualidade do leite, apontando qualitativamente como o produto foi adquirido.

De acordo com Ferreira et al (2014), a quantidade de mesófilos aeróbios presentes no leite ou em seus derivados apontam erros durante o beneficiamento e processamento. Se os protocolos de limpeza, desinfecção, temperatura, processamento, transporte e armazenamento não forem seguidos, haverá uma alteração na qualidade do leite favorecendo o aumento da quantidade de microrganismos patogênicos.

Conforme Forsythe (2013), um dos micro-organismos de relevância em alimentos minimamente processados são os mesófilos, esses patógenos tendem a sobreviver aos tratamentos térmicos brandos, porém são incapazes de se multiplicar em temperaturas frias quando o produto está estocado. Os alimentos prontos para consumo, precisam ser mantidos nas temperaturas entre $< 8^{\circ}\text{C}$ para alimentos servidos frios e $> 63^{\circ}\text{C}$ para alimentos servidos quentes no menor intervalo de tempo possível, uma vez que há a probabilidade de os mesófilos remanescentes ou contaminantes, se proliferem depressa nessa faixa de temperatura até patamares infectantes após o processamento.

Segundo Silva (2002) quando são constatadas altas contagens de mesófilos o alimento pode ter sido mantido à temperatura ambiente. Um indicador direto da qualidade do alimento, ou do processamento ao qual ele foi submetido é a quantidade de microrganismos aeróbios mesófilos encontrados no mesmo. Dessa forma, a contagem dessas bactérias permite saber também a provável vida útil do produto e se ele está sendo armazenado em temperatura correta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de investigação

As amostras foram obtidas em três diferentes vendedores locais, em uma feira livre no bairro do Tabuleiro dos Martins, no município de Maceió, estado de Alagoas. Foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e transportadas em uma caixa térmica até o Laboratório de Microbiologia do Campus de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA) situado a 9°27'58.7" de latitude sul e 35°49'35.1" de latitude oeste, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2 Preparo das amostras

Foram pesados 25 g de queijo coalho de cada amostra, que foram maceradas separadamente em cadinhos de porcelana previamente autoclavados (Figura 2). As amostras foram suspensas em 225 ml de água peptonada 1%, previamente esterilizada a 121 °C em autoclave, resultando na diluição 10^{-1} a partir da qual, foram realizadas as diluições subsequentes até 10^{-5} . Todo procedimento de preparo foi executado em condições assépticas.

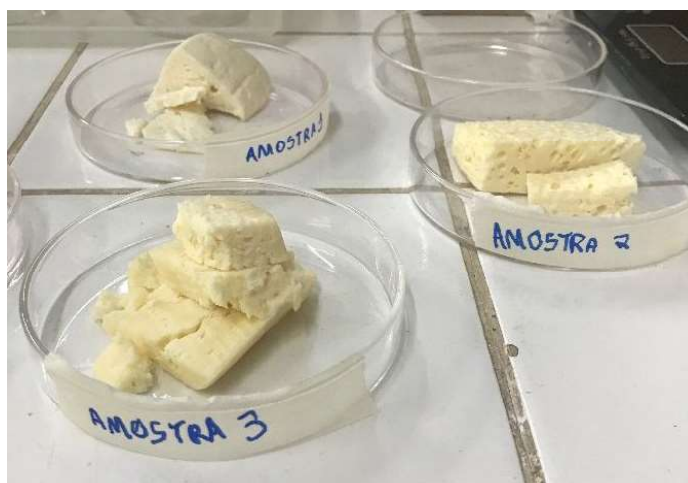


Figura 1- Amostras de queijos pesadas e separadas (Autor, 2023).

3.3 Análise das amostras

3.3.1 Determinação do NMP/g de coliformes

Para a determinação do NMP de coliformes totais foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, conforme metodologia descrita pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1991). Essa técnica compreende duas fases distintas: o teste presuntivo, no que recuperam as células e se detecta a presença de micro-organismo fermentadores da lactose, e o teste confirmatório, onde se determina a população real de coliformes totais e termotolerantes.

