

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Suzana Horta Fonseca

***Campylobacter* spp.: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA qPCR E DETECÇÃO EM  
QUEIJO MINAS ARTESANAL**

**Belo Horizonte  
2023**

**Suzana Horta Fonseca**

***Campylobacter* spp.: VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA qPCR E DETECÇÃO EM  
QUEIJO MINAS ARTESANAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

**Orientador:** Professor Marcelo Resende de Souza

**Co-orientadores:** Professora Silvana de Vasconcelos Cançado e Professora Andréia Marçal da Silva.

Belo Horizonte - MG  
2023

Fonseca, Suzana Horta, 1972-  
F676v Validação de metodologia qPCR e detecção em queijo Minas artesanal/ Suzana Horta Fonseca. -2023.  
134f.:il

Orientador: Marcelo Resende de Souza  
Coorientadoras: Silvana de Vasconcelos Cançado  
Andréia Marçal da Silva

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.  
Inclui bibliografia

1. Queijo - Teses - 2. Alimentos - Contaminação - Teses - 3. Veterinária - Teses - I. Souza, Marcelo Resende de - II. Cançado, Silvana de Vasconcelos - III. Silva, Andréia Marçal da - IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - V. Título.

CDD - 637

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes - CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUZANA HORTA FONSECA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Aprovado(a) em 20 de novembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr. Marcelo Resende de Souza - Orientador  
Dra. Cláudia Freire de Andrade Morais Penna  
Dra. Bruna Maria Salotti de Souza  
Dra. Andréa Melo Garcia de Oliveira  
Dr. Ranier Chaves Figueiredo



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Resende de Souza**, Professor do Magistério Superior, em 21/11/2023, às 09:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Bruna Maria Salotti de Souza**, Professora do Magistério Superior, em 23/11/2023, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Andréa Melo Garcia de Oliveira**, Usuária Externa, em 24/11/2023, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Freire de Andrade Morais Penna**, Professora do Magistério Superior, em 27/11/2023, às 10:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Ranier Chaves Figueiredo**, Usuário Externo, em 14/12/2023, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2817669** e o código CRC **D22804F3**.

## AGRADECIMENTOS

Fazer um curso de doutorado sempre foi um sonho na minha vida, mas, ao mesmo tempo, sempre o enxerguei como um desafio enorme. Mas não imaginava que esse desafio fosse tão grande! O período do curso foi um dos mais conturbados em minha vida, tanto na área pessoal, quanto profissional, porém com alguns atrasos e muita paciência do meu orientador, consegui finalizá-lo!

À Deus pelas inspirações, oportunidades e força para enfrentar todos os desafios com coragem.

Aos meus pais, que me ensinaram todos os valores que tenho hoje, o amor pelos estudos e conhecimento.

À minha irmã Monica e sua família, que sempre me acompanham e me ajudam na vida.

À minha filha Marina, pela alegria em que entrou na minha vida, colocando tudo fora de ordem, mas, ao mesmo tempo, dando um sentido maior.

Aos meus colegas do laboratório da MIC, Flávia, Sérgio, Patrícia, Larissa e Cristiane, pelo apoio enorme em toda essa etapa, principalmente na parte prática. E à Rejane, pelo enorme apoio (e paciência!) no preparo de meios de cultura.

À Andrea e Mikael, coordenadores do LFDA/MG, que sempre me apoiaram e me encorajaram a terminar o curso.

Ao meu orientador Marcelo, pela bondade, paciência, disponibilidade e amizade durante todos esses anos.

Aos colegas João Paulo, Letícia e Ana Carolina pelo apoio nas análises físico-químicas e Gustavo pela ajuda nas análises estatísticas.

A todos os professores e colegas da pós-graduação, pela ótima convivência e aprendizados adquiridos.

À IDEXX, em nome da Andréa Leão Carneiro, pelo fornecimento dos kits *Campylobacter* e também pelo suporte técnico.

À Sheila Duque, do Laboratório de zoonoses bacterianas da Fiocruz, pelo fornecimento das cepas de *Campylobacter* e pela disponibilidade em ajudar também na parte técnica.

À Liliana e colegas do IMA, pela disponibilidade em ceder equipamento e tempo para as análises de toxinas estafilocócicas.

Finalmente, agradeço ao MAPA pela oportunidade dada a mim para a realização do curso.

## RESUMO

Os queijos Minas artesanais (QMA) caracterizam-se pela produção em pequena escala, utilizando leite oriundo da propriedade rural e seguindo técnicas tradicionais próprias de cada região. O QMA é tradicionalmente produzido no estado de Minas Gerais e tem sido cada vez mais valorizado e consumido. Devido à ausência do tratamento térmico na matéria prima, esse alimento pode veicular microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas, como *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp., trazendo risco à saúde do consumidor. Apesar da sua alta incidência em todo mundo, há uma escassez de dados sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. no Brasil, principalmente em produtos lácteos. Os kits disponíveis no comércio visam somente a detecção de *Campylobacter* em carne de frango e não são validados para produtos lácteos. Baseado nessas informações, este trabalho possui duas etapas: a primeira tem como objetivo validar um kit para a detecção de *Campylobacter* pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) em leite e queijos elaborados com leite cru; e a segunda, pesquisar a ocorrência de *Campylobacter* spp. e a qualidade microbiológica e físico-química de 60 QMA disponíveis no mercado, comparando entre aqueles produzidos com e sem inspeção. No primeiro experimento, o sistema BAX<sup>®</sup> qPCR foi testado em comparação com o método normalizado ISO 10272-1:2017 para os parâmetros de limite de detecção relativo, sensibilidade, veracidade relativa e taxa de falso positivo. Os resultados indicaram que os dois métodos apresentaram resultados equivalentes, quando se adicionou uma etapa de enriquecimento em caldo Bolton no sistema BAX<sup>®</sup>. No segundo experimento, os queijos foram analisados quanto a contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, bactérias ácido-láticas e presença de enterotoxinas estafilocócica, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp.; porcentagens de umidade, extrato seco total, gordura, cloreto e pH. Em relação à qualidade microbiológica, *Campylobacter*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* e enterotoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra. Somente os valores de contagem de coliformes foram significativamente ( $p < 0,05$ ) maiores para o grupo de QMA sem inspeção. Para as outras contagens, não se observou diferenças significativas. Em relação aos parâmetros físico-químicos, 85 % das amostras estavam com valores de umidade abaixo de 45,9 g/100 g nos queijos com inspeção, enquanto que para os queijos sem inspeção, somente 30 % apresentaram valores adequados, observando-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos. Esse resultado influencia os teores de extrato seco total e gordura, que também apresentaram diferença significativa. Menor teor de umidade reflete num tempo de maturação mais adequado, no entanto, altas contagens de coliforme totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, indicadores higiênicos-sanitários, foram encontradas nas amostras de QMA com e sem fiscalização governamental, demonstrando a necessidade de treinamentos constantes para a conscientização dos produtores quanto à importância das boas práticas de produção, desde a ordenha até a comercialização.

Palavras-chave: fiscalização, microbiologia, qualidade, saúde pública

## ABSTRACT

Artisanal Minas cheeses (QMA) are characterized by small-scale production, using milk from rural properties and following traditional techniques specific to each region. QMA is traditionally produced in the state of Minas Gerais and has been increasingly valued and consumed. Due to the lack of heat treatment in the raw material, this food can carry pathogenic microorganisms and/or their toxins, such as *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp., bringing risks to the consumer health. Despite its high incidence worldwide, there is a data shortage on the occurrence of *Campylobacter* spp. in Brazil, mainly in dairy products. Commercially available kits only aimed at detection of *Campylobacter* in chicken meat and are not validated for dairy products. Based on this information, this work has two stages: the first aims to validate a kit for detecting *Campylobacter* using the real-time PCR (qPCR) technique in milk and cheeses made from raw milk; and the second, to investigate the occurrence of *Campylobacter* spp. and the microbiological and physical-chemical quality of 60 QMA available on the market, comparing those produced with and without inspection. In the first experiment, the BAX® qPCR system was tested against the ISO 10272-1:2017 standardized method for the parameters of relative level of detection, sensitivity, relative trueness and false positive ratio. The results indicate that the two methods showed equivalent results when an enrichment step in Bolton broth was added to the BAX® system. In the second experiment, the cheeses were analyzed for counts of total coliforms, *E. coli*, coagulase positive *Staphylococcus*, lactic acid bacteria, and the presence of staphylococcal enterotoxins, *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, and *Campylobacter* spp.; percentage of moisture, total solids, fat contents, chloride and pH. Regarding microbiological quality, *Campylobacter*, *Salmonella*, *L. monocytogenes* and enterotoxins were not detected in any sample. Only the coliform count values were significantly ( $p < 0.05$ ) higher for the QMA group without inspection. For the other counts, no significant differences were observed. With regard to the physicochemical parameters, 85 % of the samples had moisture values below 45.9 g/100 g in the cheeses with inspection, while for the cheeses without inspection, only 30 % had adequate values, with a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the two groups. This result influenced the total dry extract and fat contents, which also showed a significant difference. Lower moisture content reflects a more suitable maturation time, however, high counts of total coliform, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positive, hygienic-sanitary indicators, were found in the QMA samples with and without government inspection, demonstrating the need for constant training to make producers aware of the importance of good production practices, from milking to marketing.

