



Avaliação microbiológica de queijo Minas Frescal comercializado no município de Duque de Caxias/RJ

Microbiological analysis of “Minas Frescal” cheese commercialized in Duque de Caxias/RJ

Mariana Marques Saleh^{i*}, Dayse de Fátima Moreira Vargasⁱⁱ, Isabela Silva Bastosⁱⁱⁱ, Rami Fanticelli Baptista^{iv}, Alexandre Pina Costa^v, Maria Carmela Kasnowski^{vi}, Robson Maia Franco^{vii}

Resumo: Foram analisadas 19 amostras de queijo Minas Frescal que foram obtidas em supermercados de Duque de Caxias/RJ e submetidas às seguintes análises microbiológicas: enumeração de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e enumeração de Bactérias Ácido Lácticas (BAL) a partir de duas diferentes metodologias, usando-se Caldo para *Lactobacillus* MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS) com tubos de Durham e o Caldo de leite em pó reconstituído a 10%, suplementado com 0,05% de glicose e 0,1% de extrato de levedura. Dentre as 19 amostras analisadas, em 10 (52,6%) foi observada contagem de coliformes termotolerantes acima do estabelecido na legislação vigente, todas confirmativas para *Escherichia coli*. Nas 19 amostras (100%) foram observadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva superiores ao permitido em legislação. Com relação à contagem de BAL, além da baixa contagem observada em todas amostras, o método utilizando Caldo MRS foi mais eficaz. Diante dos resultados obtidos, se faz necessária a adoção de medidas que visem a melhoria da qualidade microbiológica da matriz alimentícia e garantia de inocuidade alimentar.

Termos para Indexação: coliformes, *Staphylococcus* spp., Bactérias Ácido Lácticas, inocuidade alimentar, derivado lácteo.

Abstract: Nineteen samples of Minas Frescal cheese that were obtained from supermarkets in Duque de Caxias / RJ and submitted to the following microbiological analysis: enumeration of total and thermotolerant coliforms, *Staphylococcus* coagulase positive and lactic acid bacteria (LAB) from two different methodologies, using *Lactobacillus* broth acc. to DE MAN, ROGOSA and SHARPE and the Broth of reconstituted milk powder to 10%, supplemented with 0.05% glucose and 0.1% yeast extract. Among the 19 samples analysed, in 10 (52.6%) was observed thermotolerant coliforms above the established in the current legislation, all confirmative for *Escherichia coli*. In the 19 samples analysed (100%) were observed *Staphylococcus* counts higher than permitted in legislation. Regarding the BAL count, in addition to the low count observed in all samples, the method using MRS Broth was more effective. In view of the results obtained, it is necessary to adopt measures aimed at improving the microbiological quality of the food matrix and ensuring food safety.

Index Terms: *coliforms*, *Staphylococcus* spp, Lactic Acid Bacteria, food safety, dairy derivative.

*Autor para correspondência. E-mail: salehmariana@gmail.com
Recebido em 10.12.2018. Aceito em 31.03.2019
<http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20190005>

Extraído de Monografia. Instituições Colaboradoras: Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense; Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Grande Rio.

¹ Médica Veterinária. **E-mail:** salehmariana@gmail.com. *Autor para correspondência.

¹¹¹ Médica Veterinária. Mestranda do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. **E-mail:** daysevet@outlook.com.br

¹ Médica Veterinária. **E-mail:** isabelabastos@unigranrio.br

¹ Médica Veterinária. Professora da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro. **E-mail:** rfanticelli@unigranrio.edu.br

¹ Médico Veterinário. Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Grande Rio, Duque de Caxias, Rio de Janeiro. **E-mail:** alexpina@unigranrio.edu.br

¹ Médica Veterinária. Professora Doutora do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. E-mail: melvetk@gmail.com

¹ Médico Veterinário. Professor Doutor do Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro. **E-mail:** robsonmf@vm.uff.br

Introdução:

O leite é um componente essencial a nutrição, crescimento, desenvolvimento orgânico e funcional de mamíferos por ser rico em gorduras, vitaminas e minerais. O ser humano é o principal mamífero que o consome após o desmame, não apenas na forma fluida, mas principalmente pela ingestão de derivados como o queijo (Feitosa, 2003).

