



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MARIA THAMIRES ALVES FELIX

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM QUEIJO COALHO OBTIDO POR
PROCESSO INDUSTRIAL**

JOÃO PESSOA – PB

2023

MARIA THAMIRES ALVES FELIX

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM QUEIJO COALHO OBTIDO POR PROCESSO
INDUSTRIAL

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a
Coordenação curso de Engenharia de Alimentos da
Universidade Federal da Paraíba, como parte dos
requisitos para obtenção do grau de Bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^aDr^a Janeeyre Ferreira Maciel

JOÃO PESSOA – PB

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F316o Felix, Maria Thamires Alves.

OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM QUEIJO COALHO
OBTIDO POR PROCESSO INDUSTRIAL / Maria Thamires Alves
Felix. - João Pessoa, 2023.
44 f. : il.

Orientação: Janeeyre Ferreira Maciel.
TCC (Graduação) - UFPB/CT.

1. Queijo coalho. 2. Microrganismos. 3. Coliformes.
4. *Escherichia coli*. I. Maciel, Janeeyre Ferreira. II.
Título.

UFPB/CT/BSCT

CDU 664(043.2)

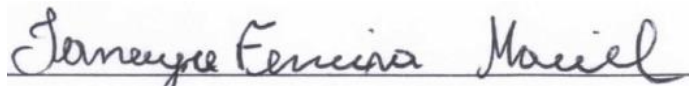
Maria Thamires Alves Felix

**OCORRÊNCIA DE *Escherichia coli* EM QUEIJO COALHO OBTIDO POR
PROCESSO INDUSTRIAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovado em: 13/06/2023.

Banca examinadora:



Presidente – Prof (a) Orientador (a)



Membro 1



Membro 2

*Á Deus, por toda a força que me levou até a conclusão desse trabalho,
a minha família, por acreditar nos meus sonhos*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros e imensos agradecimentos

A Luzia Alves de Oliveira

Minha mãe, por todo o cuidado, preocupação e apoio ao longo dos anos de graduação, mesmo de longe

A Cícero Felix da Silva

Meu pai, responsável por batalhar para que eu hoje conclua esse trabalho, nunca mediu esforços para que eu sempre tivesse o melhor conforto na graduação

A Gardiel, Henrique, Izequiel, Luana e Samuel

Meus irmãos, minha base, meus amores sempre dispostos a me ajudar no que fosse necessário

A Thamires Rodrigues Moreira

Minha melhor amiga e companheira de todos os anos de graduação, batalhou comigo nos melhores e piores momentos

A Janeeyre Ferreira Maciel

Minha orientadora, que aceitou desde o primeiro momento a realização deste trabalho e toda sua disponibilidade em ajudar e orientar

A Larissa e Genilson

Meus companheiros de laboratório, que estiveram comigo todos os dias na realização das práticas laboratoriais, dispostos a ajudar, ensinar e orientar no que fosse necessário

A Carlos Eduardo de Oliveira

Meu amigo, foi fundamental sua amizade e companheirismo no último ano de graduação

A todos meus familiares

Que mesmo que mesmo de longe torceram pelo meu sucesso e sempre preocupados com meu bem-estar

A todos meus amigos de graduação

Por anos compartilhando as dores e conquistas da graduação

A todos meus amigos conquistados ao longo da vida

*“E são tantas marcas, que já fazem parte, do que
eu sou agora, mas ainda sei me virar”*

Paralamas do Sucesso

RESUMO

O queijo coalho é um alimento produzido há mais de 150 anos, com maior produção na região Nordeste, em sua maioria por processos artesanais. Frequentemente é elaborado como leite cru, o que não atende as normas higiênicas-sanitárias podendo trazer um risco a saúde do consumidor. Os microrganismos patogênicos mais encontrados nos queijos, são os do grupo coliformes, que são bastonetes Gram-negativas, não esporuladas e que fermentam lactose. Grupo de coliformes termotolerantes pode indicar um risco ainda maior de contaminação nesse alimento, indicando que a matéria-prima usada na fabricação pode ter sido contaminado com fezes durante o processo podendo ser um veículo de contaminação de *Escherichia coli*, que compromete a saúde humana. O presente trabalho foi realizado com 4 marcas de queijo coalho de origem industrial comercializadas em João Pessoa-PB, sendo 3 lotes diferentes para cada marca de queijo, totalizando 12 amostras, com o objetivo de averiguar a ocorrência de bactérias mesófilas, coliformes e *Escherichia coli*. A metodologia utilizada foi de acordo com os procedimentos padrões específicos para bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli*. Na contagem de mesófilas, todas as amostras tiveram crescimento para dessa bactéria, obteve-se valores que variaram de $6,10 \times 10^7$ UFC/g a $1,70 \times 10^9$ UFC/g. Quanto à presença de coliformes totais e termotolerantes, todas as amostras tiveram valores >1.100 NMP/g e quanto a ocorrência de *Escherichia coli* 50% das amostras tiveram crescimento dessa bactéria com valores que variaram de <3 NMP/g a 16 NMP/g. Todos os queijos coalho analisados estão em condições higiênicas-sanitárias insatisfatórias, podendo ter um melhor controle quanto as boas práticas na sua produção, transporte e armazenamento, se tratando de bactérias patogênicas *Escherichia coli* os queijos analisados não representam um risco para a saúde do consumidor, visto que seus valores estão em acordo com os estabelecidos na legislação.

Palavras-chaves: Queijo coalho; Microrganismos; Coliformes; *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Coalho cheese is a food produced for more than 150 years, with greater production in the Northeast region, mostly by artisanal processes. It is often prepared as raw milk, which does not meet hygienic-sanitary standards and may pose a risk to the health of the consumer. The pathogenic microorganisms most commonly found in cheese are those of the coliform group, which are Gram-negative, non-sporulating rods that ferment lactose. Group of thermotolerant coliforms may indicate an even greater risk of contamination in this food, indicating that the raw material used in manufacturing may have been contaminated with feces during the process and may be a vehicle for contamination of *Escherichia coli*, which compromises human health. The present work was carried out with 4 brands of coalho cheese of industrial origin sold in João Pessoa-PB, with 3 different batches for each brand of cheese, totaling 12 samples, with the objective of investigating the occurrence of mesophilic bacteria, coliforms and *Escherichia coli*. The methodology used was in accordance with standard procedures for specific aerobic mesophilic bacteria, total coliforms, thermotolerants and *Escherichia coli*. For the count of mesophilic bacteria, all samples had growth for this bacteria, values ranging from $6,10 \times 10^7$ CFU/g to $1,70 \times 10^9$ CFU/g were obtained. Regarding the presence of total and thermotolerant coliforms, all samples had values $>1,100$ MPN/g and regarding the occurrence of *Escherichia coli*, 50% of the samples had growth of this bacterium with values ranging from <3 MPN/g to 16 MPN/g. All analyzed coalho cheeses are in unsatisfactory hygienic-sanitary conditions, being able to have a better control regarding the good practices in their production, transport and storage, in the case of pathogenic bacteria *Escherichia coli*, the analyzed cheeses do not represent a risk to the health of the consumer, since their values are in accordance with those established in the legislation.

Key words: Coalho cheese; Microorganisms; Coliforms; *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma geral para a produção de queijo coalho.	10
Figura 2- Contagem de bactérias totais mesófilas.....	24
Figura 3 - Formação de gás nos tubos de VB.....	25
Figura 4 - Formação de gás nos tubos EC.....	26
Figura 5 - Placa com colônias características da <i>E. coli</i>	28

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Padrão microbiológico para queijos de média umidade ($36\% < \text{umidade} < 46\%$). 16
- Quadro 2:** Padrão microbiológico para queijos de alta umidade ($46\% < \text{umidade} < 55\%$)..... 17
- Quadro 3:** Padrão microbiológico para queijos..... 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Procedência das amostras de queijo coalho vendidas em João Pessoa.	18
Tabela 2: Contagem Padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de queijo coalho.	23
Tabela 3: Resultado das amostras analisadas para coliformes totais e termotolerantes.	25
Tabela 4: Resultado das amostras analisadas para <i>Escherichia coli</i>	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw	Atividade de água
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BVB	Caldo Bile Verde Brilhante
DAEC	<i>Escherichia coli</i> Aderente Difusa
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EC	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasora
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
L-AMB	Levine Eosina Azul de Metileno
LST	Lauril Sulfato Triptose
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária
NMP	Número Mais Provável
PCA	Contagem Padrão em Placas
STEC	<i>Escherichia coli</i> Produtora de Toxina Shiga
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 OBJETIVOS	8
2.2 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 QUEIJO COALHO	9
3.2 HIGIENE NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS	10
3.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA'S)	11
3.4 MICROORGANISMOS DO GRUPO COLIFORMES	12
3.5 <i>Escherichia coli</i>	12
3.6 <i>Escherichia coli</i> EM QUEIJOS	14
3.7 LEGISLAÇÃO	15
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO	18
4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	18
4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	19
4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	19
4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	20
4.5.1 Contagem padrão em placas	20
4.5.2 Contagem de coliformes pelo método do NMP	20
4.5.3 Teste completo para detecção e contagem de <i>Escherichia coli</i>	21
4.5.3.1 Isolamento de <i>E. coli</i>	21
4.5.3.2 Purificação das colônias típicas.....	21
4.5.3.3 Testes bioquímicos- IMViC	21
4.6 ANÁLISE DE DADOS	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	23
5.5.1 Contagem de bactérias totais	23
5.1.2 Contagem de coliformes totais e termotolerantes	25
5.1.3 Detecção e contagem de <i>Escherichia coli</i>	27
6 CONCLUSÃO.....	30
REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o 3º maior produtor de leite do mundo com 34 bilhões de litros por ano, tendo sua produção em 98% dos municípios brasileiros (BRASIL, 2022). Tendo em vista a grande produção leiteira, ganha destaque também, a produção de derivados do leite, como os queijos. No Brasil existem mais de 30 variedades de queijos artesanais ou típicos, que são produzidos em regiões diversas do país, que ganham sabores, texturas e formas diferentes (SARAIVA *et al.*, 2023).