Keywords: inspection, microbiology, quality, public health

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Teste de limite de detecção, com e sem a inoculação de <i>C. jejuni</i> em amostras de leite cru, sem a detecção do microrganismo inoculado, utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	41
Tabela 2. Teste de limite de detecção, com a inoculação de valores elevados de <i>C. jejuni</i> com leite cru ou direto no caldo Preston, utilizando a metodologia qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ).....	41
Tabela 3. Teste de limite de detecção, com leite cru e leite UAT e inoculação de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> , utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	42
Tabela 4. Teste de limite de detecção de <i>Campylobacter</i> spp. em leite com tratamento térmico, utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	45
Tabela 5. Teste da influência do volume de inóculo da amostra fortificada com <i>C. jejuni</i> no resultado do BAX utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	45
Tabela 6. Teste da influência do sangue no caldo Preston sobre o resultado do BAX utilizando amostras fortificadas com <i>C. jejuni</i> e incubadas em caldo de enriquecimento sem adição de sangue equino, e analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	46
Tabela 7. Teste da influência do sangue no caldo Preston sobre a recuperação de <i>Campylobacter</i> spp. utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	46
Tabela 8. Estudo do limite de detecção, com a inoculação em diferentes concentrações de <i>C. jejuni</i> em amostras de leite, utilizando-se amostras pareadas, analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	48
Tabela 9. Resultado do estudo da sensibilidade, utilizando diferentes amostras de leite e QMA negativas e fortificadas com <i>Campylobacter</i> spp., utilizando-se amostras pareadas, e analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017).....	49
Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos com os métodos qPCR (sistema BAX <sup>®</sup> ) e método tradicional (ISO 10272-1:2017) para todas as amostras.....	50
Tabela 11 – Padrões microbiológicos para queijos estabelecidos pela ANVISA.....	67



Tabela 12 - Padrões microbiológicos para queijos de média umidade (umidade entre 36 % e 46 %) estabelecido pelo MAPA .....	67
Tabela 13 - Resultado das análises para detecção de <i>L. monocytogenes</i> em produtos de origem animal prontos para consumo do Serviço de Inspeção Federal, Brasil, no período de 2014 a 2021. ....	75
Tabela 14. Distribuição das amostras de acordo com a região de origem e selo de inspeção.	76
Tabela 15. Número e percentual de amostras de QMA, coletadas no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, que atenderam ou não a legislação vigente. ....	94
Tabela 16. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do pH dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte/MG .....	96
Tabela 17. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do pH dos QMA, separados por amostras que atenderam ou não a legislação para critérios microbiológicos .....	96
Tabela 18. Estimativa da média e desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de umidade (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG) .....	97
Tabela 19. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de umidade dos queijos, separados por amostras que atenderam ou não a legislação para critérios microbiológicos .....	98
Tabela 20. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de EST (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte /MG.....	99
Tabela 21. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de gordura (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte /MG.....	99
Tabela 22. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de gordura no extrato seco (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte /MG .....	100
Tabela 23. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de cloretos (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte /MG.....	101
Tabela 24. Estimativas das correlações entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte/MG .....	101

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma para aplicação das diferentes partes da série ISO 16140.....	35
Figura 2. Teste TTC em leite cru e leite UAT para observar a presença de substâncias inibidoras para o crescimento de microrganismos no leite.....	42
Figura 3. Placas de mCCDA inoculadas com amostras de leite cru com (A) e sem (B) adição de <i>C. jejuni</i> , após incubação em caldo Preston. ....	52
Figura 4. Placas de mCCDA inoculadas com amostras de QMA fortificadas com <i>C. jejuni</i> após incubação em caldo Preston. ....	52
Figura 5. Testes bioquímicos para identificação da espécie de <i>Campylobacter</i> segundo ISO 10272-1. Figura A - teste de acetato de indoxil. Figura B - teste de hidrólise do hipurato.....	53
Figura 6. Gráfico de um resultado positivo para <i>Campylobacter jejuni</i> (linha azul), mostrando um Ct 29,4, com uma curva exponencial de detecção do template.....	85
Figura 7. Gráfico do resultado da amostra, mostrando um Ct tardio, de 39,6 para <i>Campylobacter jejuni</i> (linha azul) e uma curva pequena. ....	85
Figura 8. Intervalo da contagem de Coliformes totais e <i>E. coli</i> em Log <sub>10</sub> UFC/g, comparando amostras de QMA com e sem inspeção, coletadas no comércio varejista da região Metropolitana de Minas Gerais .....	87
Figura 9. Intervalo da contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo em Log <sub>10</sub> UFC/g, comparando amostras de QMA com e sem inspeção, coletadas no comércio varejista da região Metropolitana de Minas Gerais .....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
AFNOR	<i>Association Française de Normalization</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Agricultural</i>
Aw	atividade de água
BAL	bactérias ácido-láticas
BAM/FDA	<i>Bacterial Analytical Manual / Food and Drug Administration</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
Ct	<i>threshold cicle</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTIPOA	Departamento de Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
ELFA	ensaio fluorescente ligado à enzima
ELISA	ensaios de imunoabsorção enzimática
EMATER	Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	enzimas beta-lactamases de espectro estendido
EST	extrato seco total
EUA	Estados Unidos da América
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FSIS	<i>Food Safety and Inspection Service</i>
GBS	Síndrome de Guillain-Barré
IMA	Instituto Mineiro de Agropecuária
IN	Instrução Normativa
IPHAN	Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional
ISO	International Standardization Organization
LAMP	amplificação isotérmica mediada por loop
LFDA	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
LOD <sub>50</sub>	limite/ nível de detecção em 50 % das amostras
LPS	sistema enzima lactoperoxidase
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
mCCDA	ágar <i>modified Charcoal-Cefoperazone Deoxycholate</i>
MLG/FSIS	<i>Microbiology Laboratory Guidebook / Food Safety and Inspection Service</i>
MDS	Sistema de detecção molecular
NORS	<i>National Outbreak Reporting System</i>
PCR	reação em cadeia polimerase
QMA	queijo Minas artesanal
qPCR	reação em cadeia polimerase em tempo real
QS	<i>quorum-sensing</i>

RNA	ácido ribonucleico
RTIQ	regulamentos técnicos de identidade e qualidade
SE	enterotoxinas de <i>Staphylococcus aureus</i>
SIM	Serviço de Inspeção Municipal
spp	espécies
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina Shiga
TTC	solução de 2,3,5 trifenil cloreto tetrazólio
UAT	ultra alta temperatura
UE	União Européia
UFC	unidades formadoras de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VNC	viáveis não cultiváveis

## SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	10
SUMÁRIO .....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	14
1.1. Referências .....	15
2. OBJETIVOS .....	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos .....	17
3. CAPÍTULO I: VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE qPCR PARA A DETECÇÃO DE <i>Campylobacter</i> spp. EM LEITES E DERIVADOS .....	18
3.1. Introdução .....	18
3.2. <i>Campylobacter</i> spp. e campilobacteriose.....	20
3.3. Ocorrência de <i>Campylobacter</i> spp. em leites e derivados.....	24
3.4. Isolamento e detecção .....	28
3.5. Verificação de método segundo a ISO 16140 .....	34
3.5.1. <i>Estudo do limite de detecção relativo</i> .....	34
3.5.2. <i>Estudo da sensibilidade</i> .....	36
3.5.3. <i>Contaminação artificial das amostras</i> .....	36
3.6. Material e métodos .....	37
3.6.1. <i>Preparo da fase estacionária</i> .....	37
3.6.2. <i>Seleção das matrizes</i> .....	37
3.6.3. <i>Contaminação artificial das amostras</i> .....	38

3.6.4.	<i>Metodologias utilizadas</i> .....	38
3.6.5.	<i>Estudo do limite de detecção relativo</i> .....	39
3.6.6.	<i>Estudo da sensibilidade</i> .....	40
3.6.7.	<i>Teste de TTC</i> .....	40
3.6.8.	<i>Análise dos dados</i> .....	40
3.7.	<b>Resultados e Discussão</b> .....	41
3.7.1.	<i>Estudo do limite de detecção relativo</i> .....	41
3.7.2.	<i>Estudo da sensibilidade</i> .....	49
3.7.3.	<i>Identificação das espécies</i> .....	52
3.8.	<b>Conclusão</b> .....	53
3.9.	<b>Referências</b> .....	54
4.	<b>CAPÍTULO II – OCORRÊNCIA DE <i>Campylobacter</i> spp. E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM QUEIJOS MINAS ARTESANAL</b> .....	62
4.1.	<b>Introdução</b> .....	62
4.2.	<b>Queijo Minas Artesanal (QMA)</b> .....	63
4.3.	<b>Qualidade microbiológica em queijos</b> .....	65
4.3.1.	<i>Legislação</i> .....	66
4.3.2.	<b>Microrganismos</b> .....	67
4.3.2.1.	<i>Coliformes e <i>Escherichia coli</i></i> .....	67
4.3.2.2.	<i>Staphylococcus spp. e enterotoxinas</i> .....	69
4.3.2.3.	<i>Salmonella</i> .....	72
4.3.2.4.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	74
4.4.	<b>Material e métodos</b> .....	76
4.4.1.	<i>Coleta de amostras e local de realização do experimento</i> .....	76
4.4.2.	<i>Análises microbiológicas</i> .....	77
4.4.2.1.	<i>Campylobacter spp.</i> .....	77
4.4.2.2.	<i>Staphylococcus coagulase positivo</i> .....	78

4.4.2.3.	Coliformes totais e <i>E. coli</i> .....	78
4.4.2.4.	<i>Salmonella</i> spp. ....	79
4.4.2.5.	<i>Listeria monocytogenes</i> .....	80
4.4.2.6.	Bactérias ácido-láticas.....	81
4.4.2.7.	Toxinas estafilocócicas .....	81
4.4.3.	<i>Análises físico-químicas</i> .....	81
4.4.3.1.	Teores percentuais de extrato seco total e umidade.....	82
4.4.3.2.	Teor de cloretos .....	82
4.4.3.3.	Teor de gordura e gordura no extrato seco .....	83
4.4.3.4.	pH.....	83
4.4.4.	<i>Análises estatísticas</i> .....	84
4.5.	Resultados e discussão.....	84
4.5.1.	<i>Deteção de Campylobacter</i> spp. ....	84
4.5.2.	<i>Qualidade microbiológica dos queijos segundo os parâmetros oficiais</i> .....	86
4.5.2.1.	Contagens de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> .....	86
4.5.2.2.	Contagens de <i>Staphylococcus</i> coagulase positivo e deteção de toxinas estafilocócicas .....	88
4.5.2.3.	Deteção de <i>Salmonella</i> spp. ....	90
4.5.2.4.	Deteção de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	91
4.5.2.5.	Contagem de bactérias lácticas .....	93
4.5.2.6.	Qualidade geral dos queijos.....	93
4.5.3.	<i>Qualidade Físico-química</i> .....	95
4.5.3.1.	pH.....	95
4.5.3.2.	Teor de umidade .....	96
4.5.3.3.	Teor percentual de extrato seco total.....	98
4.5.3.4.	Gordura .....	99
4.5.3.5.	Teor de cloretos .....	100

4.5.4.	<i>Correlações entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos queijos Minas artesanal</i> .....	101
4.6.	Conclusões .....	103
4.7.	Referências .....	103
5.	<b>CAPÍTULO III: FATORES RELACIONADOS À MATURAÇÃO DE QUEIJOS ARTESANAIS QUE APRESENTAM EFEITOS DELETÉRIOS SOBRE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS – UMA REVISÃO</b> .....	112
5.1.	Introdução .....	113
5.2.	Referencial teórico .....	114
5.2.1.	<i>Fatores que controlam a multiplicação de microrganismos</i> .....	114
5.2.2.	<i>Interação microbiana</i> .....	115
5.2.3.	<i>pH e ácidos orgânicos</i> .....	118
5.2.4.	<i>Potencial Redox</i> .....	119
5.2.5.	<i>Atividade de água</i> .....	120
5.2.6.	<i>Concentração de sal</i> .....	121
5.2.7.	<i>Adição de nitrato</i> .....	123
5.2.8.	<i>Temperatura de fabricação e maturação</i> .....	124
5.3.	Produção de queijos Minas artesanais.....	125
5.4.	Considerações finais .....	128
5.5.	Referências .....	128



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A preferência do consumidor por queijos artesanais produzidos com leite cru vem crescendo continuamente devido à sua intensidade e variação de sabor se comparado ao queijo de leite pasteurizado. O desenvolvimento do sabor e aroma no queijo de leite cru é regido principalmente pela variada microbiota endógena existente e enzimas naturais do leite (Sobral *et al.*, 2017). Em contrapartida, o uso do leite cru é um fator de risco para a segurança do produto e, portanto, é importante que os patógenos que podem ser veiculados por esta matéria prima sejam controlados durante e após o período mínimo de maturação (Campos, 2019).