O queijo Minas Frescal é um dos derivados lácteos mais consumidos no Brasil, entretanto suas características favorecem o crescimento de microbiota contaminante. Dada a importância da produção de um alimento inócuo e seguro para o consumo e saúde pública, se faz necessária a avaliação dos caracteres microbiológicos do produto, definido no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal como um produto de massa crua, coalhada, dessorada, não prensada e não maturada (Brasil, 2017). É classificado como queijo

de muito alta umidade (acima de 55%) e semi-gordo no Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, alterado pela Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004 (Mercosul, 2004).

Em 2017 a produção de queijos ultrapassou um milhão de toneladas (Caetano, 2018), e a produção leiteira chegou a 24,12 bilhões de litros (IBGE, 2018). Levando em consideração que são necessários 10 litros de leite para cada quilograma de queijo produzido (Vilela, 2009), pode-se afirmar que 10 bilhões de litros de leite foram destinados à produção de queijos, representando cerca de 42% da produção leiteira nacional. Um importante indicativo da ampla difusão do produto no país.

Devido à sua composição, o queijo Minas Frescal tornou-se um ótimo meio de crescimento de microrganismos, principalmente de bactérias. Além disso, quando associados a fatores intrínsecos

(pH, umidade, atividade de água) e extrínsecos (umidade relativa e temperatura ambiente) aos alimentos, as matrizes alimentícias se tornam ainda mais vulneráveis à ação de microrganismos, pois além do crescimento da microbiota própria pode ocorrer também o crescimento da microbiota contaminante (Franco, 2012, Bortoli, 2018, Diogo et al., 2014, Martins et al., 2014), como *Escherichia coli* e *Staphylococcus* spp. O consumo de derivados lácteos por todas as camadas da sociedade, sem as garantias de inocuidade exigidas na legislação e aplicadas a partir de programas como os de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), aumentam as chances de ocorrência de surtos de doenças originadas de agentes etiológicos presentes nos alimentos em questão, se fazendo necessário maior estudo acerca da qualidade microbiológica alimentícia.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, da família Enterobacteriaceae capaz de fermentar glicose e lactose, formando ácido e gás. Pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, sua origem, conteúdo intestinal de humanos e animais de sangue quente, confere ao microrganismo o título

de indicador de contaminação fecal, permitindo uma melhor avaliação das condições higiênico-sanitárias do produto e da possível presença de enteropatógenos.

Quando ingeridos, esses enteropatógenos atuam aderindo-se a mucosa intestinal, onde se proliferam produzindo toxinas que causam injúrias às células do trato gastrintestinal, provocando desde sintomas clássicos de gastroenterite, como diarreia, vômito, febre e dores abdominais, à colite hemorrágica. A gravidade dos sintomas varia conforme o sorotipo do microrganismo, quantidade de alimento ingerida, idade e resposta individual. Dentre as estirpes virulentas de relevância, destacam-se as enterohemorrágicas, como *Escherichia coli* O157:H7 agente etiológico da colite hemorrágica e da Síndrome Urêmica Hemolítica (SUH) (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

As bactérias do gênero *Staphylococcus*, um dos agentes causadores de mamite em vacas leiteiras (Fagundes & Oliveira, 2004), além de ser encontrada nas vias aéreas superiores, em mucosas e pele humana. São cocos Gram-positivos, pertencentes à família Staphylococcaceae. São anaeróbias facultativas, catalase positivas, com maior crescimento em aerobiose, e, em sua maioria, coagulase positivas. A espécie de

maior importância patogênica é a *S. aureus*, causadora de grande parte das doenças estafilocócicas, relacionadas ou não aos alimentos. É facilmente transferida aos alimentos, principalmente aos que são muito manipulados. Entretanto, o agente causal da injúria não é o microrganismo em si, mas as enterotoxinas que produz, e, apesar da bactéria ser destruída nos processos térmicos industriais, as enterotoxinas são termorresistentes, permanecendo ativas mesmo em alimentos pasteurizados. Intoxicações causadas por *S. aureus* podem ocasionar diferentes sinais clínicos, visto que as toxinas produzidas possuem diferentes ações, podendo causar vômitos, diarreia e cólicas abdominais (FORSYTHE, 2013).

O grupo das Bactérias Ácido Lácticas (BAL) compreende diversos gêneros, como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Carnobacterium*. São cocos ou bastonetes Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, catalase e oxidase negativos.