O queijo coalho, produto típico da região Nordeste, é produzido há mais de 150 anos, é um alimento que vem sendo amplamente consumido e comercializado no Brasil (CAVALCANTE, 2017). Grande parte de sua produção é feita de forma artesanal, em propriedades familiares, com adaptações no processo de fabricação, o que gera produtos com propriedades organolépticas diferentes (BARBOSA, 2015). Uma pesquisa publicada na CIAGRO (Congresso Internacional da Agroindústria) questionou a 142 pessoas no estado de Pernambuco, quais os queijos eram mais consumidos por elas, tendo 95,1% dos respondentes informado que consumiam o queijo coalho, mostrando que sua grande aceitação e comercialização torna esse produto uma importante fonte de renda (SIQUEIRA, 2021; OLIVEIRA, 2020).

Considerando que maior parte de sua produção é artesanal, o leite utilizado na produção do queijo coalho, na maior parte das vezes, não passa por processo térmico adequado, o que pode representar um risco para a saúde do consumidor, visto que no produto podem desenvolver microrganismos patogênicos (BEZERRA, 2017). Vários surtos foram associados ao consumo de queijos e produtos lácteos elaborados com leite pasteurizado assim como não pasteurizado (ARAÚJO, 2017).

A contaminação microbiana do queijo coalho, tem relevância para a saúde pública, devido ao potencial risco de causar Doenças Transmitidas por Alimento (DTA's) (ARAÚJO, 2017). As DTA's vem sendo reportadas mundialmente e são consideradas um problema de saúde pública. Algumas estimativas sugerem que nos Estados Unidos, cerca de 48 milhões de pessoas adoecem pelo consumo de alimentos com algum tipo de contaminação por patógenos, podendo uma porcentagem chegar a óbito. Essas contaminações muitas vezes se dão por falhas na cadeia de produção de alimentos (BOMFIM, 2020).

Durante todo o processo produtivo do queijo coalho, a higiene deve ser tida como rigorosa, ao contrário, implicará em contaminações com grupos de microrganismos indesejáveis. A principal forma de indicar contaminações em queijos é a verificação da presença de bactérias do grupo coliformes, dentre elas a *Escherichia coli* (*E. coli*), ao qual é

frequentemente transmitida pela falta de higiene durante a ordenha das vacas. Outras bactérias que também indicam um inadequado processo de higiene são *Salmonella ssp.*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (CARVALHO, 2015; MUNHOZ, 2021).

Na Paraíba, duas pesquisas foram realizadas quanto a presença e níveis de coliformes em queijos coalhos. A primeira pesquisa, apresentada por Araújo (2017), realizada no agreste paraibano, mostrou que de 10 amostras analisadas de queijos coalhos, todas apresentaram níveis acima do permitido pela legislação para coliformes totais, concluindo que os queijos analisados representam um risco para a saúde do consumidor. A segunda pesquisa realizada por Bezerra *et al.* (2017) na região de Souza-PB mostrou que 37% das amostras analisadas para coliformes termotolerantes apresentaram contagem acima do limite permitido pela legislação. Posto isso, essas pesquisas demonstram a necessidade de dar continuidade aos estudos na área, para comprovar se a comercialização dos queijos coalhos estão seguindo os padrões estabelecidos pela legislação vigente, indicando se o produto apresenta riscos para a saúde do consumidor.

Diante do exposto, o objetivo nesse trabalho foi analisar a ocorrência de *E. coli* em queijo coalho industrializado afim de verificar se o mesmo atende ao limite máximo para essa bactéria estabelecido na legislação brasileira em vigor. Ainda, foram analisados microrganismos aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes para avaliar as condições higiênicas do processo de produção.

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar se o queijo coalho, obtido por processo industrial, atende ao limite máximo estabelecido na legislação brasileira para *E. coli*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar as contagens de bactérias totais, coliformes totais, coliformes termotolerantes e de *E. coli* em queijo coalho;
- Comparar os resultados das contagens de *E. coli* com o padrão da legislação e com os obtidos por outros pesquisadores;
- Comparar os resultados das demais análises com os obtidos por outros pesquisadores e com padrões microbiológicos exigidos na legislação;
- Avaliar o risco no consumo de queijo coalho industrial com base nos resultados obtidos nas contagens de *E. coli*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 QUEIJO COALHO

Os queijos são alimentos que possuem elevado valor nutricional, são ricos em proteínas, lipídeos, carboidratos, cálcio, fósforo e vitaminas, possuindo diferentes formatos, texturas, aromas e sabores. Pode ser consumido fresco, ou seja, logo após sua fabricação, ou maturado, onde passa por um processo de cura (PERRY,2004; SPREER,1991). O queijo coalho é muito apreciado por seus consumidores por possuir características sensoriais, como sabor agradável, aroma suave e textura compacta e macia (DA SILVA, 2020).

É um queijo onde a tecnologia é relativamente simples e cuja fabricação não exige equipamentos sofisticados. Existem diferentes formas da metodologia para a manufatura do queijo de coalho que pode ser constatada na produção de vários fabricantes (NASSU, 2006). Apesar dos métodos de produção do queijo coalho serem diferentes de queijarias para queijarias, o processo básico de fabricação é comum em quase todas (PERRY, 2004).

De acordo com Aquino (1983), a nomenclatura do queijo coalho se deu no fato de ter sido tradicionalmente elaborado com leite coagulado pela ação de coalho animal, como pedaços do estômago de pequenos animais (cabritos, bezerro, preá e mocó). Em algumas regiões, ainda se mantém essa forma de colocar pedaços de estômago de mamíferos, como o bezerro, no leite para sua coagulação, porém, atualmente, para a elaboração deste produto, a maioria dos produtores artesanais e industriais desse queijo, utilizam coalho industrializado, líquido ou em pó (ESCOBAR *et al.*, 2001).

Segundo a Instrução normativa nº 30, queijo coalho é o queijo obtido por meio da coagulação do leite com enzimas coagulantes apropriadas ou uso de coalho, complementada ou não com a ação de bactérias lácteas. Apresenta média a alta umidade, com massa semi-cozida ou cozida, com um teor de gordura entre 35,0% e 60% e é, em média, comercializado dez dias após sua elaboração (BRASIL,2001). A legislação brasileira define padrões de identidade e requisitos mínimos que o queijo coalho deve apresentar para estar dentro dos padrões de qualidade e apto para o consumo humano (FREITAS FILHO *et al.*, 2012).

O processo de elaboração do queijo colho, também definido na Instrução Normativa nº 30 de 2001, diz que o a coagulação deve ser em torno de 40 minutos, seguido do corte e mexedora da massa. Posteriormente, é feita a remoção parcial do soro, a massa é aquecida com água quente ou vapor indireto, até a obtenção de uma massa semi-cozida (45°C) ou cozida (entre 45°C e 55°C), podendo ou não ser feita a adição de sal, seguido da prensagem, secagem,

embalagem e estocagem em temperatura média de 10 - 12°C normalmente (BRASIL,2001). Podemos observar o fluxograma geral da produção do queijo coalho na Figura 1.

Figura 1: Fluxograma geral para a produção de queijo coalho.



Fonte: DANTAS, 2012.

3.2 HIGIENE NA PRODUÇÃO DE QUEIJOS

Os queijos são produtos muito manipulados, sendo assim, um possível foco de contaminação, principalmente de microrganismos. As condições podem se agravar quando é utilizado leite cru e sem o adequado emprego das Boas Práticas de Fabricação (BPF) e com tecnologia adequada (PINTO *et al.*, 2009). A qualidade da matéria prima está diretamente ligada a qualidade do produto final, onde a realização do controle de qualidade do leite é

fundamental para um desempenho favorável no processo de fabricação do queijo coalho (FURTADO, 1989).

Devido a maior parte da produção do queijo coalho ocorrer a partir do leite cru, que na maioria das vezes não atendeu a as normas higiênicas no processo de ordenha, traz um grande desafio para a segurança alimentar. Um ponto de grande relevância é o fato de, na maioria dos processos de fabricação serem feitos por pequenos produtores, a grande maioria o faz de maneira informal. A falta de fiscalização e de uma inspeção sanitária, faz com que esses produtos cheguem ao mercado com baixa qualidade (DANTAS, 2012).