No teste presuntivo foram utilizadas 3 séries (diluições 10^{-1} a 10^{-3}) de 3 tubos contendo caldo LST (Lauril Sulfato Triptose) e tubos de Durham (Figura 3). As culturas foram incubadas em estufa a 37°C por 24-48 horas. Após a incubação, a leitura foi executada, tendo a prova considerada positiva, os que ocorreram turbidez e evidente produção de gás identificada no tubo de Durham.

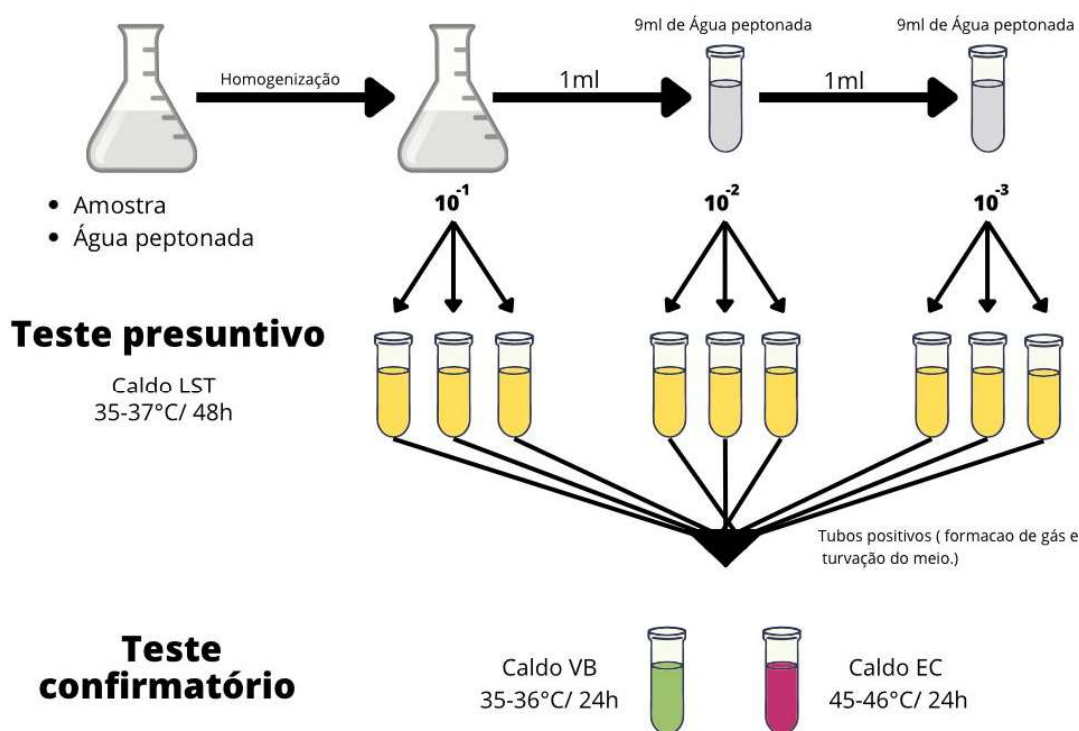


Figura 2- Fluxograma das análises para determinação da quantidade de coliformes (Autor, 2023).

3.3.1.1 Teste confirmatório para coliformes 35 °C

De cada amostra positiva, foram realizadas sementeiras em tubos de ensaio contendo lactose-bile-verde brilhante 2% e tubos de Durham, e as culturas foram incubadas 35-36°C por 24 horas. Os tubos que apresentaram turvação e produção de gás foram considerados positivos. Para quantificar os resultados foi utilizada a tabela do número mais provável (NMP/g).

3.3.1.2 Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

De cada amostra positiva, foram realizadas sementeiras em tubos de ensaio contendo caldo EC (*Escherichia coli*) e as culturas incubadas 45-46°C durante 24 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás nos tubos de Durham e turvação do meio. Na quantificação dos resultados foi utilizada a tabela do número mais provável (NMP).