A maturação é um fenômeno complexo, que envolve reações bioquímicas decorrentes da interação de microrganismos com o queijo e transformações físico-químicas consequentes desta atividade microbiana e da ação climática sobre os alimentos. Do ponto de vista sanitário, essas mudanças bioquímicas acarretam possíveis eliminações de microrganismos indesejáveis e contribuem para o estabelecimento de uma microbiota desejável que acrescente características peculiares de sabor, odor, cor e textura nos queijos (Sales, 2015; Figueiredo, 2018).

A presença de microrganismos, principalmente patogênicos, pode ser destacada como um dos principais obstáculos que envolvem a produção de queijos artesanais. A contaminação ocorre em função da falta de qualidade da matéria prima, tempo entre ordenha e fabricação, baixa qualidade da água e do soro-fermento, higiene do manipulador, tempos de maturação insuficientes e deficiências na higienização das instalações. Além disso, contaminação cruzada durante a manipulação e armazenamento do produto também pode ocorrer (Soares, 2014; Sales, 2015; Sobral *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2017).

Além dos microrganismos que estão previstos nos critérios de aceitação de qualidade microbiológica da legislação brasileira, existem outros patógenos que podem estar presentes nos alimentos, como a bactéria *Campylobacter* spp. *Campylobacter jejuni* é uma das bactérias mais envolvidas em surtos de origem alimentar em todo o mundo. A campilobacteriose é comumente associada ao consumo de carne de aves contaminadas, porém, existem relatos de vários surtos desta doença associados à ingestão de leite contaminado, em geral, por falhas no processo de pasteurização, ou mesmo pelo consumo de leite cru (Taylor *et al.*, 2013; Narcizo e Montanhini, 2014; Koski *et al.*, 2022; Rossi *et al.*, 2023).

Pelas exigências nutricionais e ambientais, o microrganismo *Campylobacter* necessita de um meio complexo para o desenvolvimento, o que dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente. Em culturas antigas, ou sob condições de cultivo adversas, suas células podem adquirir formas cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante e não são detectáveis por metodologias convencionais (Nachamkin *et al.*, 2008; Castro, 2015; Pitkanen e Hanninen, 2017).

Em função das dificuldades relacionadas às técnicas clássicas de isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., ensaios de biologia molecular são desenvolvidos com o objetivo de melhorar a detecção destes microrganismos em alimentos, além de reduzir o tempo com que a análise é realizada (Castro, 2015).

Apesar da alta incidência da campilobacteriose em todo mundo, esses microrganismos ainda não são considerados na legislação brasileira. Por isso, há uma escassez de dados sobre a ocorrência desses no Brasil, principalmente em produtos lácteos. Corroborando com esses fatos, os *kits* disponíveis comercialmente pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) são validados somente para a detecção de *Campylobacter* em carne de frango e peru, apesar dos estudos mostrando o aumento de surtos de campilobacteriose veiculados por produtos lácteos, principalmente aqueles produzidos com leite cru.

### 1.1. Referências

CAMPOS, G.Z. Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação. 2019. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

CASTRO, A.G.S.C. Detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas e congeladas por PCR em tempo real associada a propídio monoazida (PMA). 2015. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal.) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FIGUEIREDO, R. C. Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de queijo Minas artesanal de Serra do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano. 2018. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

KOSKI, L.; KISSELBURGH, H.; LANDSMAN, L.; HULKOWER, R.; HOWARD-WILLIAMS, M.; SALAH, Z.; KIM, S.; BRUCE, B.B.; BAZACO, M.C.; BATZ, M.B.; PARKER, C.C.; LEONARD, C.L.; DATTA, A.R.; WILLIAMS, E.N.; STAPLETON, G.S.;

PENN, M.; WHITHAM, H.K.; NICHOLS, M. Foodborne illness outbreaks linked to unpasteurised milk and relationship to changes in state laws – United States, 1998–2018. *Epidemiology and Infection*, 150, e183, p. 1-13, 2022. <https://doi.org/10.1017/S0950268822001649>

NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M.J. et al. *Campylobacter*. 3ª edição. Washington, DC: ASM Press. 2008.

NARCIZO, D.K; MONTANHINI, M.T.M. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em leite cru e pasteurizado comercializado em Curitiba, estado do Paraná, Brasil. *Revista do Instituto Cândido Tostes*, v. 69, n. 5, p. 341-347, 2014.

OLIVEIRA, C.A.F.; CORASSIN, C.H.; LEE1, S.H.I.; GONÇALVES, B.L.; BARANCELLI, G. V. Chapter 5 - Pathogenic Bacteria in Cheese, Their Implications for Human Health and Prevention Strategies. *Nutrients in Dairy and Their Implications for Health and Disease*. Academic Press, 2017.

PITKANEN, T.; HANNINEN, M-L. Members of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Global. Water Pathogens Project. Part 3 – Specific excreted pathogens: environmental and epidemiology aspects*. 2ª ed. 2017. 39 p. Disponível em: <http://www.waterpathogens.org> (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria)

ROSSI, F.; MATTO, I., MANOCCHIO, P.; SALETTI, M.A.; RICCHIUTI, L.; MARINO, L. Occurrence and survival of *Campylobacter* spp. in dairy matrices investigated by viability qPCR, *International Journal of Dairy Technology*, v. 76, n. 3, p. 572-582, 2023. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12953>

SALES, G. Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano. 2015. Dissertação (Mestrado em ciência animal.). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SOARES, D.B. Caracterização físico-química e microbiológica do queijo Minas artesanal na região de Uberlândia – MG. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SOBRAL, D.; COSTA, R.G.B.; PAULA, J.C.J.; TEODORO, V.A.M.; MOREIRA, G.M.; PINTO, M.S. Principais defeitos em queijo Minas artesanal: Uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v. 72, n. 2, p.108-120, 2017.

TAYLOR, E.V; HERMAN, K.M.; AILES, E.C.; FITZGERALD, C.; YODER, J.S; MAHON, B.E.; TAUXE, R.V. Common source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. *Epidemiology & Infection*, v. 141, p. 987-996, 2013.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Validar o Sistema Bax<sup>®</sup>, método comercial para detecção por qPCR de *Campylobacter* spp. em leite e queijos elaborados com leite cru e determinar a sua ocorrência em queijos Minas artesanais comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte, com e sem inspeção governamental.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de queijos Minas artesanais com e sem inspeção governamental comercializados na região metropolitana de Belo Horizonte.
- Analisar a qualidade microbiológica de QMA produzidos com leite cru incluindo a presença de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, coliformes totais e *Escherichia coli*, estafilococos coagulase positivo e suas toxinas, e bactérias ácido-láticas.
- Analisar a qualidade físico-química de QMA produzidos com leite cru incluindo a porcentagem de umidade, extrato seco total, gordura, cloreto e pH.
- Comparar a qualidade microbiológica e físico-química do QMA inspecionado em relação ao queijo Minas artesanal sem inspeção.
- Relacionar os parâmetros físico-químicos dos queijos com os resultados microbiológicos encontrados.

### 3. CAPÍTULO I: VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE qPCR PARA A DETECÇÃO DE *Campylobacter* spp. EM LEITES E DERIVADOS

#### 3.1. Introdução

Os microrganismos do gênero *Campylobacter* são bastonetes finos espiralados em forma de vírgula, Gram-negativo, microaerófilos, não hemolíticos, não esporulados e suas colônias frequentemente não são pigmentadas. Eles são móveis e apresentam movimento característico de saca-rolhas realizado por meio de um único flagelo polar desembainhado em uma ou ambas extremidades da célula (Ministério da saúde, 2011; Silva *et al.*, 2017).

Atualmente, o gênero *Campylobacter* é composto de 32 espécies, 9 subespécies e 4 biovars (Soto-Beltran *et al.*, 2023). As espécies normalmente associadas com gastroenterites agudas veiculadas por alimentos são *C. jejuni* ssp. *jejuni* (95 % dos casos), *C. coli* (5 % das infecções), *C. lari* e *C. upsaliensis*, que constituem um grupo distinto no gênero, chamado de termotolerantes (Silva *et al.*, 2017; Chlebicz e Slizewska, 2018; Parte, 2020).

No mundo todo, espécies patogênicas de *Campylobacter* são responsáveis por causar infecções em mais de 400-500 milhões de pessoas por ano (Igwaran e Okoh, 2019). A infecção causada por *Campylobacter* spp. é considerada uma zoonose por ser uma doença que tem como reservatórios animais selvagens e domésticos (Santos, 2016; Chlebicz e Slizewska, 2018).

A campilobacteriose é comumente associada ao consumo de carne de aves contaminadas; porém, existem relatos de vários surtos desta doença associados à ingestão de leite contaminado, em geral pelo consumo de leite cru, ou mesmo por falhas no processo de pasteurização (Taylor *et al.*, 2013; Narcizo e Montanhini, 2014; Golz *et al.*, 2018; Chon *et al.*, 2020).