As BPFs são um conjunto de procedimentos realizados na indústria, que abrange desde a higienização de instalações a saúde dos colaboradores, envolve também o controle de pragas e vetores, segurança da água, prevenção de contaminação cruzada, controle de qualidade dos produtos produzidos e matérias-primas. Todas essas técnicas asseguram que o produto final chegue com qualidade ao consumidor (TEODORO *et al.*, 2007).

A implementação de tecnologias atuais de conservação microbiológica, juntamente com a adoção de Boas Práticas de Fabricação (BPF) é de grande relevância onde existe a finalidade de aprimorar a estabilidade de prateleira e fazer com que se mantenha a qualidade de produtos processados (SILVA, 2016).

Na comercialização de queijos, geralmente os produtos são vendidos em pedaços, onde existe um perigo de incorporar, externamente, matérias estranhas de origem biológica (como insetos) ou física (como terra), ocorrendo por falhas de manipulação do produto, pela falta de higienização adequada das bancas e dos utensílios utilizados pelos feirantes, ou mesmo, por contaminação cruzada entre os produtos expostos (CORREIA, 1997).

3.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA'S)

O Ministério da Saúde (2007) diz que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA's) são doenças que provêm da transmissão de substâncias tóxicas, organismos e/ou toxinas prejudiciais a saúde, transmitidas pela ingestão de alimentos ou água contaminados. Os queijos, principalmente os artesanais necessitam que se tenham normas rigorosas de higiene. Condições inadequadas adotadas no rebanho, falta de controle de qualidade na obtenção da matéria-prima e na estocagem, resultam em um produto que pode ser um risco de infecção e intoxicação aos consumidores (DORES, 2012).

Alguns microrganismos patogênicos como *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, *Bacillus cereus*, *Brucella spp.* e *Staphylococcus aureus* estão

associados a surtos de infecções e intoxicações alimentares, onde produtos lácteos, como o queijo estavam envolvidos (JAY, 2005).

3.4 MICROGANISMOS DO GRUPO COLIFORMES

O grupo dos coliformes totais compreende um subgrupo da família *Enterobacteriaceae*, que são enterobactérias que fermentam a lactose e produz gás a 35°C, as quais mais de 20 espécies estão dentro desta definição onde encontram-se bactérias originárias do trato gastrointestinal humano assim como de animais do sangue quente, também podendo englobar bactérias não entéricas. Dentro do grupo de coliformes totais, temos o grupo de coliformes termotolerantes, que geralmente são chamados de coliformes fecais, se restringindo a membros capazes de fermentar a lactose a 44,5°C – 45,5 °C (DA SILVA, 2017).

Estudos de coliformes em alimentos é utilizado como um indicador das condições higiênico sanitários do ambiente onde foi produzido, das matérias primas empregadas, bem como do indivíduo que manipulou o alimento (SANTOS, 2019).

Os coliformes do grupo totais podem ser encontrados na água, no local de ordenha das vacas e até mesmo na indústria. Na natureza se encontram em grandes quantidades e também em alimentos crus. Os coliformes totais são sensíveis a temperatura elevada. A interpretação dos resultados de contagem para a indicação de coliformes totais deve ser vista com cuidado, encontrar mais coliformes totais que o limite permitido não significa dizer que o produto está impróprio para o consumo, a interpretação mais assertiva se dá com a quantificação de coliformes termotolerantes (ARAÚJO, 2017).

Coliformes do grupo termotolerantes indicam a segurança no consumo de alimentos, por serem encontrados no trato gastrointestinal de humanos e animais, foram denominados de coliformes fecais, dentro do grupo dos coliformes totais temos 4 gêneros importantes: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, sendo a *E. coli* a única a ser encontrada no intestino humano como habitat natural (BELOTI, 2015).

3.5 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bastonete Gram-negativo, anaeróbio facultativo, não esporogênico, catalase positiva e oxidase negativa que pertence à família *Enterobacteriaceae*. A *E. coli* é um mesófilo típico, que podem se desenvolver em temperaturas que variam de 7°C a 46°C, sendo 37°C uma ótima temperatura para o crescimento (BARBOSA, 2015).

Várias doenças podem ser transmitidas por alimentos, onde podem infectar o organismo, vindo a provocar doenças sérias como a *E. coli*, podendo trazer sérias consequências para o organismo, onde o cuidado é necessário, observando todas as formas de prevenção possíveis (SILVA, 2022).

Dependendo do sorotipo da *E. coli*, elas estão relacionadas a doenças diarreicas, isso é considerado um problema de saúde pública. Nos últimos anos houve mais de 2 milhões de mortes relatadas associadas a presença de linhagens patogênicas de *E. coli* e, esse número pode aumentar, se for considerado as condições sociais, econômicas e alimentares de cada lugar (ABREU *et al.*, 2013).

O habitat natural da *E. coli* é o trato intestinal de animais do sangue quente, porém também pode ser incluída nos alimentos a partir de fontes que não sejam fecais, ela está incluída tanto no grupo de coliformes totais, quanto no grupo de coliformes termotolerantes. Sua distinção quanto aos outros coliformes termotolerantes é pelas características que apresenta no crescimento em Ágar L-AMB (Levine Eosina Azul de Metileno) e pelas caracterizações apresentadas nos testes de indol, vermelho de metila, Voges Proskauer e citrato (IMViC) (DA SILVA, 2017).

Quando considerada não patogênica, a *E. coli* faz parte da microbiota intestinal, não afetando a fisiologia e funcionamento do intestino. Existem seis categorias de *E. coli* diarreiogênicas que causam patogenicidade em seres humanos e animais, o que diferencia as seis categorias é a presença de fatores de virulência como adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas. As classificações desses microrganismos são *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (SOUZA *et al.*, 2016).

Responsável por causar uma lesão chamada de *attaching and effacing* – A/E, a *E. coli* enteropatogênica (EPEC) foi o primeiro grupo identificado sorologicamente, sendo associado a diarreia infantil. As bactérias desse grupo por vezes, apresentam adesão a células epiteliais, o que ocasiona lesões e destruição das microvilosidades intestinais. Os principais sintomas da doença provocada pela EPEC são diarreias aquosas com diferentes graus de intensidade e desidratação. O quadro pode se agravar rapidamente podendo provocar infecções mais severas no trato urinário e meningite (SALES *et al.* 2015; CHEN; FRANKEL, 2005).

A *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), acometem principalmente crianças de até dois anos e lactantes. Provocam diarreia aquosa devido as fímbrias que se encontram presentes na superfície da bactéria aderirem-se a mucosa do intestino delgado (ALVES, 2012). É conhecida

como a “diarreia dos viajantes” entre adultos de visitantes de países desenvolvidos em áreas endêmicas (RODRÍGUEZ-ANGELES, 2002).

E. coli enteroinvasora (EIEC) ocorre patogenicidade quando existe a internalização dessa bactéria pelo enterócito, esse rompe as células pelo acúmulo de actina o que provoca um desarranjo, e invade células vizinhas (ALVES, 2012).

A EHEC, está frequentemente relacionada a colite hemorrágica (HC), essa bactéria produz no intestino grosso uma verotixina, essa toxina provoca a morte dos enterócitos, causando dor abdominal e diarreia aquosa sanguinolenta. Algumas fontes de infecção são leite e produtos lácteos (SALES *et al.*, 2015; CARO *et al.*, 2011; HOLKO *et al.*, 2006). A *E. coli* produtora da toxina shiga (STEC) tem como principal fator de virulência proteínas citotóxicas, essas produzem dois tipos de toxinas, a stx1 e a stx2. Animais como os ruminantes são reservatórios naturais para a STEC (FRASER *et al.*, 2004; HOLKO *et al.*, 2006).

E. coli enteroagregativa (EAEC) é uma bactéria que pode originar agregados bacterianos localizados no epitélio jejunal, o que se assemelha a “tijolos empilhados”. A *E. coli* aderente difusa (DAEC) ainda tem sua patogenicidade desconhecida, alguns fatores de virulência estão associados a essa bactéria, como a presença de adesias fimbriais e não fimbriais (SOUZA *et al.*, 2016).

3.6 *Escherichia coli* EM QUEIJOS

Os queijos, incluindo o coalho, tem características nutricionais que são favoráveis para o crescimento de microrganismos, dentre eles a *Escherichia coli* que é frequentemente transmitida para o leite durante a ordenha inadequada, assim como, vacas com mastite representando umas das principais causas de elevados teores de patogênicos em leites e seus derivados (PIGATTO *et al.*, 2009).

Microrganismos presentes em queijos não significa que sejam patogênicos, muitos contribuem de formas benéficas nas características finais desse produto e em sua qualidade. Porém, os patogênicos podem causar defeitos no produto final, assim como, afetar a saúde do consumidor, levando a causar doenças de origem alimentar. A *E. coli* é um dos maiores indicadores para medir contaminações fecais nos processos de avaliação de segurança em alimentos como os queijos e em água (FERNANDES, 2017).