3.3.2 Teste para *Salmonella* spp.

Para detecção de *Salmonella*, as amostras passaram por um pré-enriquecimento com água peptonada a 1%, em seguida foi feito o enriquecimento em selenito-cistina e caldo Tetrationato e para isolamento ágar Hektoen e ágar Salmonella-Shigella (Figura 4).

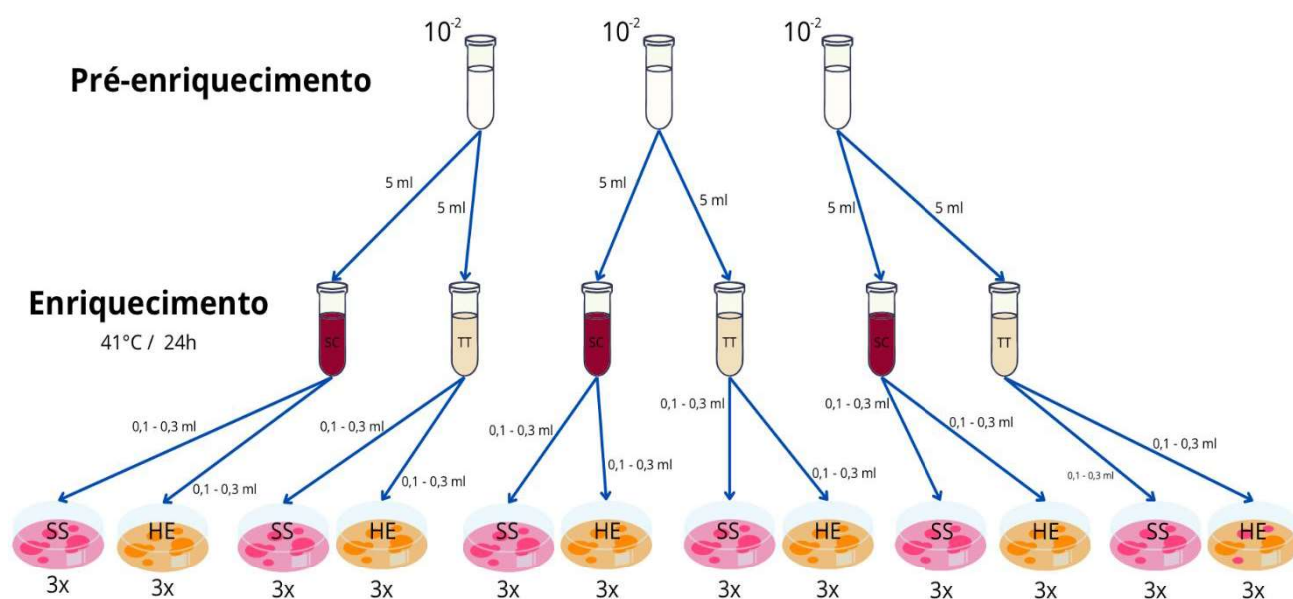


Figura 3- Fluxograma das etapas de análises para detecção da presença de *Salmonella spp.* nas amostras de queijo adquiridas (O autor, 2023).

3.3.3 Micro-organismos Mesófilos

Da diluição 10^{-5} , um ml foi plaqueado em profundidade em placas de petri contendo, 15ml do meio de cultivo PCA. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas invertidas por 48h a 32°C. As placas com contagens entre 30 e 300 UFC foram selecionadas para a contagem das colônias. As colônias desenvolvidas no meio foram contadas e transformadas em UFC.g⁻¹, através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC g}^{-1} = \frac{X \cdot FD}{V}$$

X = Média de cada diluição

FD = Fator de diluição

V = Volume da diluição adicionado a placa de Petri

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coliformes totais e termotolerantes.