O metabolismo de carboidratos pode ser homofermentativo, resultando apenas em ácido lático ou heterofermentativo, resultando em ácido lático, CO_2 e outros produtos da fermentação. Dentre os diversos gêneros, os predominantes na microbiota do queijo

minas são os *Lactobacillus* e *Streptococcus*, que combinados, são utilizados como fermento na produção de queijos (SILVA et al., 2015). Possuem a função de produzir ácido lático a partir da lactose e causar mudanças bioquímicas no queijo por meio de suas enzimas, sendo capazes de produzir bacteriocinas, melhorando a qualidade nutricional, sensorial e tecnológica da matriz alimentícia (SOBRAL et al., 2013). Algumas BAL são consideradas probióticos capazes de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos como *Staphylococcus* coagulase positiva e *Escherichia coli* (PEREIRA & GÓMEZ, 2007).

Considerando a grande relevância da matriz alimentícia quanto à saúde pública e possível disseminação de patógenos, objetivou-se avaliar a qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal de diferentes marcas comercializado em supermercados do município de Duque de Caxias/RJ, a partir da contagem de

Staphylococcus spp., coliformes totais e termotolerantes, e contagem de Bactérias Ácido Lácticas.

2. Material e métodos:

2.1. Local

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Microbiológico de

Produtos de Origem Animal, do Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, em Niterói/RJ, em caixas isotérmicas com gelo, sendo mantidas as devidas condições de temperatura durante o transporte.

2.2. Fase Experimental

A fase de experimento ocorreu no período de abril a maio de 2018, quando foram obtidas 19 amostras (pesando 250 gramas cada) de queijos do tipo “Minas Frescal” de 18 diferentes marcas, em cinco supermercados no município de Duque de Caxias/RJ.

Conforme descrito na IN n° 62 (Brasil, 2003), foram obtidas de maneira asséptica 25 gramas de cada amostra, preparadas em *Stomacher*[®] com 225mL de água peptonada a 0,1% (H₂O peptonada 0,1%), adquirindo-se a diluição 10⁻¹.

Para obtenção das seguintes diluições (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ e 10⁻⁷) foi mantido o padrão de 1:10, adicionando 1mL da diluição anterior em tubos contendo 9mL de H₂O peptonada 0,1%. Em seguida foram procedidas as análises de Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e de *Escherichia coli*, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e NMP de Bactérias Ácido Láticas.

A determinação do NMP de coliformes e *E. coli* foi realizada conforme metodologia MERCK (2000), modificada e miniaturizada por Mantilla e Franco (2004), utilizando o meio de cultura *Fluorocult LMX Broth* (Merck, Alemanha). A contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva foi baseada no método de semeadura em superfície da *American Public Health Association* (APHA, 2015) utilizando-se o meio de cultura Ágar Baird-Parker (KASVI, Brasil), precedida das provas bioquímicas de catalase e coagulase.

Para a determinação do NMP de Bactérias Ácido Láticas foram comparados dois métodos descritos na APHA (2015), um usando caldo para *Lactobacillus* spp. segundo MAN, ROGOSA e SHARPE (MRS; KASVI, Brasil) com tubos de Durham e outro o Caldo de leite em pó reconstituído a 10%, suplementado com 0,05% de glicose e 0,1% de extrato de levedura. A partir das placas e tubos com crescimento típico foi coletado material para a realização da prova da catalase e confecção de esfregaços e coloração pelo método de Gram seguindo-se a bacterioscopia para estudo das características morfotintórias.

3. Resultados e Discussão:

A fim de verificar se os produtos analisados encontravam-se dentro dos

padrões microbiológicos previstos para queijos de “Muito Alta Umidade”, adotou-se como referência os valores estabelecidos na RDC nº 12 da ANVISA (Brasil, 2001) para coliformes a 45°C (termotolerantes ou fecais) e *Staphylococcus* coagulase positiva.

Na contagem do grupo dos coliformes, em 19 amostras (100%) foram constatados valores entre $9,3 \times 10^2$ e $1,1 \times 10^8$ para coliformes totais, enquanto 10 amostras (52,6%) continham quantidade de coliformes a 45°C acima do estabelecido na legislação, entre $9,3 \times 10^2$ e $4,6 \times 10^7$.