Um ponto de importância é verificar que o desenvolvimento de microrganismos em alimentos é determinado por diversos fatores, como fatores intrínsecos que estão relacionados com o próprio alimento, como teor de umidade, atividade de água (aw), pH, nutrientes

disponíveis, dentro outros. Também está relacionado a fatores extrínsecos como o local de armazenagem, temperaturas de armazenagem, umidades relativas do ar e a presença de gases (FERREIRA E SOUSA, 2002). Alguns microrganismos patogênicos tem o seu crescimento favorecido à medida que a a_w aumenta. A *E. coli* tem um crescimento com atividade de água a partir de 0,95 (FERNANDES,2017). Uma pesquisa realizada por Gomes *et al.* (2012), analisou a atividade de água e umidade de duas amostras de queijo coalho, que apresentou a_w de 0,973 e teor de umidade de 55,81%. Isso evidencia o favorecimento do queijo coalho quando ao desenvolvimento da *E. coli*.

A *E. coli*, quando presente com elevada carga, traz efeitos negativos na qualidade de queijos, quando em níveis muito altos essas bactérias provocam um efeito chamado “Flato precoce” devido aos altos níveis de produção de gás que essa bactéria tem, podendo em alguns casos provocar rachaduras nos queijos (ORDÓÑEZ *et al.*, 2005).

3.7 LEGISLAÇÃO

A legislação para queijos é ampla, temos a portaria N° 146 de 7 de março de 1996, que traz o regulamento técnico de identidade e qualidade dos queijos, segundo a portaria entende-se por queijo “O produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite constituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes” (BRASIL,1996).

A portaria traz a classificação dos queijos de acordo com o extrato seco e de acordo com o teor de umidade, sendo divididos da seguinte maneira (BRASIL,1996):

Quanto ao extrato seco:

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

Quanto ao teor de umidade:

- Queijos de baixa umidade (geralmente conhecidos como queijos de massa dura): umidade até 35,9%.
- Queijos de média umidade (geralmente conhecidos como queijos de massa semidura): umidade entre 36,0% e 45,9%.
- Queijos de alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou "macios"): umidade entre 46,0 e 54,9%.
- Queijos de muito alta umidade (geralmente conhecidos como de massa branda ou "mole"): umidade não inferior a 55,0%.

A Instrução Normativa N° 30 de 26 de junho de 2001 traz o regulamento técnico de identidade e qualidade do queijo coalho destinado tanto para o consumo nacional quanto internacional. A IN traz a composição e os requisitos que o queijo coalho deve conter quanto aos ingredientes obrigatórios o leite integral ou padronizado a 3% (m/m) em seu conteúdo de massa gorda, coalho ou enzimas coagulantes e como ingredientes opcionais pode ter o cloreto de cálcio, bactérias lácteas selecionadas, sólidos de origem lácteas, condimentos e especiarias e cloreto de sódio (BRASIL,2001).

Quanto aos requisitos deve conter características sensoriais como uma consistência semidura e elástica, textura compacta e macia, coloração branco amarelado uniforme, sabor ligeiramente ácido, podendo ser salgado, odor ligeiramente ácido, uma crosta fina e sem trinca (BRASIL, 2001)

Para análises microbiológicas em queijos, a IN n° 30 de 26 de junho de 2001, recomenda usar os critérios estabelecidos para queijos de média a alto teor de umidade que vem na portaria n° 146/96 – MAPA, que são os requisitos presentes no Quadro 1e 2.

Quadro 1: Padrão microbiológico para queijos de média umidade (36%< umidade < 46%).

Microrganismos	Crítérios de aceitação	Categoria ICMSF	Método de ensaio
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2	5	FIL 73A: 1985
	m=1.000		
	M=5.000		
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2	5	APHA 1992 C.24(1)
	m=100 M=500		
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2	5	FIL 145: 1990
	m=100 M=1.000		

Salmonela sp/25g	n=5 c=0	10	FIL 93A: 1985
	m=0		
Listeria monocytogenes/ 25g	n=5 c=0	10	FIL 143: 1990
	m=0		

Fonte: BRASIL,1996.

Quadro 2: Padrão microbiológico para queijos de alta umidade (46% < umidade < 55%)

Microrganismos	CrITÉRIOS de aceitação	Categoria ICMSF	Método de ensaio
Coliformes/g (30°C)	n=5 c=2	5	FIL 73A: 1985
	m=1.000		
	M=10.000		
Coliformes/g (45°C)	n=5 c=2	5	APHA 1992 C.24(1)
	m=1.000 M=5.000		
Estafilococos coag.pos./g	n=5 c=2	5	FIL 145: 1990
	m=100 M=1.000		
Salmonela sp/25g	n=5 c=0	10	FIL 93A: 1985
	m=0		
Listeria monocytogenes/ 25g	n=5 c=0	10	FIL 143: 1990
	m=0		

Fonte: BRASIL,1996.

A Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022 faz um levantamento para “Padrões Microbiológicos em Alimentos”, trazendo os padrões microbiológicos para queijos, como podemos observar no Quadro 3 (BRASIL, 2022):

Quadro 3: Padrão microbiológico para queijos

Alimento	Microrganismo/Toxina/Metabólito	n	C	m	M
QUEIJOS	Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	5	0	Aus	-
	Salmonella /25g	5	0	Aus	-
	Estafilococos coagulase positiva /g	5	2	10 ²	10 ³
	Escherichia coli /g, para queijos ralado ou em pó	5	2	10 ²	5x10 ²

	Escherichia coli/g , para queijos com umidade abaixo de 46%	5	2	10	10^2
	Escherichia coli/g , para queijos com umidade igual ou acima de 46%	5	1	10^2	10^3
	Bolores e Leveduras/g , somente para queijos ralado ou em pó	5	2	5×10^2	5×10^3

Fonte: Brasil, 2022.

4 METODOLOGIA

Neste capítulo estão descritas as metodologias que foram utilizadas para a execução e desenvolvimento dos objetivos da pesquisa. Caracterizada como uma pesquisa exploratória quantitativa, pois teve como objetivo fornecer informações resultantes das análises microbiológicas utilizando-as para formular hipóteses sobre a qualidade do produto.

4.1 LOCAL DE EXECUÇÃO

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba-Campus I, sendo este o laboratório responsável por todas as análises do projeto, análise de mesófilos, coliformes totais, coliformes termotolerantes incluindo a *Escherichia coli*.

4.2 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de queijo coalho foram obtidas de 4 marcas diferentes, codificadas como LB, JE, CAT, e NAT, foram adquiridas em supermercados e padarias da cidade de João Pessoa-PB, nos meses de março e abril de 2023. Para cada marca, foram obtidas 3 unidades de amostra, todas de lotes diferentes, totalizando 12 amostras de queijo coalho para análise, a procedência das amostras dos queijos avaliadas nesse estudo, foram oriundas de locais de fabricação diferentes, onde podemos observar as condições de exposição de venda e refrigeração desses queijos (Tabela 1).

Tabela 1: Procedência das amostras de queijo coalho vendidas em João Pessoa.

Marca	Procedência	Nº de amostras	Condições de exposição de venda	Embalagem
LB	Paraíba-PB	3	Refrigerado	Fechada
JE	Paraíba-PB	3	Refrigerado	Fracionada
CAT	Paraíba-PB	3	Refrigerado	Fracionada
NAT	Sergipe-SE	3	Refrigerado	Fracionada

Fonte: Autoria própria, 2023.

Todas as amostras coletadas para o estudo, estavam mantidas sob refrigeração no local da coleta, a marca LB estava mantida em sua embalagem original de fabricação, as marcas JE, CAT e NAT foram coletadas fracionadas e em embalagens de badejas de isopor com plástico PVC. Das 4 marcas, 3 são de fabricação do estado da Paraíba e 1 de fabricação no estado de Sergipe, todas comercializadas em mercados e padarias da cidade de João Pessoa- PB.

As amostras foram transportadas e acondicionadas em caixas térmicas até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos, onde foram mantidas sob refrigeração a 10°C até o momento de execução das análises.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As análises microbiológicas, foram realizadas semanalmente, sendo necessário um período de 2 semanas para uma conclusão final de cada lote de queijo coalho analisado, na primeira semana foram realizados a contagem de mesófilos, contagem de coliformes totais e contagem de coliformes termotolerantes, na segunda semana realizou-se os testes bioquímicos para verificar se havia ou não a presença da *Escherichia coli*. Para cada marca de queijo analisou-se 3 lotes de fabricação distintos, sendo necessário um período de 6 semanas de análises, para a conclusão final do estudo.