Métodos de cultivos para a detecção de patógenos transmitidos por alimentos são utilizados há muitos anos para avaliar a segurança de um alimento. Eles provavelmente continuarão sendo o padrão-ouro, porque são simples e baratos, possuem a capacidade de distinguir entre células mortas e viáveis e também são ferramentas adequadas para enumeração. No entanto, esforços contínuos têm sido empreendidos para melhorar esses métodos. Novas formulações de meios buscam solucionar os quatro problemas mais comuns quando o cultivo bacteriano é

realizado: (1) supressão insuficiente da microbiota competitiva, (2) dificuldades em distinguir a morfologia da colônia e aparência de bactérias alvo de não-alvo, (3) procedimentos de enriquecimento e longo tempo de incubação e (4) grande quantidade de trabalho de bancada. Curiosamente, os métodos de cultivos são os mais utilizados para detecção de patógenos em indústrias alimentícias europeias, com participação superior a 60%, enquanto representam menos de 10% na América do Norte (Rohde *et al.*, 2017).

Embora os métodos convencionais de cultivo sejam comumente usados como padrão, várias técnicas de detecção rápidas e sensíveis, como imunoensaios e baseados em ácidos nucleicos, foram desenvolvidas (Chon *et al.*, 2020). Com o desenvolvimento desses métodos rápidos, foi identificada pela União Europeia (UE) a necessidade de estudos para validá-los. Eles devem fornecer resultados mais rápidos em relação aos métodos tradicionais de cultura, serem eficientes, mais sensíveis e com bom custo-benefício. Em 2003, o protocolo de validação para métodos microbiológicos alternativos foi aprovado pela *International Organization for Standardization* (ISO), com a publicação da norma ISO 16140:2003. Esse documento foi revisado e uma nova versão foi emitida em 2016 (ISO/TC 34, 2021).

Para que esses métodos rápidos alternativos sejam aceitos pelas autoridades governamentais, esses devem ser validados em relação a um método de referência, usando o protocolo estabelecido na norma EN/ISO 16140 ou outros protocolos similares internacionalmente aceitos. Os organismos certificadores da União Europeia são a *Association Française de Normalization* (AFNOR), Microval e Nordval (ISO/TC 34, 2021) e, nos Estados Unidos, a *Association of Official Agricultural Chemists* (AOAC).

Todos os métodos alternativos para a detecção de *Campylobacter* spp. disponíveis no mercado possuem certificado de validação para carne de frango e produtos cárneos, mas não contemplam matrizes lácteas, como leite cru e queijos. O objetivo desse capítulo foi validar o Sistema Bax<sup>®</sup>, método comercial para detecção por qPCR de *Campylobacter* spp. em leite e queijos elaborados com leite cru através do estudo comparativo do limite de detecção relativo e da sensibilidade do método de qPCR pelo sistema BAX<sup>®</sup>, com o método tradicional ISO 10272-1, para as matrizes leite cru e queijo produzido com leite cru, seguindo o protocolo de validação da ISO 16140-2 de 2016.

### 3.2. *Campylobacter* spp. e campilobacteriose

A característica mais marcante do gênero *Campylobacter* é a microaerofilia, requerendo baixa tensão de oxigênio para sua multiplicação com metabolismo respiratório para obtenção de energia. O crescimento é inibido quando a concentração de O<sub>2</sub> é menor que 3 % e maior que 15 %, sendo a concentração ideal de 5%. Além disso, são também capnofílicos, ou seja, requerem entre 3 e 15 % de CO<sub>2</sub> para sua multiplicação (Ministério da saúde, 2011; Silva *et al.*, 2017). O pH ideal para o crescimento é de 6,5 a 7,5, e esses microrganismos não se multiplicam abaixo de pH 4,9. A sobrevivência em valores de pH ácido depende da temperatura, e a inativação é rápida em valores de pH inferiores a 4,0, especialmente em temperaturas de refrigeração (Whyte *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2017).

Esses microrganismos não fermentam nem oxidam carboidratos, sendo a energia obtida de aminoácidos ou de componentes intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico. Pelas exigências nutricionais e ambientais, necessitam de um meio complexo para o desenvolvimento, o que dificulta a sobrevivência fora do ambiente intestinal dos animais de sangue quente. Sob condições de cultivo adversas, suas células podem adquirir formas cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem levar à perda de seu poder infectante. A transição da morfologia celular espiralada para uma forma cocóide ocorre na fase estacionária do crescimento e, durante esse processo, essas bactérias não são detectáveis por metodologias convencionais estando na forma viáveis não cultiváveis (VNC). As formas VNC são induzidas por fatores como, por exemplo, o estresse causado por escassez de nutrientes no meio ou por temperatura inadequada para crescimento. Segundo diversos autores, essa transição morfológica representa uma estratégia de sobrevivência do microrganismo (Nachamkin *et al.*, 2008; Castro, 2015; Pitkanen e Hanninen, 2017).

Outro recurso que permite sobrevivência de *Campylobacter* spp. em condições desfavoráveis é sua capacidade de formar um biofilme em superfícies, mesmo no estado VNC, o que garante o fornecimento de nutrientes e proteção mecânica, mesmo que não possam crescer (Chlebicz e Slizewska, 2018; Gölz *et al.*, 2018; Tram *et al.*, 2020). O ambiente em que *C. jejuni* se encontra desempenha um papel importante no desencadeamento da formação de biofilme. As capacidades de produção de energia, saturação de oxigênio, metabólitos e disponibilidade de nutrientes servem como sinais para mudar *C. jejuni* de formas planctônicas livre para o estado de biofilme. Ao contrário dos biofilmes formados por outros patógenos, as condições que

desencadeiam a formação do biofilme em *C. jejuni* não parecem estar correlacionadas com os fatores necessários para a virulência e sim como um fator de sobrevivência (Tram *et al.*, 2020).

A formação de biofilmes, assim como motilidade, é influenciada por *quorum-sensing* (QS). QS é uma forma de comunicação célula a célula por meio de pequenas moléculas, chamadas de autoindutores, por meio das quais as bactérias regulam suas respostas celulares de acordo com a densidade celular e, portanto, estão relacionadas ao comportamento da população como um todo. O sistema QS mais estudado em *C. jejuni* é o controlado pelas moléculas sinalizadoras autoindutora 2 (AI-2) mediado pelo gene LuxS (Šimunovic *et al.*, 2020; Tram *et al.*, 2020).

Embora *Campylobacter* seja uma das causas mais comuns de diarreia associada a alimentos em todo o mundo, os mecanismos moleculares exatos da patogênese, infecção humana e colonização em animais ainda não foram totalmente esclarecidos (Kreling *et al.*, 2020).

Os sintomas clínicos mais comuns incluem diarreia (frequentemente com sangue), dor abdominal, febre, dor de cabeça, náusea e/ou vômito. Esses sintomas geralmente persistem por três a seis dias. A morte por campilobacteriose é rara e geralmente ocorre em crianças muito jovens ou pacientes idosos, ou em imunocomprometidos, como a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) (WHO, 2020). A infecção por *Campylobacter* depende dos fatores do hospedeiro e do patógeno, sendo considerada uma doença autolimitante com permanência de um a sete dias, afetando os intestinos grosso e delgado. O microrganismo é excretado nas fezes durante várias semanas após terem cessado os sintomas (Ministério da saúde, 2011).

Complicações não são comuns, embora possa ocorrer bacteremia e infecção em outros órgãos, como hepatite, pancreatite, meningite e aborto. Há ainda relatos de complicações pós-infecção, que podem incluir artrite reativa, síndrome urêmica hemolítica e distúrbios neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré - GBS (WHO, 2020). Anticorpos humanos reagem de forma cruzada entre lipooligossacarídeos sialilados de *C. jejuni* e gangliosídeos humanos. Este mimetismo molecular de *C. jejuni* leva a condições autoimunes neurodegenerativas caracterizadas por fraqueza dos membros e, em alguns casos, paralisia devido a danos nos nervos. A proporção de infecções por *C. jejuni* que levam ao aparecimento



de GBS é considerada, em média, relativamente baixa em 0,07 %, e o desenvolvimento de sintomas graves em surtos de GBS pode variar amplamente em todo o mundo (Soto-Beltran *et al.*, 2023)

O início da doença causada por *Campylobacter* spp., denominada campilobacteriose, ocorre geralmente de dois a cinco dias após a infecção, mas pode variar de um a dez dias (WHO, 2020). Embora os microrganismos não se multipliquem a temperatura ambiente, uma pequena dose infecciosa (500 células) pode causar infecção (Ministério da saúde, 2011; Chlebicz e Slizewska, 2018). Tribble *et al.* (2010) concluíram que a dose infectante pode ser bem baixa, 100 células de *Campylobacter* já pode causar infecção em humanos. Além disso, foi observado que o período de incubação diminui e a gravidade dos sintomas aumenta com o aumento da dose infectante.

Em 2019, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos (EUA) identificou 25.866 casos de infecção, 6.164 hospitalizações e 122 óbitos. A incidência geral de doenças transmitidas por alimentos por 100.000 habitantes foi maior para *Campylobacter* (19,5), seguida por *Salmonella* (17,1), *Escherichia coli* STEC (6,3), *Shigella* (4,8), *Cyclospora* (1,5), *Yersinia* (1,4), *Vibrio* (0,9) e *Listeria* (0,3). Em comparação com o período de 2016 a 2018, a incidência em 2019 aumentou significativamente para *Cyclospora* (1.209%), *Yersinia* (153%), *Vibrio* (79%), *E. coli* STEC (34%) e *Campylobacter* (13%) (Tack *et al.*, 2020).

Informações publicadas pela agência *European Food Safety Authority* (EFSA) destacam que *Campylobacter* também é o patógeno bacteriano gastrointestinal mais comumente descrito na União Europeia (UE) desde 2005. O número de casos confirmados de campilobacteriose humana da UE foi de 220.682, com taxa de notificação de 59,7 por 100.000 habitantes. Essa tendência permanece estável desde 2015. Em 2019, *Campylobacter* foi o terceiro agente mais frequente de surtos com 319 surtos, envolvendo 1254 casos de doenças e 125 hospitalizações. As fontes mais comuns foram carne de frango e leite, como nos anos anteriores (EFSA, 2021).