Em todas amostras positivas para coliformes a 45°C foram confirmadas a presença de *E. coli* detectada pelo Teste do Indol. Resultado que corrobora com os encontrados por Souza et al. (2016), que ao analisarem a mesma matriz alimentícia identificaram a presença de *E. coli* em 40% das amostras. Além dos coliformes totais oriundos de ambientes não-fecais, a presença de *E. coli* é indicativa de contaminação de origem fecal na produção, processamento, armazenamento inadequado das amostras e/ou falta de higiene dos manipuladores, conforme relatado por FRANCO et al. (2008). Estes autores mencionaram que *E. coli* pode ser considerada indicativa da presença de enteropatógenos e deterioração potencial do alimento, por ser indol positiva, cuja

produção ocorre devido a ação da enzima triptofanase sobre o aminoácido triptofano liberando o metabólito putrefativo indol, escatol e outras metabólitos alcalinos. As elevadas contagens observadas são preocupantes uma vez que, como relatado por Nataro e Kaper (1998), vários sorotipos de *E. coli* possuem potencial de disseminação através do organismo, sendo relacionados não só a doenças diarreicas, mas a infecções gastrintestinais e meningite, ocasionando mais de dois milhões de mortes por ano, tornando-se um grave problema de saúde pública no mundo.

Com relação à *Staphylococcus* coagulase positiva, 19 amostras (100%) estavam contaminadas com contagem superior ao estabelecido na legislação atual, com valores variando entre $1,6 \times 10^4$ UFC/g e $1,4 \times 10^9$ UFC/g. Os resultados similares foram reportados ao por Rodrigues et al. (1995) e Brant et al. (2007), os quais, respectivamente, observaram que 100,0% e 92,5% do queijo Minas Frescal possuía contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva acima do referido padrão legal. Em 18 amostras (95%) foram observadas contagens superiores a 10^5 UFC/g, valor que, segundo Forsythe (2013), pode propiciar a produção de enterotoxinas, representando risco de intoxicação alimentar. Essa

contaminação está diretamente relacionada aos manipuladores dos alimentos, pois conforme relato de Verhoeven et al. (2014), grande parte da população humana possui *Staphylococcus* spp como parte da microbiota da pele, nariz, pescoço e mãos, sendo facilmente transmitida aos alimentos, ambiente e equipamentos, comprometendo o produto final. Kousta et al. (2010) afirmaram que *Staphylococcus* coagulase positiva é uma importante causa de intoxicações alimentares em todo o mundo. Para a ocorrência da intoxicação alimentar estafilocócica é necessária a ingestão de uma ou mais enterotoxinas pré-formadas, sendo considerada a terceira causa mais relatada entre os agentes etiológicos de doenças alimentares no mundo. Considerando que 95% das amostras obtiveram contagem que propicia a produção do agente causador da intoxicação, deve ser levada em consideração a possibilidade da ocorrência de surtos, como o relatado por Do Carmo et al. (2004) no verão de 1998, que acometeu 4.000 pessoas, levando 16 à óbito.

Quanto ao NMP de Bactérias Ácido Láticas, além da baixa contagem em todas as amostras, foi possível observar maior seletividade no meio de cultura Caldo MRS do que o Caldo de leite em pó reconstituído, com maior incidência de

tubos positivos. No Caldo de leite em pó reconstituído, em seis amostras (31,6%) foram observadas contagens que variaram entre 3,0 e $2,3 \times 10^3$ NMP/g e em 13 amostras (68,4%) foram observadas contagem menor que 3,0 NMP/g. No Caldo MRS, 12 amostras (63,2%) apresentaram contagens entre 3,0 e $2,9 \times 10^2$ NMP/g, e apenas sete (36,8%) possuíam resultados inferiores a 3 NMP/g.

Todos os tubos positivos foram confirmados a partir da prova da catalase, em que todas obtiveram resultado negativo, esfregaço e coloração pelo método de Gram, em que foi possível observar a presença de bastonetes e cocos Gram positivos, com maior incidência de bacilos, assim como observado por Andrade et al. (2006), em que aproximadamente 95% das lâminas continham bacilos de diferentes tamanhos, formas e arranjos. Os 5% restantes eram cocos, também Gram positivos, que são características morfotintoriais dos gêneros *Lactobacillus* e *Streptococcus*, respectivamente.

Segundo Stürmer et al. (2012), esses microrganismos podem possuir características probióticas, sendo capazes de produzir, em decorrência da fermentação, compostos orgânicos que aumentam a acidez do intestino, impedindo a multiplicação de bactérias patogênicas,

além de terem a propriedade de produzirem bacteriocinas. Manley et al. (2007) afirmaram que as BAL são capazes de substituir a microbiota patogênica por bactérias comensais que interagem com o sistema imunológico. Entretanto, autores como Oksanen (1999) e Vinderola (2000) ressaltaram que para as BAL possuírem efeitos biológicos no intestino é necessária a obtenção de uma concentração mínima de aproximadamente 10^7 UFC/g, podendo variar conforme o microrganismo e patógeno envolvidos, concentração que não foi alcançada em nenhuma das amostras analisadas.