Caso o queijo coalho apresente quantidades de coliformes 35 °C, coliformes termotolerantes, *Salmonella spp.* e outros micro-organismos fora do limite estipulado pela legislação indica que existiram contaminações durante o processamento, beneficiamento, transporte ou armazenamento. A carência de conhecimento técnico dos pequenos produtores, na prevenção da existência de coliformes e outros micro-organismos, é muitas vezes o vilão das propriedades produtoras de leite e derivados, muitos deles ordenham as vacas em locais com focos de insetos e em meio às fezes dos animais.

Em pequenas propriedades com processos artesanais o queijo passa por aquecimento e depois é adicionado o coalho, por não passar por pasteurização ou tratamento térmico semelhante há um grande risco de os microrganismos patogênicos continuarem presentes durante o processamento. Em produções industrializadas o leite passa por processos térmicos para atestar a inocuidade do produto no caso o queijo coalho, o armazenamento em temperaturas inadequadas e o manuseio durante a comercialização ocasionam contaminações (Figura 1).

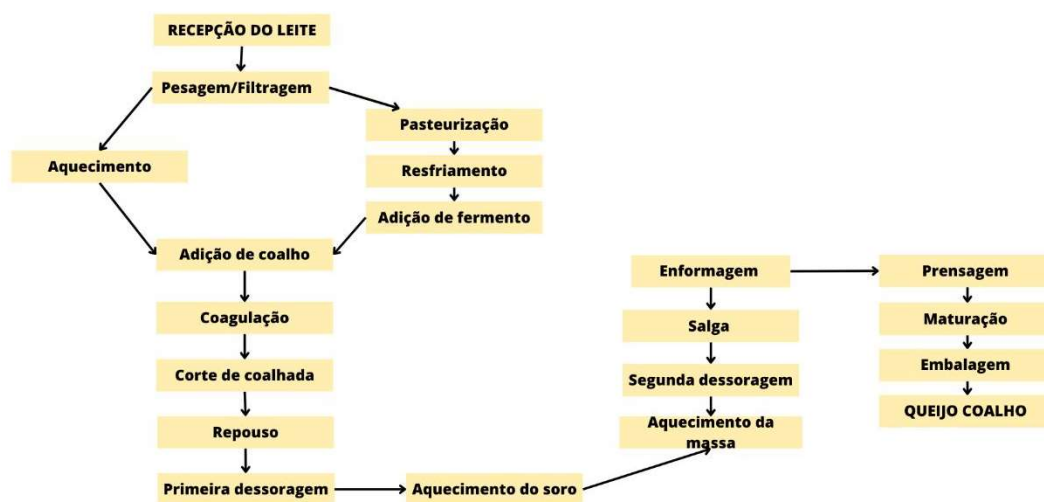


Figura 4- Fluxograma de produção do queijo coalho (Autor, 2023).

Desse modo, a verificação da qualidade microbiológica dos alimentos produzidos a partir de produtos de origem animal ou vegetal é necessária para a prevenção de surtos de DTAs causadas por falta de higiene durante o preparo, processamento e armazenamento.

Todas as amostras analisadas apresentaram crescimento em diferentes níveis, na amostra um, a presença de coliformes 35 °C foi de < 3 NMP/g, 3 NMP/g na amostra 2 e 21 NMP/G na amostra 3 (Tabela 2). No caso dos coliformes termotolerantes as amostras apresentaram crescimento de 21 NMP/g na amostra 1, 75 NMP/g na amostra 2 e de 43 NMP/g na mostra 3 (Tabela 2).

Tabela 2- Determinação do número mais provável (NMP/g) de coliformes totais e coliformes termotolerantes.

Amostras de queijo	Coliformes 35 °C (NMP/g)	Coliformes termotolerantes (NMP/g)
Amostra 1	< 3 NMP/g	21 NMP/g
Amostra 2	3 NMP/g	75 NMP/g
Amostra 3	21 NMP/g	43 NMP/g

Fonte: autor, 2023.