No Brasil, *Campylobacter* spp. não é indicado entre os agentes etiológicos causadores de doenças transmitidas por alimentos (Ministério da saúde, 2020). Um primeiro surto por *C. jejuni* conhecido no Brasil, associado a frango contaminado, foi descrito em 2017 no

município de Cascavel – PR. Duas crianças com 7 e 10 anos apresentaram episódio diarreico após 9 e 12 horas de ingestão de um frango, sendo que uma das crianças apresentou quadro neurológico após uma semana dos sintomas iniciais. O microrganismo foi isolado das fezes das duas crianças e do frango (Ferreira *et al.*, 2018). No final de 2019 e início de 2020, um surto envolvendo 58 pessoas de uma escola, a maioria crianças (81 %) causou dois óbitos no município de Santa Maria – RS. Os resultados laboratoriais identificaram dois agentes bacterianos: *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* (cinco amostras clínicas) e *Escherichia coli* O157 produtora de toxina Shiga - STEC (uma amostra clínica). Ainda que a *E. coli* O157 tenha sido detectada em apenas um caso, os sintomas apresentados pelos doentes e evolução de dois casos para óbito (insuficiência renal aguda, plaquetopenia, diarreia sanguinolenta e êmese sanguinolenta) foram compatíveis com manifestações clínicas associadas a esse microrganismo. Foi concluído que o surto foi causado por *E. coli* O157 em associação a *Campylobacter jejuni*. Não foi identificada a fonte de transmissão dos microrganismos (Nota Informativa, 2020).

Em países desenvolvidos, a gastroenterite causada por *Campylobacter* é mais frequente nos meses quentes, em que são afetados todos os grupos étnicos de ambos os sexos, sendo a carne de ave malcozida o principal veículo. Por outro lado, em países em desenvolvimento, as infecções por *Campylobacter* em crianças com menos de dois anos de idade são especialmente frequentes, resultando por vezes em morte. As espécies *C. jejuni* e *C. coli* são agentes causais importantes de diarreias agudas de viajantes que visitam regiões em desenvolvimento (Ministério da saúde, 2011).

A infecção causada por *Campylobacter* spp. é considerada uma zoonose por ser uma doença que tem como reservatórios animais selvagens e domésticos (Santos, 2016; Chlebicz e Slizewska, 2018) e também podem ocorrer como comensais em humanos (Nachamkin *et al.*, 2008). As espécies de *Campylobacter* são associadas a animais de sangue quente, sendo comensais do trato gastrintestinal de bovinos, suínos, ovinos, felinos, cães, roedores silvestres e domésticos, aves domésticas e pássaros. Foi demonstrado que um grande percentual dos animais de abate possui esse microrganismo nas fezes (Ministério da saúde, 2011). Acredita-se que a principal rota de transmissão seja de origem alimentar, via carne e produtos cárneos malcozidos ou crus, bem como leite cru ou contaminado. Água contaminada ou gelo também é uma fonte de infecção (WHO, 2020).

### 3.3. Ocorrência de *Campylobacter* spp. em leites e derivados

A campilobacteriose é comumente associada ao consumo de carne de aves contaminadas; porém, existem relatos de vários surtos desta doença associados à ingestão de leite contaminado, em geral pelo consumo de leite cru, ou mesmo por falhas no processo de pasteurização (Taylor *et al.*, 2013; Narcizo e Montanhini, 2014; Golz *et al.*, 2018). A pasteurização inativa *Campylobacter* spp. em poucos segundos, porém a bactéria é bastante resistente a temperaturas mais baixas, na verdade ela não se multiplica, mas é capaz de sobreviver por várias semanas em leite e água refrigerados (Chlebicz e Slizewska, 2018; Razzuoli *et al.*, 2018).

Desde 1998, o consumo de leite cru tem sido a fonte mais importante de surtos de campilobacteriose nos EUA, Canadá e Europa (Gharst *et al.*, 2013; Del Collo *et al.*, 2017). O leite cru pode ser contaminado por *Campylobacter* spp. por diferentes fontes, pois *Campylobacter* é ubíquo em fazendas de gado e laticínios. Máquinas com limpeza deficiente (em países onde o comércio de leite cru é liberado dessa forma), mastites em bovinos e, principalmente, a contaminação ambiental de fezes durante a ordenha ou após, devido a condições higiênicas inadequadas durante o seu armazenamento e manuseio, representam causas documentadas de contaminação do leite durante estudos de surtos (El-Zamkan, 2016, Del Collo *et al.*, 2017, Andrzejewska *et al.*, 2019; Admasie *et al.*, 2023). Estudos mostram que a limpeza dos úberes e tetos das vacas com água morna nas fazendas reduz significativamente a probabilidade de detecção de *Campylobacter* no leite (Admasie *et al.*, 2023).

Vacas leiteiras são reservatórios conhecidos de *Campylobacter* spp., e várias pesquisas determinaram a frequência de *Campylobacter* spp. em fazendas leiteiras nos EUA. De acordo com o Sistema Nacional de Monitoramento de Saúde Animal dos EUA, em estudos de amostragem fecal das vacas para a avaliação da frequência de *Campylobacter* spp. em granjas leiteiras durante os anos de 1996, 2002 e 2007, *Campylobacter* spp., principalmente *C. jejuni*, foi encontrado em praticamente todas (90–100 %) as granjas produtoras de leite (USDA-APHIS, 2011; Del Collo *et al.*, 2017). Vacas leiteiras foram descritas como reservatórios intermitentes; esses animais também podem liberar *C. jejuni* consistente ou esporadicamente em altas concentrações (Del Collo *et al.*, 2017; Chlebicz e Slizewska, 2018). Há poucos estudos relacionados à ocorrência de *Campylobacter* em fazendas leiteiras no Brasil. Silveira

*et al.* (2021), durante estudo da presença de *Campylobacter* e *Salmonella* em 12 fazendas leiteiras localizadas no sul do Rio Grande do Sul, detectou *Campylobacter* em três amostras (3/60; 0,05%) de fezes de vacas de uma mesma propriedade, sendo um dos isolados identificado como *C. jejuni*. Outro estudo sobre a ocorrência de *Campylobacter* spp. no abate de bovinos e cortes refrigerados comercializados na cidade de São Paulo/SP detectou *C. jejuni* em 22, 7 % de amostras de couro bovino (45 amostras num total de 198), e o microrganismo não foi detectado nas 100 amostras de carne bovina (Lopes, 2009).

Existe um aumento no consumo de leite cru em todo mundo, como resultado de seus benefícios na saúde, quando comparado com o leite pasteurizado (Claeys *et al.*, 2013; Andrzejewska *et al.*, 2019; Igwaran e Okoh, 2019). O consumo de leite cru não está bem documentado, mas no contexto da tendência atual de "consumo natural" e "comprando localmente", está se tornando mais popular. Isso é causado pela percepção de que o aquecimento do leite compromete os benefícios nutricionais e de saúde e podem até induzir a alguns efeitos prejudiciais (Claeys *et al.*, 2013, Costard *et al.*, 2017)

Em vários países a venda de leite cru é liberada. Na Polônia, o consumidor pode adquirir o leite cru a partir dos produtores ou em máquinas de venda automática (Andrzejewska *et al.*, 2019). Nos EUA, embora o governo federal permita que apenas o leite pasteurizado tipo A seja vendido aos consumidores, 31 estados permitem que os consumidores comprem leite cru diretamente do produtor. Em muitos estados, o leite cru só pode ser comprado na fazenda, nos mercados dos agricultores ou por meio de um programa de "compartilhamento de vacas", nos quais os consumidores combinam recursos para comprar uma vaca leiteira; no entanto, em 12 estados, os consumidores podem comprar leite cru em lojas de varejo (Del Collo *et al.*, 2017).

No Brasil, apesar da proibição legal imposta à comercialização do leite cru pela Lei nº 1.283 de 18/12/1950 e pelo Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 (Brasil, 1950; Brasil, 1952), a venda deste tipo de leite é realizada em várias cidades do país. A comercialização do leite cru é um problema social, econômico e de saúde pública, pois o leite vendido clandestinamente gera um grande risco a saúde do consumidor, já que é um produto ausente de qualquer tipo de fiscalização. O crescimento do consumo dos produtos lácteos informais é bastante acentuado entre a população de baixa renda (De Longhi *et al.*, 2009). O governo está sempre gerando alertas a população sobre o risco à saúde pelo consumo de leite cru (MAPA, 2019; CIDASC,

2021), mas essas recomendações não alcançam aquela população de baixa renda que muitas vezes não tem acesso às informações.

A frequência de detecção de bactérias patogênicas no leite do tanque varia entre estudos e pode estar relacionada a aspectos geográficos (ambientais), diferenças de estação, tamanho da fazenda, densidade das populações animais e diferenças regionais na gestão e criação de gado leiteiro, variação na amostragem e tipos de amostras avaliadas, diferenças em metodologias de detecção utilizadas, etc. (Oliver *et al.*, 2005; Barata *et al.*, 2022). Com relação à ocorrência de *C. jejuni*, frequências de 0 a 6% foram relatadas na Europa para leite de vaca cru (Claeys *et al.*, 2013). Barata *et al.* (2022) encontraram uma prevalência de 4 % de *Campylobacter* spp. em amostras de leite de tanque em fazendas de Portugal no período de onze meses, sendo que todas as amostras positivas foram coletadas nos meses de verão. A prevalência média de detecção de *C. jejuni* no leite do tanque a granel foi de 6 % (intervalo de confiança de 95%, 3,2 – 10,9 %) em estudos realizados nos EUA, entre 2001 e 2017 (Williams, *et al.*, 2023). No Brasil, um estudo foi realizado em 548 amostras de leite cru de 125 fazendas leiteiras em duas regiões do sul do País, sendo que a frequência encontrada para *C. jejuni* foi de 1,7 %. Uma possível explicação para esse valor baixo é que a prevalência de *C. jejuni* em ruminantes é maior no verão e as amostras foram tiradas no inverno (Cerva *et al.*, 2014).

Um estudo durante um surto causado pelo consumo de leite cru na Finlândia identificou uma contaminação persistente de *C. jejuni* no tanque por sete meses ou mais, apesar do monitoramento de todos procedimentos adequados de higiene. Essa cepa foi identificada e estudada, mostrando uma capacidade de sobreviver no leite cru por 4 a 6 dias, tempo maior que em outras cepas (3 dias) e capacidade de formar biofilmes (Jaakkonen *et al.*, 2020).

Estudos mostram a presença de *Campylobacter* em leite cru (Modi, 2015; El-Zamkan e Abdel Hameed, 2016, Kashoma *et al.*, 2016; Kobayashi *et al.*, 2017; Andrzejewska *et al.*, 2019; Barata *et al.*, 2022), inclusive no Brasil (Narcizo e Montanhini, 2014; Kobayashi *et al.*, 2017). Narcizo e Montanhini (2014) estudaram a presença de *C. jejuni* em leites pasteurizados e crus na região metropolitana de Curitiba (PR). Quinze amostras de leite pasteurizado foram coletadas aleatoriamente em diferentes pontos de venda e quinze amostras de leite cru diretamente em propriedades leiteiras e de comerciantes de leite cru. Não foi detectada a presença de *C. jejuni* nas amostras de leite pasteurizado, enquanto que o patógeno foi detectado em quatro (26,7 %) amostras de leite cru. Kobayashi *et al.* (2017) detectou

fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) de *Campylobacter* spp. em 18 (47,37 %), num total de 38 amostras de queijos frescos produzidos com leite cru e em uma (6,66 %) num total de 15 amostras de leite cru coletadas diretamente de pequenos produtores da região metropolitana de São Paulo.