4.4 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a retirada da unidade analítica, foi realizada previamente a higienização das embalagens dos queijos com álcool 70% e a abertura das mesmas, com o auxílio de uma tesoura esterilizada. Em seguida, uma porção de 25 g de queijo coalho foi pesada e misturada a 225 mL de água peptonada a 0,1%, em um copo de liquidificador e triturada por 1 minuto obtendo-se a

diluição 10^{-1} . Logo após, esta mistura foi transferida para um frasco de diluição de 500 ml com tampa rosqueável, previamente autoclavado, e feita uma homogeneização manual em forma de arco, retirando-se uma alíquota de 1 mL com o auxílio de um pipetador automático, a qual foi transferida para um tubo com tampa rosqueável contendo 9 ml de água peptonada a 0,1%, previamente esterilizado, resultando-se na diluição 10^{-2} . Este mesmo procedimento foi repetido por várias vezes até a obtenção da diluição 10^{-6} , levando-se em consideração a agitação prévia dos tubos de diluição, antes da retirada das alíquotas de menor diluição para as de maior diluição das amostras em análise.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas as contagens de coliformes totais, termotolerantes e *Escherichia coli* utilizando-se o método do Número Mais Provável (NMP) (BLODGETT, 2010) e a Contagem Padrão em Placas para mesófilos foi realizada por UFC/g. Os métodos para realização das análises estão descritos no APHA (2015).

4.5.1 Contagem padrão em placas

A partir das diluições 10^{-1} a 10^{-6} , foram transferidas alíquotas de 1 mL para placas esterilizadas vazias. Em seguida, foi adicionado o ágar padrão para contagem (PCA), a 46°C - 48°C , fazendo a homogeneização da mistura com movimentos em oito. Após solidificação do meio as placas foram incubadas invertidas em estufa a 37°C por 48h. Para a leitura, foram selecionadas placas com 25-250 colônias, sendo a contagem realizada em contador mecânico e os resultados expressos em UFC/g.

4.5.2 Contagem de coliformes pelo método do NMP

a) Teste presuntivo

Três diluições das amostras (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram utilizadas na análise, sendo transferidas alíquotas de 1 mL para cada tubo contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) e um tubo de Durham, esse processo foi repetido 3 vezes, por diluição. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa a 35°C , por 24-48 horas. Foi considerado positivo tubos que apresentaram gás no interior do Tubo de Durham.

b) Teste confirmativo para coliformes totais

A partir dos tubos com produção de gás no teste presuntivo (caldo LST), foi transferida uma alçada para tubos com Caldo Bile Verde Brilhante (BVB). Em seguida, os tubos com caldo BVB foram incubados em estufa a 35° C, por 24-48 horas. Para a leitura, foram registrados os tubos positivos e consultada a Tabela do NMP.

c) Teste confirmativo para coliformes termotolerantes

A partir dos tubos com produção de gás no teste presuntivo (caldo LST), foi transferida uma alçada para tubos com caldo EC. Em seguida, os tubos com esse meio, foram incubados em banho-maria a 44,5° C, por 24-48 horas. Para a leitura, foram registrados os tubos positivos e consultada a Tabela do NMP.

4.5.3 Teste completo para detecção e contagem de *Escherichia coli*

4.5.3.1 Isolamento de *E. coli*

A partir dos tubos positivos, obtidos no teste confirmativo de coliformes termotolerantes, foi transferida uma alçada para placas com Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). Essas placas foram incubadas invertidas, por 24 horas a 35 °C. Após incubação, as placas foram examinadas quanto a presença de colônias típicas de *E. coli*, que se apresentam como colônias negras-azuladas no centro, com 2 – 3 mm de diâmetro, com bordas claras para transmitir luz, frequentemente com um brilho metálico verde com luz refletida.

4.5.3.2 Purificação das colônias típicas

Colônias típicas, bem isoladas de cada placa EMB, foram estriadas em placas de Ágar Padrão de Contagem (PCA) utilizando a técnica de estrias em quadrantes e incubadas à 35 °C por um período de 24 horas. A partir das colônias bem isoladas e puras em placas de PCA, foram transferidas para um tubo de ágar PCA inclinado, para a realização das provas bioquímicas de indol, VM, VP e Citrato (IMViC), bem como a verificação da produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), a formação de indol e a motilidade.

4.5.3.3 Testes bioquímicos- IMViC

a) Teste de Citrato

Com auxílio de uma agulha de platina retirou-se um pouco do material biológico de uma colônia isolada da cultura pura do tubo PCA e fez estrias levemente na superfície do tubo com meio ágar citrato de Simmons inclinado, incubando a 35° C por um período de 96 horas. A ocorrência de crescimento com viragem alcalina, alterando a cor do meio de verde para azul é

indicativo de teste positivo; o não crescimento e a não alteração da cor do meio indica teste negativo. As cepas de *E. coli* são citrato-negativas.

b) Teste de Indol

Inoculou-se uma alçada de cada cultura típica de *E. coli* em um tubo com caldo de triptona 1% e incubou-se por 24 ± 2 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. após incubação, foi adicionado 0,2-0,3 mL do reagente de Kovacs. O aparecimento de um anel de cor vermelha distinta na camada superior do meio de cultura é indicativo de resultado positivo. A *E. coli* pode ser Indol positivo ou negativo.

c) Teste VP e VM

Transferiu-se de um inóculo a partir de uma colônia isolada em ágar PCA da amostra para tubos contendo 4 mL de caldo VM-VP e incubou-se a $35^{\circ}\text{C} (+/- 2^{\circ}\text{C})$ por 48 h. Após incubação, foi transferido 1 mL do inóculo para um tubo, que foi adicionado de uma mistura de 0,6 mL de solução de α -naftol e 0,2 mL de KOH a 40%. Em seguida, o tubo foi agitado e mantido em repouso por 2 horas. A formação de cor rosa eosina no meio irá indicar teste VP positivo.

Para o teste VM, foram reincubados os tubos da cultura remanescente do caldo VM-VP por um período adicional de 48 horas, totalizando 96 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Após o período relatado, adicionou-se 5 gotas da solução de vermelho de metila a cada tubo do caldo excedente de VM-VP, observando instantaneamente se o meio apresentou a formação de coloração vermelha (VM positivo) ou amarelo (VM negativo). *E. coli* é VP negativo e VM positivo.

d) Teste de H₂S, Indol e Motilidade (SIM)

Com uma agulha estéril, retirou-se uma colônia isolada e inoculou-se com uma picada dentro do meio SIM com 1 cm do fundo do tubo, certificou-se de manter a agulha em uma linha reta, incubou-se a 37°C por um período de 48 horas até verificar crescimento evidente.

A Motilidade é caracterizada pela propagação do crescimento no meio, onde haverá uma migração dos organismos além da zona de inoculação, a produção de sulfeto de hidrogênio se caracteriza pela formação de um precipitado negro insolúvel, e para a verificação da presença de indol, adicionou-se algumas gotas de reagente Kovacs aos tubos, para verificar a formação de um anel de coloração no meio, sendo a formação da coloração rosa caracterizada como positivo e a formação da coloração amarela, como negativa.

4.6 ANÁLISE DE DADOS

Os dados obtidos dos experimentos foram analisados baseados no percentual de adequação de cada amostra analisada. Para discussão dos resultados de coliformes totais e termotolerantes usou-se os valores estabelecidos pela Portaria nº 146 de 1996, para discussão dos resultados da *Escherichia coli* usou-se os valores estabelecidos pela Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

5.5.1 Contagem padrão em placas

Na Tabela 2 podemos ver os resultados encontrados para a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, os resultados foram expressos em UFC/g.

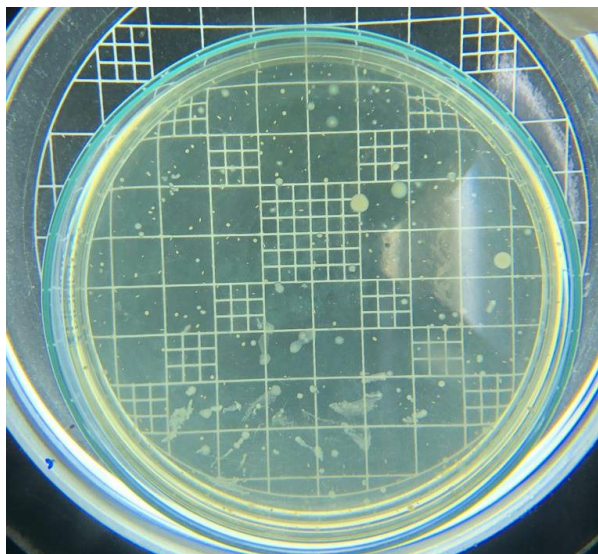
Tabela 2: Contagem Padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas nas amostras de queijo coalho.

CONTAGEM DE BACTÉRIAS (UFC/g)			
AMOSTRA	LOTE 1	LOTE 2	LOTE 3
LB	$9,10 \times 10^7$	$1,28 \times 10^9$	$1,70 \times 10^9$
JE	$8,70 \times 10^7$	$1,22 \times 10^8$	$1,65 \times 10^8$
CAT	$6,10 \times 10^7$	$2,25 \times 10^8$	$1,81 \times 10^8$
NAT	$7,00 \times 10^7$	$2,26 \times 10^8$	$1,12 \times 10^8$

Fonte: Autoria própria, 2023.