O presente estudo apresentou resultados abaixo dos limites estabelecidos pela legislação sendo máximo de 5×10^2 NMP/g. Mesmo estando nos limites, os resultados declaram que a matéria prima e/ou consequentemente seus derivados, possuem níveis de contaminação fecal decorrente das condições higiênico-sanitárias durante as preparações para ordenha do leite, durante a ordenha em locais inadequados, o armazenamento do leite sem resfriamento ou a produção dos derivados sem o processo de pasteurização ou tratamentos térmicos semelhantes.

A presença abaixo dos níveis também foi relatada em outros estudos, por exemplo na pesquisa feita por Nunes (2017), foram encontradas contaminações por coliformes a 35°C em 100% das 30 amostras analisadas, 24 destas amostras equivalentes a 80% da amostragem apresentou uma contagem acima de 103 NMP/g. Em 60% das amostras nas análises para coliformes termotolerantes, por apresentarem contaminação abaixo do limite estabelecido pela legislação foram considerados aceitáveis. Levando em conta os resultados dos coliformes termotolerantes foi confirmada a presença de *Escherichia coli* em 14 (46,67%) das 30 amostras analisadas.

Do mesmo modo em pesquisa feita por Santos (2019) as amostras de todos os lotes

analisados apresentaram crescimento para coliformes 35 °C e termotolerantes. Acerca da quantificação dos coliformes totais nas amostras, o resultado foi de 150 NMP/g no lote 1, 350 NMP/g no lote 2 e 350 NMP/g no lote 3. A contagem de coliformes termotolerantes no referido trabalho, foi de 121 NMP/g no lote 1, 93 NMP/g no lote 2, 150 NMP/g no lote 3.

Outrossim, em pesquisa feita por Oliveira et al (2010) dentre as 42 amostras analisadas, 40 (95,24%) apresentaram desconformidade com os padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC 12, sendo classificadas como inadequadas para o consumo humano. Com relação aos coliformes termotolerantes, foi constatado que 80,95% (34/42) das amostras apresentaram valores superiores a 500 NMP/g, acima do limite permitido, sendo 76,47% (26/34) dos queijos de coalho com inspeção estadual, 100% (1/1) com inspeção federal e 100% (7/7) sem inspeção.

4.2 *Salmonella spp.*

A respeito das análises da presença de *Salmonella spp.* nas amostras de três comerciantes, foi constatada a ausência desta bactéria, pois não houve crescimento de *Salmonella spp.* nas placas com os meios seletivos, ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e ágar Hektoen (HE) (Tabela 3).

Tabela 3- Ocorrência de *Salmonella spp.* em amostras de queijo coalho.

Amostras	<i>Salmonella spp.</i>
Amostra 1	Ausente
Amostra 2	Ausente
Amostra 3	Ausente

Fonte: autor, 2023.

4.3 Micro-organismos Mesófilos

Com relação a quantificação de mesófilos totais encontrados no final das análises, todas as amostras apresentaram crescimento, porém não foi possível a contagem de colônias com a diluição 10^{-6} . Para determinar os resultados foi calculado a média de colônias presentes nas placas, na amostra 1 a média foi $4,33 \times 10^9$ UFC/g, $4,34 \times 10^9$ UFC/g amostra 2 e $4,36 \times 10^9$ UFC/g na amostra 3 (Tabela 4).

Tabela 4- Quantificações de Unidades Formadoras de Colônias mesófilos por grama (UFC/g) de amostras de queijo coalho.

Amostras de queijo	Mesófilos (UFC/g)
--------------------	-------------------

Amostra 1	$4,33 \times 10^9$ UFC/g
Amostra 2	$4,34 \times 10^9$ UFC/g
Amostra 3	$4,36 \times 10^9$ UFC/g

Fonte: autor, 2023.

Em pesquisas feitas por Nunes (2017) houve um crescimento em todas as amostras de queijo coalho artesanal analisadas, com uma média de $2,9 \times 10^5$ UFC/g e contagens que chegaram a $1,9 \times 10^6$ UFC/g.