Um estudo realizado no Egito encontrou *C. jejuni* em 20 % das amostras de leite cru e em 14 % das amostras em queijo Kareish, produzido a partir de leite cru de vaca ou de búfala (El-Zamkan e Abdel Hameed, 2016). Já na Tasmânia, um estudo com 284 amostras de leite cru encontrou a prevalência de 13,4 % de *Campylobacter* spp. (Kashoma *et al.*, 2016).

Estima-se que os surtos ligados ao consumo de leite e queijo causem em média 761 doenças e 22 hospitalizações por ano nos EUA. Produtos não pasteurizados são consumidos por uma pequena porcentagem dos consumidores de laticínios dos EUA, mas causam 95 % das doenças. O risco de doença é 800 vezes maior para consumidores de leite ou queijo não pasteurizado do que para consumidores de produtos lácteos pasteurizados. Portanto, as doenças relacionadas aos surtos aumentarão constantemente à medida que o consumo de produtos lácteos não pasteurizados aumenta, provavelmente devido em grande parte por salmonelose e campilobacteriose (Costard *et al.*, 2017).

Um estudo da análise de dados do Sistema de Relatório Nacional de Surtos dos EUA no período de 2009 a 2014 foi realizado, considerando produtos lácteos e quatro patógenos de interesse (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli* STEC e *L. monocytogenes*). No caso de *Campylobacter*, observou-se um surto causado por queijo produzido com leite pasteurizado, resultando em dois doentes e 53 surtos causados por queijo produzidos com leite cru, resultando em 465 pessoas doentes (Costard *et al.*, 2017).

Apesar da alta incidência mundial de diarreia causada por *Campylobacter* (WHO, 2020), espécies de *Campylobacter* parecem improváveis patógenos de origem alimentar, uma vez que possuem crescimento exclusivamente fastidioso e uma sensibilidade incomum às questões de estresses ambientais, o que difere da maioria dos patógenos bacterianos de origem alimentar, que são considerados microrganismos relativamente robustos, como consequência da necessidade de sobreviver às condições adversas impostas pelo processamento e conservação de alimentos (Park, 2002).

### 3.4. Isolamento e detecção

As técnicas de isolamento de *C. jejuni* e *C. coli* em alimentos necessitam de meios de enriquecimento para recuperação das células lesadas metabolicamente. Os alimentos a serem analisados podem estar altamente contaminados com microbiota competitiva tornando difícil o isolamento de *Campylobacter*. Além disso, o microrganismo pode estar presente em pequena quantidade ou as células podem estar injuriadas como consequência das condições ambientais de armazenamento e processamento, como: aquecimento, dessecação, congelamento e acidificação (Ministério da saúde, 2011; Chon *et al.*, 2020).

As técnicas tradicionais internacionais de cultivo, tais como aquelas preconizadas pela *International Organization for Standardization (ISO)*, *Food and Drug Administration (BAM/FDA)* e *Food Safety and Inspection Service (MLG/FSIS)*, são direcionadas às espécies termotolerantes de *Campylobacter*, incluem uma etapa de pré-enriquecimento em caldo seletivo e incubado a 37 °C, uma etapa de enriquecimento no mesmo caldo a 41,5 °C ou 42 °C, uma etapa de plaqueamento em um ou dois meios seletivos diferenciais, incubados a 41,5 °C ou 42 °C e uma seleção inicial das colônias para confirmação, baseada nas características típicas de forma, arranjo e motilidade de *Campylobacter* (Silva *et al.*, 2017). O uso de ambientes microaeróbicos e uma temperatura de incubação mais alta se tornou o protocolo de escolha para isolar *Campylobacter* spp. de aves e produtos lácteos. A temperatura elevada de incubação inibe parte da microbiota concorrente presente em amostras de alimentos e permite o isolamento de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*, denominadas termotolerantes (Gharst *et al.*, 2013).

Durante o ensaio para detecção ou enumeração de *Campylobacter* spp., todas as incubações são feitas em microaerofilia. Para aumentar a tolerância ao oxigênio, os meios de cultivo contêm diversas combinações de agentes sequestrantes, como: sulfato ferroso, metabissulfito de sódio, piruvato de sódio (a combinação desses três é chamada de suplemento FBP), carvão, heme e sangue. Esses agentes previnem o acúmulo de foto-derivativos do oxigênio nos meios de cultura e neutralizam os efeitos tóxicos de radicais de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio produzido durante o crescimento, e ajudam a criar um ambiente microaeróbico (Gharst *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017).

Para reduzir a competição da microbiota acompanhante os meios contêm diversas combinações de antimicrobianos, como cefoperazona de sódio, trimetropina, vancomicina, rifampicina, anfotericina B e cicloeximida. A vancomicina inibe bactérias Gram positivo, a trimetropina inibe *Proteus*, a cefoperazona de sódio inibe bactérias entéricas Gram negativo e algumas Gram positivo, a anfotericina B e a cicloeximida inibem fungos. A rifampicina foi substituída por vancomicina no meio Preston, visto que alguns estudos têm demonstrado que a rifampicina pode ser inibidora de células estressadas de *C. jejuni* (Ministério da saúde, 2011; Silva *et al.*, 2017; Soto-Beltrán *et al.*, 2023).

O método ISO 10.272 foi revisado e algumas alterações realizadas, entre elas, o aumento do escopo de matrizes, a adição de um segundo caldo de enriquecimento (caldo Preston), com o objetivo de superar problemas com microbiota resistente a  $\beta$ -lactâmicos de terceira geração, como a cefoperazona presente no caldo de Bolton, e no ágar *modified Charcoal-Cefoperazone Deoxycholate* (mCCD). O caldo Preston utiliza diferentes agentes seletivos e, portanto, é mais adequado para suprimir esse tipo de microbiota resistente. O caldo Bolton, normalmente usado nos métodos de isolamento de *Campylobacter*, permite uma recuperação eficaz e crescimento de *Campylobacter*, mas este meio possui uma seletividade limitada, o que pode inibir a recuperação de *Campylobacter* spp. de amostras com alta concentração de microrganismos interferentes, incluindo *E. coli* produtora de enzimas chamadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) (Biesta-Peters *et al.*, 2019). As enzimas ESBL quebram e inativam alguns antimicrobianos comumente usados, incluindo penicilinas e cefalosporinas, e tornam esses medicamentos ineficazes (CDC, 2019). *E. coli* produtora de ESBL pode se desenvolver em meio de ágar mCCDA e Campy-Cefex suplementado com cefoperazona, tornando difícil diferenciar e isolar colônias suspeitas de *Campylobacter*. Portanto, a introdução de novos suplementos pode aumentar a sensibilidade e seletividade do ágar seletivo (Chon *et al.*, 2020).

Em relação aos meios de cultura, o ágar mCCD é geralmente considerado o primeiro meio de isolamento a ser usado. Em sua composição, o sangue é substituído pelo carvão, sulfato ferroso e piruvato de sódio que melhoram a multiplicação e a aerotolerância de *Campylobacter* spp. A seletividade é obtida pela adição de cefoperazona e desoxicolato de sódio (Post, 1995). O uso de um segundo meio de isolamento, com diferentes propriedades seletivas e de diagnóstico, ainda é considerado necessário para a inibição do crescimento da microbiota concorrente após o enriquecimento. Alguns dos novos meios cromogênicos



recentemente introduzidos podem ser um complemento eficaz ao uso de mCCDA (Biesta-Peters *et al.*, 2018).

No método ISO 10.272-1, colônias isoladas são subcultivadas em ágar sangue não seletivo antes da realização dos testes de confirmação e identificação. Os procedimentos de confirmação incluem microscopia para observar a motilidade saca-rolhas típica e morfologia em espiral, um teste para a atividade da citocromo oxidase e incubação aeróbica a 25 °C. Os testes de identificação incluem detecção da atividade da catalase, hidrólise do hipurato e hidrólise do acetato de indoxil. Os testes de identificação permitem a diferenciação entre *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*. Como alternativa aos testes descritos no método de referência, podem ser usados testes moleculares, desde que o método alternativo seja adequado para o propósito. Portanto, qualquer método alternativo deve ser validado em relação ao método de referência para testar se o método funciona pelo menos tão bem quanto o método de referência (Ferrari *et al.*, 2023).

Durante o estudo de validação do método ISO 10272-1 por ensaios interlaboratoriais, a sensibilidade, a especificidade e o nível de detecção em 50 % (LOD<sub>50</sub>) foram determinados como as características de desempenho do método de detecção. A sensibilidade foi definida como o número de amostras encontradas positivas dividido pelo número de amostras positivas verdadeiras analisadas num determinado nível de contaminação. Os resultados da avaliação de sensibilidade foram, portanto, dependentes do nível de contaminação da amostra. A especificidade foi definida como o número de amostras consideradas negativas dividido pelo número de amostras em branco testadas. O LOD<sub>50</sub> é a concentração em UFC por amostra cuja probabilidade de detecção é 50%. Nesse estudo, os valores de LOD<sub>50</sub> variaram de 0,84 UFC/porção de teste na matriz de espinafre congelada e 2,2 UFC/porção de teste em carne picada a 14 UFC / porção teste em pele de frango e 57 UFC/porção de teste no leite cru, todos baseados em porções de teste de 10 g. O resultado da sensibilidade obtido para o leite cru também foi baixo em comparação com as outras matrizes. Uma possível explicação é a presença do sistema lactoperoxidase no leite cru, que pode interferir com a viabilidade de *Campylobacter* (Biesta-Peters *et al.*, 2018).

Apesar de não ser indicado nas metodologias internacionais, o uso de filtração em membrana foi usado com sucesso para isolamento de *Campylobacter* a partir de alimentos. Enquanto microrganismos maiores ficam presos no filtro, a alta motilidade e a forma delgada de

*Campylobacter* spp. auxiliam na passagem das células através dos pequenos poros do filtro de membrana (Speegle *et al.*, 2009; Gharst *et al.*, 2013). Speegle *et al.* (2009) mostraram que filtros de tamanho de poro de 0,65 µm em placas de ágar modificado Campy-Cefex ajudam a obter colônias puras de *Campylobacter* de amostras de alimentos. Também foi observado que a motilidade da bactéria influencia na passagem através de filtros de celulose.