Observando os resultados para a contagem em placa de bactérias totais, todas as amostras (100%) de queijo coalho tiveram crescimento de bactérias mesófilas, cujos intervalos foram: **LB** ($9,10 \times 10^7$ - $1,70 \times 10^9$), **JE** ($8,70 \times 10^7$ - $1,65 \times 10^8$), **CAT** ($6,10 \times 10^7$ - $2,25 \times 10^8$) e **NAT** ($7,00 \times 10^7$ - $2,26 \times 10^8$). Embora não haja limite estabelecido na legislação para esses microrganismos, eles podem indicar falhas de higiene. Podemos observar na Figura 2, uma placa com as colônias formadas nesse estudo.

Figura 2- contagem de bactérias totais mesófilas



Fonte: Autoria própria, 2023.

Segundo Reis *et al.* (2006) a contagem de bactérias mesófilas é adotada principalmente para verificar as condições higiênicas-sanitárias no ambiente da indústria onde os alimentos são produzidos. Já Da Silva *et al.* (2017) descreve que os microrganismos aeróbios mesófilos podem ser usados também para avaliar a qualidade do produto, onde suas altas contagens podem indicar uma ineficiente sanitização, podendo ter falhas durante o processamento, além de uma matéria-prima de má qualidade.

Melo *et al.* (2013) fizeram um estudo avaliando a qualidade microbiológica do queijo coalho comercializado na região Norte do Ceará, e verificaram a presença dessas bactérias em todas as amostras analisadas, com contagens variando de $3,7 \times 10^3$ UFC/g a $1,3 \times 10^5$ UFC/g, eles concluíram que havia más condições de higiene durante a fabricação e manuseio dos queijos.

Balduino *et al.* (2021) também analisaram microrganismos mesófilos em queijo coalho comercializado em Lavras-MG, onde 100% das amostras analisadas tiveram a presença de bactérias mesófilas, variando de $2,03 \times 10^3$ a $3,8 \times 10^5$ UFC/g. Apesar da presença dos mesófilos, concluiu-se que todas as amostras estavam dentro dos padrões exigidos pela legislação.

Um estudo realizado por Carvalho (2015), analisando bactérias mesófilas em queijo minas frescal, mostrou que de 40 amostras avaliadas 26 (65,0%) apresentaram crescimento para esse grupo de bactérias, com as seguintes variações por amostra: A (5,70 a 7,23 log₁₀UFC/g), B (5,50 a 6,50 log₁₀UFC/g), C (7,11 a 8,11 log₁₀UFC/g), D (6,3 a 7,64 log₁₀UFC/g), E (7,15 a 8,21 log₁₀UFC/g), G (7,20 a 7,40 log₁₀UFC/g) e H (6,20 a 6,20 log₁₀UFC/g).

5.1.2 Contagem de coliformes totais e termotolerantes

Os resultados encontrados para as 12 amostras de queijo coalho para a contagem de coliformes totais e termotolerantes se encontram presentes na Tabela 3. Todas as amostras de queijo coalho avaliadas possuíam o SIF (Selo de Inspeção Federal), sendo assim, esses produtos são regularmente inspecionados por representantes do MAPA ou da Secretaria da Agricultura e todas as amostras devem seguir os padrões da legislação.

Tabela 3: Resultado das amostras analisadas para coliformes totais e termotolerantes.

Amostra	Coliformes (35°C) (NMP/g)	Coliformes (45°C) (NMP/g)
LB- LOTE 1	>1.100	>1.100
LB- LOTE 2	>1.100	>1.100
LB- LOTE 3	>1.100	>1.100
JE- LOTE 1	>1.100	>1.100
JE- LOTE 2	>1.100	>1.100
JE- LOTE 3	>1.100	>1.100
CAT- LOTE 1	>1.100	>1.100
CAT- LOTE 2	>1.100	>1.100
CAT- LOTE 3	>1.100	>1.100
NAT- LOTE 1	>1.100	>1.100
NAT- LOTE 2	>1.100	>1.100
NAT- LOTE 3	>1.100	>1.100

Fonte: Autoria própria, 2023.

De acordo com a Tabela 3, todas as amostras de queijo coalho analisadas estavam contaminadas com coliformes totais (35°C) e termotolerantes (45°C), em números acima de 1.100 NMP/g.

Com relação a legislação, a Portaria nº 146 de 1996, do Ministério de Agricultura (Brasil, 1996) estabelece limites máximos para coliformes totais e termotolerantes, variando de 1.000-10.000 e de 500-5.000, respectivamente, dependendo do teor de umidade do queijo. A legislação estabelece limites para queijos com umidade média variando de 36% a 46% e alta umidade de 46% a <55%. Considerando a ampla faixa de variação nesses padrões, não foi possível afirmar se os queijos analisados atendiam ou não ao padrão, tendo em vista que o teor

de umidade destes não foi determinado. Ainda, era preciso ter usado amostras mais diluídas para a obtenção de valores mais precisos, tendo em vista que com um resultado acima de 1.100, na Tabela do NMP, o intervalo de confiança se situa entre 420 – infinito. Podemos observar nas Figuras 3 e 4 a formação de gás nos tubos de EC e BVB.

Em outros estudos que também analisaram coliformes totais e termotolerantes em alimentos foram encontrados valores >1.100 NMP/g e apesar de não terem determinado a umidade dos queijos, os autores consideraram os produtos com esses números de coliformes insatisfatórios ao consumo (BEZERRA, 2017; TORRES, 2022.)

A presença de coliformes em altos níveis sugere que as condições higiênicas-sanitárias das amostras estudadas estavam insatisfatórias, podendo ser questionada a qualidade da matéria prima utilizada na fabricação desses queijos, a ausência de boas práticas de fabricação ou de falhas em sua aplicação, assim como as condições de armazenamento e transporte.

Figura 3 - Formação de gás nos tubos de BVB.



Fonte: Autoria própria, 2023

Figura 4 - Formação de gás nos tubos EC.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Ainda a presença de altos níveis de coliformes termotolerantes em alimentos nos mostra que houve falha no processo produtivo desse produto e indica que houve contato de material fecal com o alimento, podendo estar na matéria-prima, utensílios e equipamentos utilizados na fabricação e falta de higiene por parte dos manipuladores (GARCIA-CRUZ *et al.*, 1994).

Além do risco evidente que a alta contagem de coliformes pode representar à saúde do consumidor, ela também pode influenciar na qualidade sensorial do produto, trazendo problemas tecnológicos. Os queijos utilizados nesse estudo são de origem industrial, ou seja,

passam por processo de pasteurização. A presença de coliformes em queijos utilizando leite pasteurizado pode estar relacionado a falhas no processo de pasteurização e nas etapas seguintes a esse processo em sua fabricação (OLIVEIRA, 2017).

Fatores como alta umidade, ausência de maturação, alta atividade de água também influenciam no desenvolvimento de uma maior carga microbiana nesse tipo de queijo, além de diminuir seu tempo de vida útil. Apesar de coliformes serem sensíveis a temperaturas elevadas da pasteurização do leite, podem ser encontrados em queijos devido ao uso de leite cru ou de contaminações pós-processo de pasteurização (BELOTI *et al.*, 2015).

Diversos estudos analisaram coliformes em alimentos. Torres (2022) analisou 6 amostras de queijo coalho comercializadas na região de Recife-PE, e encontraram que as 6 amostras apresentavam contagens para coliformes totais variando de 3,6 NMP/g a >1.100 NMP/g e para coliformes termotolerantes de <3,0 a >1.100 NMP/g. Ele concluiu que apenas 1 marca de queijo estava apta para o consumo seguindo os padrões exigidos pela legislação. Santana *et al.* (2008) analisou amostras de queijo coalho comercializadas na região de Aracaju-SE, e encontraram coliformes totais de 8×10^2 NMP/g a $1,23 \times 10^4$ NMP/g e termotolerantes de $2,72 \times 10^2$ NMP/g a $1,12 \times 10^3$ NMP/g, o estudo concluiu que 93,3% apresentaram valores acima dos exigidos para coliformes termotolerantes, concluindo que os queijos estavam impróprios para o consumo.

Bezerra *et al.* (2017) analisou 20 amostras de queijo coalho comercializadas na região de Sousa-PB, e encontraram para coliformes totais 19 amostras com resultados >1.100 NMP/g e para coliformes termotolerantes variaram de <3 NMP/g a >1.100 NMP/g, concluindo que todas as amostras apresentaram contagens elevadas para coliformes totais e 35% apresentaram contagem acima do permitido para coliformes termotolerantes.

5.1.3 Detecção e contagem de *Escherichia coli*

Os resultados encontrados para a *Escherichia coli* nas amostras de queijo, estão dispostas na Tabela 4. Na Figura 5 vemos como se dá a formação das colônias com características típicas dessa bactéria no meio EMB.

Tabela 4: Resultado das amostras analisadas para *Escherichia coli*

Amostras	NMP/g
LB- LOTE 1	16

LB- LOTE 2	3,0
LB- LOTE 3	3,0
JE- LOTE 1	7,4
JE- LOTE 2	<3,0
JE- LOTE 3	<3,0
CAT- LOTE 1	4,0
CAT- LOTE 2	4,0
CAT- LOTE 3	<3,0
NAT- LOTE 1	<3,0
NAT- LOTE 2	<3,0
NAT- LOTE 3	<3,0

Fonte: Autoria própria,2023.