Analisando a qualidade microbiológica do queijo coalho, Evangelista-Barreto et al. (2016), encontraram uma contagem média de $5,9 \times 10^8$ UFC/g, menos elevada que o presente estudo. Os autores relacionaram a presença desses micro-organismos no queijo coalho ao uso de leite de origem não segura, má higienização dos utensílios, processamento em condições insalubres, armazenamento e comercialização em locais e temperaturas inadequadas.

5 CONCLUSÕES

As amostras de queijo avaliadas, se encontram dentro dos padrões recomendados pelos órgãos de regulação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT)-MB 3463. **Bactérias coliformes totais, coliformes fecais e Escherichia coli em alimentos: determinação pelo número mais provável (NMP)**. Rio de Janeiro, 1991. p. 7.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. Universidade Fernando Pessoa - Faculdade de Ciências da Saúde. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Porto, 2012.

AMORIM, A. L. B. DO C. **Avaliação da qualidade higiênica e sanitária de queijos tipo Minas Padrão de fabricação industrial, artesanal e informal**, 2013. 53f. Monografia de conclusão de curso. Universidade de Brasília/Faculdade de agronomia e Medicina veterinária, 2013.

BARBOSA, V. T. **Avaliação da qualidade do leite cru refrigerado de silos de estocagem em laticínios do estado de Goiás**. Dissertação de Mestrado: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiana, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001**. Diário Oficial da União, de 10 de janeiro de 2001A. Disponível em:<<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-12-de-2-de-janeiro-de-2001.pdf/view>> Acessado em 25 de janeiro de 2023.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Instrução Normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019**. Diário Oficial da União de 26 de dezembro de 2019. Disponível em:<<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-60-de-23-de-dezembro-de-2019-235332356>> Acessado em 26 de janeiro de 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*** / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo

Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-salmonella-spp.pdf/view>>.

CONTE, V. D.; COLOMBO, M.; ZANROSSO, A. V.; SALVADOR, M. **Qualidade microbiológica de águas tratadas e não tratadas na região nordeste do Rio Grande do Sul**. Infarma, v.16, nº 11-12, 2004.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. SANTOS, G. C. F. SOUZA, J. F. 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 - mar (2016).

FERREIRA, H.; LIMA, H.; COELHO, T. **Microrganismos indicadores em alimentos de origem animal**. Disciplina: Tópicos Avançados em Microbiologia de Alimentos de Origem Animal. UFERSA, 2014. Disponível em: <<https://docplayer.com.br/24921127-Microrganismos-indicadores-em-alimentos-de-origem-animal.html>>.

FERREIRA, J. de A. F. **Panorama das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil entre 2000 e 2015**. 2017. 78 p. Dissertação (Mestre em Ciências) — Universidade de São Paulo.

FORSYTHE, STEPHEN J. **Microbiologia da segurança dos alimentos – 2. ed.** Porto Alegre: Artmed, 2013.

MARTINELLI, L. **O Queijo Coalho do Nordeste do Brasil: Desafios e possibilidades na construção de uma cadeia de valor cultural na visão de especialistas**. 2022. 164 f. Dissertação (Mestrado em Memória Social e Patrimônio Cultural) – Instituto de Ciências Humanas, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2022.

MILLER, N. B. **Perfil do consumo de leite de derivados lácteos no município de Colatina-ES**. 2008. p 72. Monografia de conclusão de curso (DEFESA E VIGILÂNCIA SANITÁRIA ANIMAL). Programa de pós-graduação QUALITTAS. Universidade Castelo Branco. 2008.

NUNES, G. D. S. **Qualidade microbiológica e perfil de resistência aos antimicrobianos do queijo de coalho artesanalmente produzido**. 2017. 73 p. Dissertação (Pós-Graduação Zootecnia, na área de Produção Animal (Nutrição e produção de alimentos) — Universidade Federal do Piauí.

Perry, K. S. P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química Nova, 27(2), p. 293-300, 2004.