No entanto, a filtração por membrana está associada a complicações, como tempo de filtração prolongado, secagem da placa de ágar e manuseio incorreto, levando à contaminação. Métodos de separação imunomagnética usando pequenas esferas magnéticas revestidas por anticorpos específicos também são usados para detectar *Campylobacter* spp. em produtos alimentícios (Chon *et al.*, 2020).

Ao contrário de outros patógenos, como *Salmonella*, *Campylobacter* exibe fisiologia dinâmica e maleável e características metabólicas que podem interferir ativamente na sensibilidade e especificidade de métodos dependentes de cultivo (Ricke *et al.*, 2019). A evidência para esta plasticidade surgiu durante a avaliação de múltiplas características metabólicas usando um extenso painel de testes bioquímicos para avaliar várias espécies de *Campylobacter*, que revelaram uma diversidade fenotípica única e significativa (On *et al.*, 1996 citados por Ricke *et al.*, 2019).

Esta inconstância metabólica é ainda mais sustentada pela diversidade genética e instabilidade genômica, que podem ser influenciados pelo ambiente, em *C. jejuni* isolados de aves. Outro bom exemplo dessa plasticidade são as formas VNC, o que o torna incapaz de ser detectado pelas técnicas microbiológicas (Ricke *et al.*, 2019). Essa enorme variabilidade dentro de muitas sequências genômicas ajuda a bactéria a se adaptar a diferentes ambientes hostis. Dentro desses genes hipervariáveis, ocorrem numerosas variações fenotípicas e enorme diversidade dentro das populações de *Campylobacter*, especialmente após a passagem por animais ou humanos (Kreling *et al.*, 2020).

Embora ainda não esteja claro sobre como essa diversidade impacta na recuperação do patógeno em meios seletivos, é altamente provável que o viés e as mudanças na sensibilidade e especificidades são instáveis e ambientalmente conduzidos por meio de interações biológicas desconhecidas. Conseqüentemente, existem desafios significativos no cultivo de *Campylobacter* em meios seletivos e / ou diferenciais que surgem na presença de outros

microrganismos, que podem provavelmente influenciar no seu metabolismo (Ricke *et al.*, 2019).

Em função das dificuldades relacionadas às técnicas tradicionais de isolamento e identificação de *Campylobacter* spp., procedimentos alternativos de detecção, tais como enzimas de imunoenaios e testes moleculares foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a detecção destes microrganismos em alimentos, além de reduzir o tempo com que a análise é realizada (Castro, 2015, Razzuoli *et al.*, 2018; Ricke *et al.*, 2019; Chon *et al.*, 2020).

Metodologias de detecção com base imunológica exploram a afinidade de anticorpos para antígenos alvo específicos encontrados na superfície do microrganismo. Essas metodologias estão estabelecidas e incluem ensaios de imunoadsorção enzimática (ELISA), citometria de fluxo e imunofluorescência quantitativa, entre outros (Ricke *et al.*, 2019). Ensaio fluorescente ligado à enzima (ELFA) é um método de análise imunológica que detecta antígenos e mede a concentração de anticorpos no plasma do sangue. Entre os diferentes métodos de imunoenaios, ELFA refere-se a métodos de sistemas heterogêneos de fase em que os anticorpos ou antígenos são adsorvidos ou ligados a um substrato sólido. O ELFA baseado em instrumento comercial é inteiramente automatizado e está associado a kits pronto para uso (Razzuoli *et al.*, 2018; Ricke *et al.*, 2019).

O uso de tecnologias baseadas em ácido nucleico reconhece sequências de DNA ou ácido ribonucleico (RNA) únicas e altamente específicas que podem ser sequenciadas, amplificadas e visualizadas em gel, ou diferenciadas para detecção, quantificação, e tipagem molecular (Ricke *et al.*, 2019). Os métodos de identificação molecular são rápidos e específicos para a identificação de *Campylobacter* spp. Além de detectar segmentos específicos de DNA ou RNA, os protocolos de sequenciamento detectam segmentos específicos do DNA para identificação de espécie e às vezes subespécie (Gharst *et al.*, 2013). Numerosos ensaios de qPCR simples e multiplex foram desenvolvidos para detectar sequências de genes específicos em várias espécies de *Campylobacter*. Os kits de qPCR comercializados, incluindo o Sistema BAX<sup>®</sup>, são usados por autoridades alimentícias e laboratórios de pesquisa para detectar *Campylobacter* spp. em amostras de pré-enriquecimento. A amplificação isotérmica mediada por *loop* (LAMP) é um método de PCR alternativo que usa mais de um conjunto de *primers*, resultando em detecção altamente específica e sensível (Chon *et al.*, 2020). Atualmente, esses métodos são ferramentas confiáveis para a triagem rápida de amostras positivas presuntivas.

No entanto, as agências reguladoras não consideram esses testes moleculares “confirmativos” e, portanto, a cultura isolada deve ser obtida das amostras positivas presuntivas para fins de confirmação via testes tradicionais de cultivo e isolamento (Gharst *et al.*, 2013; MLG 41.07, 2022).

Os fabricantes de métodos baseados em qPCR incluem protocolos de enriquecimento para recuperar células lesadas ou estressadas e para aumentar o número de células para o nível de detecção. A sensibilidade dos ensaios de qPCR está na faixa de  $10^3$  UFC por mL em culturas puras, mas a sensibilidade é reduzida consideravelmente ao testar matrizes alimentares. A etapa de enriquecimento também é utilizada para a confirmação de amostras positivas presuntivas por métodos de cultivo (Gharst *et al.*, 2013).

A tecnologia de qPCR é uma evolução nas tecnologias de PCR para a quantificação de patógenos e determinações de sequências de ácido nucleico e tornaram-se possíveis pelo uso de corantes fluorescentes intercalados que são detectados por sistemas especializados de imagem a *laser*. Os corantes fluorescentes se acumulam a cada ciclo com uma intensidade que é diretamente proporcional à quantidade do DNA modelo alvo (Kralik e Ricchi, 2017; Ricke *et al.*, 2019).

O sistema de qPCR é amplamente considerado um método mais sensível de detecção do que técnicas de cultivo, que podem produzir resultados variáveis. A dependência apenas das técnicas tradicionais de cultivo pode resultar numa subestimação considerável da prevalência de *Campylobacter* spp. devido aos desafios do cultivo e isolamento (Del Collo *et al.*, 2017). Por outro lado, Razzuoli *et al.* (2018), durante estudo de validação de métodos de PCR, observou que o DNA de *Campylobacter* spp. foi detectado numa amostra de leite após 13 dias de refrigeração, sem haver o crescimento do microrganismo na placa, concluindo que o microrganismo não era mais viável. Os autores também citam que uma das principais desvantagens das técnicas baseadas em DNA é sua incapacidade de distinguir entre DNA de células viáveis e mortas, que é, provavelmente, o mais importante obstáculo para a implementação destes métodos em aplicações de rotina. Para superar esse problema, sugere-se usar um estágio de pré-enriquecimento para recuperar células viáveis, e também tem como vantagem diluir e/ou eliminar possíveis inibidores de PCR presentes na amostra. A extração do DNA dos meios de cultura é mais fácil do que das amostras de alimentos, que são muito mais heterogêneas em termos de composição. Outra opção é o uso de corantes fluorescentes,

como o propidium monoazide (PMA) que penetram nas membranas plasmáticas não íntegras das células mortas e reagem com o DNA (Kralik e Ricchi, 2017; Ricke *et al.*, 2019).

### **3.5. Verificação de método segundo a ISO 16140**

Em 2006 um grupo de discussão foi criado para a revisão da Norma ISO 16140, que foi dividida em uma série de seis partes: 1. Terminologia; 2. Validação de métodos alternativos (proprietários); 3. Verificação do método em um único laboratório; 4. Validação do método em um único laboratório; 5. Validação interlaboratorial fatorial para métodos não proprietários e 6. Validação para métodos de confirmação e tipagem (ISO/TC 34, 2021).

Com essa divisão da norma, um fluxograma para aplicação da série ISO 16140 (Figura 1) permite uma visão geral das ligações entre as diferentes partes mencionadas e também orienta na seleção da parte correta da série ISO 16140, levando em consideração o objetivo do estudo (ISO 16140-3, 2021). De acordo com esse fluxograma, a validação para a extensão de uma matriz deve ser feita de acordo com a norma ISO 16140-2.

O protocolo de validação indica duas fases: um estudo de comparação entre os métodos alternativo e de referência realizado no laboratório organizador; e um estudo interlaboratorial do método alternativo comparando com o método de referência realizado em diferentes laboratórios (ISO 16140-2, 2016).

O estudo de comparação entre métodos consiste em três partes:

- estudo comparativo entre os resultados do método de referência e os resultados dos métodos alternativos em amostras contaminadas (naturalmente e/ou artificialmente), estudo da sensibilidade;
- estudo comparativo para determinar o limite de detecção relativo em amostras contaminadas; e
- estudo de inclusividade/exclusividade do método alternativo.

#### **3.5.1. Estudo do limite de detecção relativo**

Um estudo comparativo é conduzido para avaliar o nível de detecção do método alternativo contra o método de referência. A avaliação é baseada no cálculo do nível de detecção relativo. Nesse estudo, replicatas de amostras artificialmente contaminadas são usadas em três ou mais

níveis de contaminação. Os níveis devem ser preferencialmente conhecidos para permitir o cálculo do limite de detecção.