Figura 5 - Placa com colônias características da *E. coli*



Fonte: Câmara,2013.

Podemos observar nos resultados que das 12 amostras analisadas, 6 (50%) tiveram a ocorrência da *Escherichia coli* e 6 (50%) apresentaram resultado negativo para a mesma bactéria. Apesar de 50% dos queijos terem a ocorrência dessa bactéria todas as amostras estavam dentro do padrão exigido pela legislação, segundo a Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Nesta normativa, o limite máximo estabelecido para *E. coli* em queijos pode variar de 10^2 a 10^3 células/g, dependendo do teor de umidade do queijo.

Observando as amostras, a marca LB teve a ocorrência da *E. coli* em todos os lotes analisados, a marca JE em 1 lote, a marca CAT em 2 lotes e a marca NAT foi a única a não ter nenhuma ocorrência dessa bactéria. Segundo Barbosa (2015) Sendo o queijo coalho um alimento nutritivo com teor de nutrientes compatíveis com o desenvolvimento de

microrganismos, é necessário que seja mantido a cadeia de frio durante toda a sua estocagem, visto que mesmo tendo ocorrências em níveis baixos de *E. coli* elas podem se multiplicar e atingir níveis inaceitáveis.

Resultados semelhantes foram encontrados por Silva *et al.* (2012) ao analisar queijos coalhos produzidos no agreste do estado de Pernambuco. Esses autores confirmaram a presença da *Escherichia coli* em 100% das amostras, com valores variando de 1 NMP/g a 8,78 NMP/g, entretanto todos os queijos estavam dentro dos padrões estabelecidos pela legislação RDC N° 12/2001. Oliveira *et al.* (2010) realizaram um estudo com microrganismos indicadores de condições higiênicas sanitárias em queijos coalhos comercializados no município de Cabo de Santo Agostinho. Nesse estudo 89% das amostras analisadas estavam com valores superiores a 500 NMP/g para coliformes termotolerantes, sendo observado a presença da *E. coli* em 64,29% das amostras analisadas, variando de 23 NMP/g a ≥ 1.100 NMP/g.

Resultados diferentes foram encontrados por Magalhães *et al.* (2019) onde foram analisadas 24 amostras de queijo coalho comercializado em Manaus-AM, das quais 14 apresentaram contagens para *E. coli* superiores a 4×10^2 NMP/g. Bomfim *et al.* (2020) também analisou queijos coalhos comercializados em Vitória da Conquista-BA confirmando a presença de *E. coli* variando de 240 NMP/g a 1.100 NMP/g.

No estado do Ceará, também foi realizado estudos referentes a presença de coliformes fecais, onde Borges *et al.* (2003) ao analisarem 43 amostras de queijo coalho, concluíram que 74,4% das amostras continham níveis superiores aos padrões estabelecidos pela legislação vigente para coliformes termotolerantes, e teve confirmação para a *E. coli* em 93% das amostras avaliada, sendo 83,7% com valores variando de 3 NMP/g a 240 NMP/g e 9,3% com valores de 1.100 NMP/g a ≥ 2.400 NMP/g.

6 CONCLUSÃO

As análises microbiológicas realizadas nesse estudo concluíram que todas as amostras apresentaram crescimento para bactérias mesófilas, coliformes totais, coliformes termotolerantes e 50% tiveram ocorrências de *Escherichia coli*.

O crescimento de bactérias mesófilas variou de $6,10 \times 10^7$ UFC/g a $1,70 \times 10^9$ UFC/g, apesar de não ter na legislação valores limites para o crescimento dessa bactéria, seu crescimento e altas contagens é um fator relevante para a realização de um controle mais rígido quanto a higiene na produção, armazenamento e comercialização desses queijos.

Quanto a presença de coliformes totais e termotolerantes, todas as amostras tiveram valores >1.100 NMP/g. Por não ter sido determinado o teor de umidade, não se pode concluir se as amostras estavam em desacordo com a Portaria 146/96, do MAPA, visto que essa portaria considera o teor de umidade do queijo como fator relevante para os parâmetros microbiológicos, porém altos níveis de coliformes totais questiona a falta de boas práticas de fabricação e a presença em altos níveis de coliformes termotolerantes mostra que esses queijos tiveram contato com material fecal, reforçando a necessidade de os órgãos responsáveis pela fiscalização desse produto serem mais rigorosos, afim de garantir um produto com condições higiênico-sanitária mais satisfatórias.

A ocorrência da bactéria *Escherichia coli* esteve em 50% dos queijos analisados nesse estudo, variando de <3 NMP/g a 16 NMP/g, sendo esses valores dentro dos padrões estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, concluindo que essa bactéria nos valores encontrados não representa um risco para a saúde do consumidor.

Em resumo, todos os queijos coalho analisados estão em condições higiênicas-sanitárias insatisfatórias, podendo ter um melhor controle quanto as boas práticas na sua produção, transporte e armazenamento, se tratando de bactérias patogênicas *Escherichia coli* os queijos analisados não representam um risco para a saúde do consumidor, visto que seus valores estão em acordo com os estabelecidos na legislação.

REFERÊNCIAS

ABREU, A. G.; et al. Autotransporter roteínencoding genes of diarrheagenic *Escherichia coli* are found in both typical and atypical enteropathogenic *E. coli* strains. **Appl Environ Microbiol.** Jan; 79(1):411-4, 2013

ALVES, A. R. de F. **Doenças alimentares de origem bacteriana.** 2012. 87 p. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Fernando Pessoa Faculdade Ciências da Saúde.

APHA-American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 5th ed. Washington, 2015.

AQUINO, F.T.M. **Produção de queijo de coalho no Estado da Paraíba: acompanhamento das características físico-químicas do processamento.** 1983. 74f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

ARAUJO, Rayane Maria da Silva. **Pesquisa de coliformes totais e coliformes termotolerantes em queijos tipo coalho produzidos com leite cru na região do Agreste Paraibano.** 2017. TCC (Graduação em medicina veterinária) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2017.

BALDUINO, B.A.; VENÂNCIO, A.H.; OLIVEIRA, C.D.; PICCOLI, R.H. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos de coalho comercializados em Lavras-MG. **Congresso Internacional da agroindústria**, Lavras-MG, 2021, Disponível em: URL. Disponível em: <<https://ciagro.institutoidv.org/ciagro2021/uploads/1054.pdf>>. Acesso em 01 jun. 2023.

BARBOSA, VICTOR AUGUSTO ARAUJO. **Sobrevivência de *Escherichia coli* em queijo de coalho fabricado e mantido sob refrigeração, a partir de leite contaminado experimentalmente.** 2015. TCC (Graduação em zootecnia) - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2015.

BELOTI, V. *et al.* Enumeração de microrganismos psicrotróficos e termodúricos psicrotróficos de leite: comparação de metodologias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 1, p. 1723, 2015.

BEZERRA, Diego Ernani Leite *et al.* Avaliação microbiológica de queijo de coalho comercializado na feira livre de Sousa-Paraíba. **Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 37, p. 85-91, 2017.

Blodgett, R. 2010. Most Probable Number from Serial Dilutions. **Bacteriological Analytical Manual.** U.S. Food and Drug Administration.

BOMFIM, A. P.; COSTA, D. B.; SILVA, I. M. de N.; ARAÚJO, I. C. S.; ANDRADE, R. A.; GALVÃO, R. S.; CERQUEIRA, V. V.; REIS, J. N.; SANTOS, M. S. dos. Qualidade microbiológica e caracterização da resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos

Coalho comercializados em Vitória da Conquista-Bahia. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 27, p. e020015, 2020. DOI: 10.20396/san.v27i0.8656298. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8656298>. Acesso em: 29 mar. 2023.

BORGES, M.F.; FEITOSA, T.; NASSU, R.T.; MUNIZ, C.R.; AZEVEDO, E.H.F.; FIGUEIREDO, E.A.T. Microrganismos patogênicos e indicadores em queijo coalho produzido no Estado do Ceará, Brasil. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.21, n.1, p.31-40, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 30, de 26/06/2001. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijo de Coalho. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022. Padrões microbiológicos de alimentos. **Diário Oficial da União**. Brasília, 6 de julho de 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Mapa do Leite, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20o%20terceiro,de%204%20milh%C3%B5es%20de%20pessoas>>. Acesso em: 01 abr. 2023.

CARO, I.; MATEO, J.; RÚA, J.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. Occurrence of *Escherichia coli* O157, O111 and O26 in raw ewe's milk and performance of two enrichment broths and two plating media used for its assessment. **International Journal of Food Microbiology**.v.146p.84–87, 2011.

CARVALHO, Rhayane Idalyne. **Análise das condições microbiológicas de queijos minas frescal vendidos em João Pessoa-PB**. 2015. TCC (Graduação em Nutrição) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

CAVALCANTE, J.F.M. **queijo coalho Artesanal do Nordeste do Brasil**. Livro. Editora Banco do Nordeste S.A, 2017.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. 372 *FEMS Microbiology Reviews*.v.29, p.83–98,2005.

CORREIA, Marlene; RONCADA, Maria José. Análise microscópica dos queijos "prato", "mussarela" e "mineiro" comercializados em feiras livres da cidade de São Paulo, SP. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 296-301, 1997.