4. Conclusão:

O alto índice de contaminação fecal (devido a ocorrência de *E. coli*) na maioria das amostras analisadas nesta pesquisa e a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva em todas as amostras conclui-se que o queijo Minas frescal comercializado em Duque de Caxias possuíam risco em potencial de causar toxinfecção alimentar.

Se faz necessária a adoção de medidas que visem a redução da contaminação desses produtos, tais como sanidade animal, boas práticas agropecuárias, incentivo na aplicação dos programas de Procedimento Padrão de Higiene Operacional (PPHO), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle

(APPCC), na estocagem, manipulação e na comercialização.

Quanto à contagem de Bactérias Ácido Lácticas foi possível observar baixa concentração em todas as amostras, e uma maior seletividade no meio de cultura Caldo MRS do que o com leite em pó. Relacionando a alta contagem de bactérias indicadoras e a baixa contagem de BAL, deve ser levado em consideração que quanto maior a presença de BAL no queijo melhor será a qualidade nutricional, sensorial e tecnológica da matriz alimentícia.

5. Referências bibliográficas:

1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). Committee on Microbiological Methods for Foods. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: APHA, 2015.
2. ANDRADE, C.C.P.; MANDELLI, F.; DELAMARE, A.P.L.; ECHEVERRIGARAY, S. **Estudo de Bactérias Lácticas na produção de queijo Serrano**. In: Reunião Anual da SBPC, Florianópolis, 2006.
3. BORTOLI et al., Avaliação microbiológica da água em propriedades rurais produtoras de leite localizadas no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* (v.12, n.1) p. 39 –53jan –mar (2018)
4. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v59n6/33.pdf>>. Acesso em: 15 abr 2018.

5. BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Aprovado pelo decreto nº 30691 de 29/03/52, alterado pelo decreto nº 9069 de 31/05/17. Diário Oficial da União de 01/06/2017, seção 1, p. 1. Brasília, 2017.
6. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União de 18/09/2003, seção 1, p. 14. Brasília, 2003.
7. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento sobre padrões microbiológicos para alimentos e seus Anexos I e II**. Resolução RDC número 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União de 10/01/01, seção 01, p. 45-53. Brasília, 2001.
8. CAETANO, M. **Produção de queijo deve crescer 2,5% neste ano com aumento do consumo**. 2018. Disponível em: <https://www.dci.com.br/industria/producao-de-queijo-deve-crescer-2-5-neste-ano-com-aumento-do-consumo-1.698571>. Acesso em: 15 abr 2018.
9. DIOGO et al., Perfil de contagem de células somáticas em propriedades leiteiras nos municípios de Patos de Minas e Lagoa Grande no estado de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 2014 Setembro; 8 (5 Supl 1): 71-75 <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140042>
10. DO CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V. R.; DIAS, R.S.; DOUZA, J.M.; DE SENA, M.J.; DOS SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M. A **Case Study of a Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident**. Foodborne Pathogens and Disease, v.1, n.4, 2004.
11. FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C.A.F. **Infecções intramamárias causadas por Staphylococcus aureus e suas implicações em saúde pública**. Ciência Rural, v.34, n.4, jul-ago, 2004.
11. FEITOSA, T.; BORGES, M.F.; NASSU, R.T.; AZEVEDO, E.H.F.; MUNIZ, C.R. **Pesquisa de Salmonella sp., Listeria sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitário em queijo de coalho produzido no Estado do Rio Grande do Norte**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.23, p.162-162, 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v23s0/19490.pdf>. Acesso em: 15 abr 2018.
12. FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
13. FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
14. FRANCO, R.M. **Agentes Etiológicos de Doenças Alimentares**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora da UFF, 2012. 119p.
15. FRANCO. R.M.; MANTILLA, S.P.S.; LEITE, A.M.O. **Enumeração de Escherichia coli em carne bovina e de aves através de metodologia miniaturizada utilizando-se "ependorf" e caldo fluorogênico**. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v. 103, n. 567-568, p. 201-207, 2008.
16. IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Trimestral do Leite**, 2018. Disponível em: www.ibge.gov.br Acesso em: 15 abr 2018.
17. KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E.H. **Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels**. Food Control, ed. 21, p. 805–815, 2010.
18. MANLEY K.J.; FRAENKEL, M.B.; MAYALL, B.C.; POWER, D.A. **Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial**. The Medical Journal of Australia, ed. 186, p. 454-457, 2007.