OLIVEIRA, K. A.; NETO, J. E.; PAIVA, J.E.; MELO, L.E.H. **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil**. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.77, n.3, p.435-440, jul./set., 2010.

SALES, G. A. **Caracterização microbiológica e físico-química de Queijo Minas Artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano**. Dissertação de mestrado (Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo

Horizonte, 2015.

SANTOS, J. G. **Análise microbiológica do queijo coalho produzido por usuários da fazenda da esperança em Lagarto – Sergipe**. 2019. Monografia de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2019.

SILVA, V. B. DA. **Análise microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos na macrorregião de Sorocaba de 2011 a 2015**. Programa de Aprimoramento Profissional, Sorocaba, 2017. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ses-35838>>.

SILVA, M. C. DA. **Avaliação da Qualidade Microbiológica de Alimentos com a utilização de metodologias convencionais e Simplate**. (Dissertação de mestrado). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ANEXOS

ANEXO A- Composição de soluções e meios de cultura

SOLUÇÃO ÁGUA PEPTONADA

12 g de peptona diluído em 1200 ml de água destilada

CALDO LST

1000 ml de água destilada

Peptona 20 g

Lactose 5g

Cloreto de sódio 5g

Hidrogenofosfato de potássio 2,75 g

Dihidrogenofosfato de potássio 2,75 g

Lauril sulfato de sódio 0,10 g

CALDO EC

Água destilada 300 ml

Composição do meio comercial

Triptose 20 g

Lactose 5 g

Mistura de sais biliares 1,5 g

Fosfato dipotássio 4 g

Fosfato monopotássio 1,5 g

Cloreto de sódio 5 g

4-Methylumbelliferyl--D-Glucuronide 0,05 g

CALDO BILE VERDE BRILHANTE

Água destilada 310 ml

Composição do meio comercial

Digestão enzimática de gelatina 10 g

Lactose 10 g

Ox bile 20 g

Verde brilhante 0,0133 g

TETRATIONATO (TT)

Água destilada esterilizada 300 ml

Solução de iodeto de potássio 6 ml

Composição meio comercial

Digestão enzimática de caseína 2,5 g

Digestão enzimática de tecido animal 2,5 g

Sais biliares 1 g

Carbonato de cálcio 10 g

Tiosulfato de sódio 30 g

Solução de iodeto de potássio

3 g de iodeto de potássio em 10 ml de água esterilizada

SELENITO-CISTINA (SC)

Água destilada esterilizada 300 ml

Composição do meio comercial

Lactose 4 g

Mistura de Peptona 5 g

Fosfato de Sódio 10 g

L-Cistina 0,01 g

Selenito de Sódio 4 g

ÁGAR PADRÃO PARA CONTAGEM PCA

Água destilada 600 ml

Digestivo enzimático de Caseína 5 g

Extrato de levedura 2,50 g

Glicose 1 g

Agar Bacteriológico 15 g

ÁGAR SALMONELLA SHIGELLA (SS)

Água destilada 150 ml

Composição do meio comercial

Extrato de carne 5g

Digestão enzimática de caseína 2,5 g

Digestão enzimática de tecido animal 2,5 g

Lactose 10 g

Sais biliares 8,5 g

Citrato de sódio 8,5 g

Tiosulfato de sódio 8,5 g

Citrato férrico 1 g

Verde brilhante 0,00033 g

Vermelho neutro 0,025 g

Agar 13,5 g

ÁGAR HEKTOEN (HE)

Água destilada 150 ml

Composição do meio comercial

Digestão enzimática de tecido animal 16,5 g

Extrato de levedura 3g

Mistura de sais biliares 4,5g

Lactose 12 g

Sacarose 12g

Salicina 2 g

Cloreto de sódio 5 g

Tiosulfato de sódio 5 g

Citrato de amônio ferroso 1,5 g

Azul de bromotimol 0,065 g

Ácido Fuchsin 0,1 g

Agar 13,5 g