DANTAS, D. S. **Qualidade Microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município de Patos, PB**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) -Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campina Grande, 2012.

DA SILVA, Bruna Pamieli Pinto *et al.* Composição nutricional de queijo coalho vendido em feiras livres de São Luis–MA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 34043-34053, 2020.

DA SILVA, Neusely *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017.

DORES, M.T.; FERREIRA, C. L. F.; QUEIJO MINAS ARTESANAL, TRADIÇÃO CENTENÁRIA: AMEAÇAS E DESAFIOS. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, [S. l.], v. 2, n. 2, 2012. DOI: 10.21206/rbas. v2 i2.163. Disponível em: <<https://periodicos.ufv.br/rbas/article/view/2754>>. Acesso em: 28 mar. 2023.

ESCOBAR, C.A.M.; LEUTHIER, S.; ANTUNES, G.; *et al.* Avaliação dos pontos críticos na produção de queijo de coalho em Pernambuco. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.56, nº,321, p.248- 256, jul./ago.,2001.

Ferreira, W. C. e Sousa, J. C., 2002. Microbiologia – Volume 3, Lidel.

FERNANDES, Fábio. **Escherichia coli em queijos produzidos com leite cru**. Relatório de Estágio - Mestrado em Engenharia Alimentar. Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2017. Disponível em: <https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/20734/1/F%c3%a1bio_Fernandes__MEAL_Rel at%c3%b3rioEst%c3%a1gio_2017_3 .pdf> . Acesso em: 01 mai. 2023.

FRASER, M. E.; FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; MELTON-CELSA, A. R.; TWIDDY, E. M.; O'BRIEN, A. D.; JAMES, M. N. G. Structure of Shiga Toxin Type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. **The Journal of Biological Chemistry** v.279, n.26,p.27511–27517, 2004.

FREITAS FILHO, J.R.; SOUZA FILHO, J.S.; OLIVEIRA, H.B.; ANGELO, J.H.B.; BEZERRA, J.D.C. Avaliação da qualidade do queijo “coalho” artesanal fabricado em Jucati – PE. extensivo **Revista Eletrônica de Extensão**, v.6, n.8, p.35-49, 2009

FURTADO, M. M. **Fundamentos básicos da fabricação de queijos semi-cozidos**. Viçosa : UFV, 1989.

GARCIA-CRUZ, C.H.; HOFFMANN, F.L.; VINTURIM, T.M. Estudo microbiológico de queijo tipo minas-frescal de produção artesanal comercializado na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.54, n.2, p.78-82, 1994.

GOMES, RA; MEDEIROS, UKL; SILVA, FAP Caracterização físico-química dos Queijos de Coalho artesanais e industriais comercializados na cidade de Currais Novos/RN. In: **CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**, 2012, Palmas. IFTO, 2012. Disponível em: <<https://propi.ifto.edu.br/ocs/index.php/connepi/vii/paper/view/3305/0>>. Acesso em: 06 mai. 2023.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6 ed., Porto Alegre: Artmedia. 2005. 711p.

MAGALHÃES, L. S.; PEREIRA, E. M. de O.; NETO, P. de Q. C.; PANTOJA, M. C. Análises de coliformes em queijo coalho comercializado em Manaus-AM. **Scientia Amazonia**, v.8, n.1, p.1-5, 2019.

MELO, M. B. *et al.* Avaliação microbiológica do queijo do tipo coalho comercializado na cidade de Sobral, CE. **Higiene Alimentar**, v. 27, n. 222/223, p. 92-96, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doenças Transmitidas por Alimentos e Água (DTA), 2007. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/doencas-transmitidas-por-alimentos-e-agua-dta/>. Acesso em: 04 abr. 2023.

MUNHOZ, Isabela Gomes Alves *et al.* Análise microbiológica comparativa de queijo coalho comercializado em supermercados e feiras livres na Cidade de Maceió–Alagoas. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 10, n. 5, pág. e9410514582-e9410514582, 2021.

NASSU, Renata Tieko; MACEDO, Benemária Araújo; LIMA, Márcia Helena Portela. Queijo Coalho. **Coleção Agroindústria Familiar**, Brasília, v. 1, f. 45, 2006. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/117913/1/00077390.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2023.

OLIVEIRA, J.S. **PERFIL DOS CONSUMIDORES DE QUEIJO DO ESTADO DE PERNAMBUCO**. Artigo. Universidade Federal do Agreste de Pernambuco. Pernambuco, 2020.

OLIVEIRA, Aline Marangon *et al.* Condições higiênico-sanitárias da produção de queijos tipo mussarela e minas frescal comercializados no norte do Paraná. **Revista do instituto de laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 40-47, 2017.

OLIVEIRA, K.A.; EVÊNCIO NETO, J.; de PAIVA, J.E. *et al.* **Qualidade microbiológica do queijo de coalho comercializado no Município do Cabo de Santo Agostinho, Pernambuco, Brasil**. Arq. Inst. Biol., v.77, p.435-440, 2010.

Ordóñez, J. A., Rodríguez, M. I., Álvares, L. F., Sanz, M. L., Minguillón, G. D., Perales, L., Cortecero, M. D. (2005). Tecnologia de Alimentos volume 2. Alimentos de Origem Animal, Artmed editora S. A., Porto Alegre.

PERRY, Kátia SP. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos**. Química nova, v. 27, p. 293-300, 2004.

Pigatto CP, Schocken-Iturrino, RP, Fadel-Pichetch CMT, Chioda TP, Vittori J, Marin JM (2009) Viabilidade de *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (stec) não-o157 em queijo tipo minas frescal. **Ciência Animal Brasileira** 10: 663-668.

PINTO, M. S.; FERREIRA, C. L. de L. F.; MARTINS, J. M.; TEODORO, V. A. M.; PIRES, A. C. dos S.; FONTES, L. B. A.; VARGAS, P. I. R. **SEGURANÇA ALIMENTAR DO QUEIJO MINAS ARTESANAL DO SERRO, MINAS GERAIS, EM FUNÇÃO DA ADOÇÃO DE BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO**. **Pesquisa Agropecuária Tropical**,

Goiânia, v. 39, n. 4, p. 342–347, 2009. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/pat/article/view/4509>> Acesso em: 23 mar. 2023.

REIS, J.A.; HOFFMANN, P.; HOFFMANN, F.L. Ocorrência de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais, fecais e *Escherichia coli*, em amostras de águas minerais envasadas, comercializadas no município de São José do Rio Preto, SP. **Higiene Alimentar**, v.20, p.145, p.109-115, 2006.

RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*.v.44, n.5, 2002.

RYSER, E.T. & SCHUMAN, J.D. Mesophilic Aerobic Plate Count. In: SALFINGER, Y. & TORTORELLO, M.L. (eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th ed. **American Public Health Association**, Washington, D. C., 2015. Chapter 8, p.95-101.

SALES, W. B. *et al.* **Ocorrência de Coliformes Totais e Termotolerantes em pastéis fritos vendidos em bares no centro de Curitiba-PR**. Demetra: alimentação, nutrição & saúde, v. 10, n. 1, p. 77 – 85, 2015.

SANTOS, Jaline Guimarães. **Análise microbiológica do queijo coalho produzido por usuários da fazenda da esperança em Lagarto – Sergipe**. 2019. TCC (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2019.

SARAIVA, MC; DUTRA, S. Ângela; BARROSO, AB Controle de qualidade do queijo de coalho no Brasil: uma revisão. **Investigação, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 12, n. 3, pág. e13412340534, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i3.40534. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/40534>. Acesso em: 29 mar. 2023.

SCHEID FILHO, V.B.; ROOS, T.B.; OLIVEIRA, D.S.; TIMM, C.D. Contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas em queijo colonial. In: XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2004, Florianópolis. **Anais do XXII Congresso Brasileiro de Microbiologia**. 2004.

SILVA, Ana Flora Carvalho. **Potencial contaminante do queijo coalho: uma revisão**. 2016. TCC (Graduação em nutrição), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória, 2016.

SILVA, E.; MENDES, M. CARACTERÍSTICAS E PREVENÇÃO DA CONTAMINAÇÃO *ESCHERICHIA COLI*. **Revista Científica e-Locução**, v. 1, n. 22, p. 17, 19 dez. 2022.

SILVA, Roberto A. *et al.* Avaliação da microbiota bacteriana do queijo de coalho artesanal produzido na região Agreste do estado de Pernambuco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1732-1738, 2012.

SIQUEIRA, K. **Tendências de consumo de queijo coalho no Nordeste**. Revista MilkPoint, 2021.

SOUZA, C. de O. *et al.* **Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil**. Rev Pan-Amaz Saude, v. 7, n. 2, p. 79 – 91, 2016.

SPREER, E. Lactologia industrial. 2ed. Zagarosa: Ed. Acribiana, 1991. 617p

TEODORO, V. A. M.; SILVA, J. F.; PINTO, M. S. A. Evolução da legislação no setor de lácteos no Brasil. ***Informe Agropecuário***, Belo Horizonte, v. 28, n. 238, p. 14-21, 2007.