19. MANTILLA, S.P.S.; FRANCO, R.M. ***Escherichia coli* em corte de carne bovina (acém): Avaliação da Metodologia Aplicada e Sensibilidade Antimicrobiana dos Sorovares Predominantes.** Seminário de Iniciação Científica e Prêmio UFF Vasconcellos Torres De Ciência e Tecnologia, 2004, Niterói.
20. MARTINS et al., Perfil da contagem bacteriana total do leite de propriedades leiteiras nos municípios de Patos de Minas e Lagoa Grande no estado de Minas Gerais. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, 2014 Setembro; 8 (5 Supl 1): 76 - 81 <http://dx.doi.org/10.5935/1981-2965.20140043>
21. MERCK. **Microbiology Manual.** Berlin, Alemanha. 407p, 2000.
22. MERCOSUL. Grupo Mercado Comum. **Regulamento Técnico Mercosul de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal.** Resolução nº 145, de 13 de dezembro de 1996. Alterado pela Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004. Diário Oficial da União de 05/03/04, seção 01, p. 5. Brasília, 2004.
23. NATARO J.P.; KAPER, J. **Diarrheogenic *Escherichia coli*.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p. 142-201, Estados Unidos, 1998.
24. OKSANEN, P.J.; SALMINEN, S.; SAXELIN, M.; HAMALAINEN, P.; VORMISTO, A.I.; ISOVIITA, L.M.; NIKKARI, S.; OKSANEN, T.; PORSTI, I.; SALMINEN, E.; SIITONEN, S.; STUCKEY, H.; TOPPILA, A.; VAPAATALO, H. **Prevention of traveler's diarrhea by *Lactobacillus GG*.** *Annals of Medicine*, v. 22, p. 53-56, 1990.
25. PEREIRA, V.G.; GÓMEZ, R.J.H.C. **Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos.** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 28, n. 2, p. 229-240, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/4457/445744084009/>. Acesso em: 15 abr 2018.
26. RODRIGUES, F.T.; VIEIRA, M.D.; SANTOS, J.L. **Características microbiológicas do queijo tipo Minas frescal comercializado em Viçosa/MG.** In: *Anais do 8º Congresso Nacional de Laticínios*; 1995; Juiz de Fora. p. 233-5.
27. SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água.** 5. ed. São Paulo: Varela, 2015.
28. SOBRAL, D.; TEODORO, V.A.M.; PINTO, M.S.; MACHADO, G.M.; COSTA, R.G.B.; CARVALHO, A.F. **Efeito da nisina na contagem de *Lactococcus* e *Lactobacillus* em queijo Minas artesanal da região de Araxá – MG.** *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, Juiz de Fora*, v. 68, n. 391, p. 5-10, mar - abr., 2013.
29. SOUZA, I.A.; GIOVANNETTI, A.C.S.; SANTOS, L.G.F.; GRANDRA, S.O.S.; RAMOS, A.L.S.; MARTINS, M.L.; BENEVENUTO, W.C.A.N. **Ocorrência de *Escherichia coli* em queijo Minas Frescal comercializado na Zona da Mata mineira.** XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Fundação de Apoio da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/271.pdf> Acesso em: 15 abr 2018.
30. STÜRMER, E.S.; CASASOLA, S.; GALL, M.C.; GALL, M.C. **A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana.** *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*; v. 27, n. 4, p. 264-272, 2012.
31. VERHOEVEN, P.O.; GAGNAIRE, J.; NEVERS, E.B.; GRATARD, A.C.; LUCHT, F.; POZZETO, B.; BERTHELOT, P. **Detection and clinical relevance of *Staphylococcus aureus* nasal carriage: an update.** *Expert Review of Anti-infective Therapy*; v. 12, n. 1, p. 75–89, 2014.

32. VILELA, S.C. **Nova abordagem sobre Rendimento na Fabricação de Queijos.** CHR Hansen. Disponível em: <http://www.terraviva.com.br/terraviva/file/1/2223.pdf>. Acesso em: 15 mai 2018.