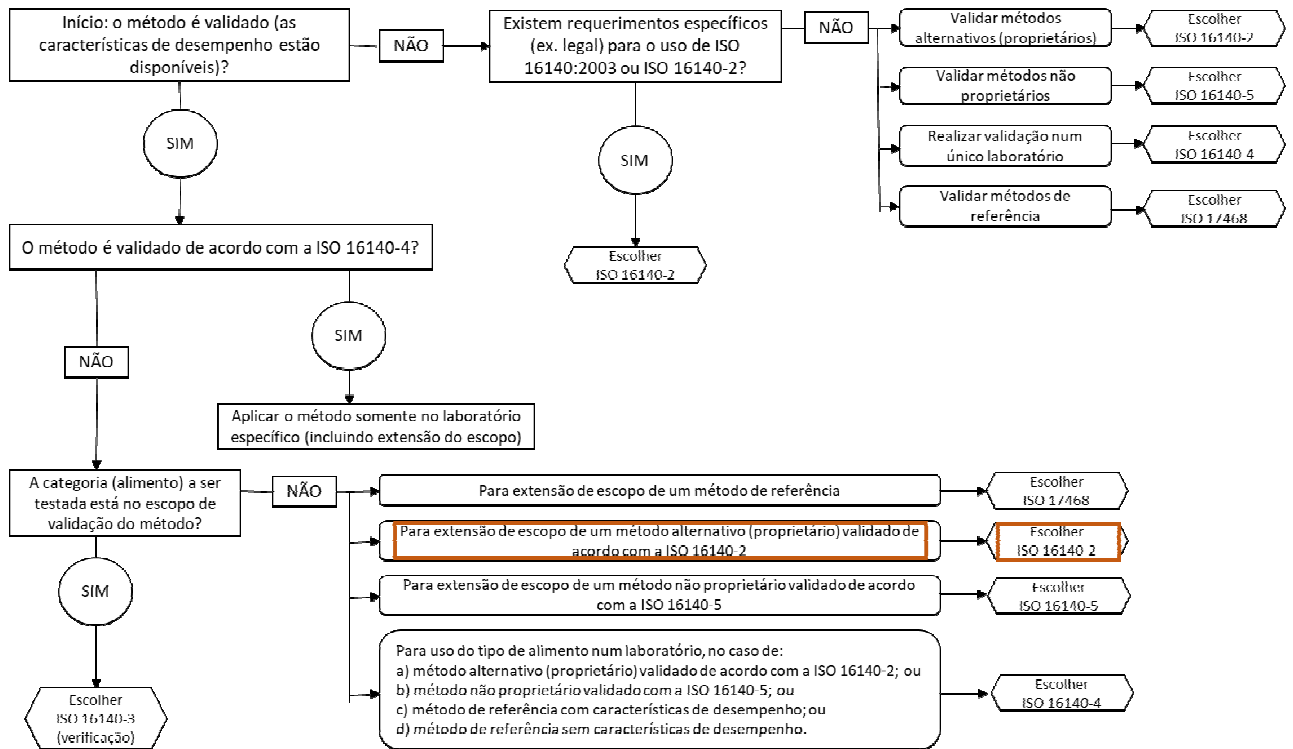


Figura 1. Fluxograma para aplicação das diferentes partes da série ISO 16140

Para a seleção da(s) matriz(es), o anexo A da ISO 16140-2:2016 classifica os alimentos a serem testados de acordo com as suas propriedades intrínsecas. Essas atividades intrínsecas, tais como níveis de microbiota interferente; teores de gordura e sal; pH; atividade de água e a presença de compostos antimicrobianos podem influenciar no resultado do método.

Amostras artificialmente contaminadas são usadas em três ou mais níveis de contaminação, sendo um nível negativo, um nível baixo (nível de detecção teórico) no qual a detecção do microrganismo deve ser entre 25 % a 75 %, e um nível mais elevado de contaminação. Para o controle negativo, pelo menos cinco amostras devem ser analisadas, para o nível de detecção teórico pelo menos 20 amostras e para o terceiro nível, pelo menos cinco amostras devem ser analisadas (ISO 16140-2, 2016).

O uso de amostras pareadas ou não pareadas vai depender dos resultados obtidos nos testes iniciais, sendo que o ideal é usar amostras pareadas, ou seja, a mesma porção teste será analisada pelos dois métodos (ISO 16140-2, 2016). Os resultados de amostras não pareadas

são dependentes, pois originam da mesma amostra, mas devido a uma variação normal entre as porções teste, quando usados um nível de contaminação muito baixo, uma porção teste pode estar contaminada e a outra não. A variação esperada entre os resultados é, portanto, maior do que um estudo pareado (ISO 16140-1, 2016).

### 3.5.2. Estudo da sensibilidade

O estudo da sensibilidade tem como objetivo determinar a diferença da sensibilidade entre os métodos alternativo e de referência. Deve ser conduzido usando amostras naturalmente contaminadas e/ou artificialmente contaminadas (ISO 16140-2, 2016).

Para cada categoria a ser estudada, a ISO 16140-2 indica um mínimo de 60 amostras individuais testadas com pelo menos 20 amostras representativas de cada tipo de alimento. Devem-se obter resultados positivos e negativos, sendo que pelo menos 30 amostras devem ter resultados positivos para pelo menos um método (ISO 16140-2, 2016).

### 3.5.3. Contaminação artificial das amostras

A ISO 16140-2 (Anexo C) sugere duas opções de contaminação artificial: “*seeding*” que é baseado na contaminação das amostras por culturas diluídas e subsequente estocagem por um período para que os microrganismos se adaptem às condições ambientais do alimento; e “*spiking*” que é baseado na aplicação de condições de estresse às culturas diluídas e subsequente inoculação da cultura já estressada no alimento.

Outra opção é a contaminação pela mistura de um alimento naturalmente contaminado com amostras não contaminadas para se atingir um nível de contaminação adequado. Estocar essa amostra em temperatura adequada por pelo menos um dia para permitir que a população microbiana entre em equilíbrio.

Todos os métodos alternativos para a detecção de *Campylobacter* spp. disponíveis no mercado possuem certificado de validação para carne de frango e produtos cárneos, mas não contemplam matrizes lácteas, como leite cru e queijos. O objetivo desse capítulo é realizar o estudo comparativo do limite de detecção relativo e da sensibilidade do método de qPCR pelo sistema BAX<sup>®</sup> Q7, com o método tradicional ISO 10272-1, para as matrizes leite cru e queijo produzido com leite cru, seguindo o protocolo de validação da ISO 16140-2 de 2016.

### 3.6. Material e métodos

Essa etapa foi realizada nas dependências do Laboratório de Microbiologia do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA/MG), localizado em Pedro Leopoldo, Minas Gerais.

#### 3.6.1. Preparo da fase estacionária

Três espécies de *Campylobacter* foram testadas para o preparo da fase estacionária. *C. jejuni* – CCAMP 419, *C. coli* CCAMP 494 e *C. lari* - CCAMP 1012 foram provenientes da coleção de *Campylobacter* da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sendo que *C. jejuni* e *C. coli* são originadas de fezes humanas e *C. lari* de swab cloacal de gaivota.

As cepas foram ativadas em ágar sangue [ágar base Columbia (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com sangue de cavalo lisado], incubadas a 42 °C por 21 ± 3 horas em microaerofilia através da incubação em jarras de anaerobiose e gerador atmosférico Microaerobac (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). As placas com as colônias isoladas foram lavadas com 4 mL de meio de Wang (formulado de acordo com MLG Appendix 1.10), e alíquotas de 1 mL distribuídas em criotubos e congeladas a -70 °C, conforme indicado no método MLG 41.07 do FSIS (MLG, 2022).

O procedimento para o preparo da fase estacionária foi padronizado como a seguir: com uma alça descartável, foram retiradas alíquotas do meio de Wang contido no criotubo, mantido a -70 °C em ultra-freezer, sem deixar descongelar. Essas alíquotas foram estriadas em ágar sangue e incubadas a 42 °C por 48 horas em microaerofilia. A partir desse ágar sangue, colônias foram transferidas para tubo contendo 10 mL de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) sem suplemento e incubadas a 42 °C por 24 horas em microaerofilia, o que resultou em crescimento de até 10<sup>8</sup> UFC/mL.

#### 3.6.2. Seleção das matrizes

Para a etapa de determinação do limite de detecção relativo, somente um tipo de alimento é selecionado, dentro de uma mesma categoria. Para a categoria de alimentos: leite cru e produtos lácteos, esses são divididos em dois tipos: leite cru, e/ou leites fermentados e acidificados (sem tratamento térmico); e produtos lácteos crus com alto teor de gordura e/ou elevadas contagens de microbiota contaminante. No caso de *Campylobacter* spp., somente o leite cru é a matriz indicada (ISO 16140-2, 2016).



Para a etapa de determinação de sensibilidade, como o objetivo é a validação do QMA, foram utilizadas 20 amostras de leite cru, sendo 10 amostras negativas e 10 amostras contaminadas, e 80 amostras de QMA, sendo 60 amostras negativas e 20 amostras contaminadas.

### 3.6.3. Contaminação artificial das amostras

Foi utilizado o protocolo de “*seeding*” para a contaminação do leite cru, as amostras foram inoculadas com diluições da fase estacionária. Logo após a inoculação das amostras, a contagem bacteriana foi realizada em ágar sangue (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) para o cálculo do número de células inoculadas.

Apesar da Norma ISO 16140 indicar a estabilização da amostra, ou seja, a manutenção do microrganismo na matriz em refrigeração por 24 a 48 horas antes de se realizar as análises, optou-se por não realizar a estabilização, devido às características de *Campylobacter* para a formação de células viáveis não cultiváveis.

### 3.6.4. Metodologias utilizadas

O método tradicional foi feito de acordo com a Norma ISO 10272-1:2017. Amostras de 10 mL de leite ou 10 g de QMA foram homogeneizadas em 90 mL de caldo Preston (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), contendo suplemento seletivo Preston (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e sangue lisado de equino e incubadas a 42 °C por 24 horas em microaerofilia. Na sequência, uma nova inoculação foi realizada utilizando uma alça de 10 µL em ágar mCCD (Neogen, Lansing, MI, EUA), contendo suplemento seletivo para mCCDA (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), e incubadas a 42 °C por 48 horas em microaerofilia. Após leitura, o isolamento das colônias foi feito em ágar sangue (Kasvi). As placas foram incubadas a 42 °C por 24 a 48 horas em microaerofilia. Para a confirmação, as colônias foram testadas para oxidase, catalase e crescimento em ágar sangue (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) a 25 °C em aerobiose. Para a identificação das espécies de *Campylobacter*, após isolamento em ágar sangue, as colônias foram testadas para hidrólise de acetato de indoxil (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) e a hidrólise de hipurato (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA).

Para o método BAX<sup>®</sup>, como não há um procedimento descrito para produtos lácteos, testes foram realizados. Inicialmente, a partir do caldo Preston (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), 5 a 10 µL da amostra foram inoculados em 200 µL da solução tampão adicionada de protease, disponível no BAX<sup>®</sup> System PCR kit para *Campylobacter* (Hygiena, Camarillo, CA, EUA) e,

em seguida, colocados a 37 °C por 20 minutos e 95 °C por 10 minutos, para a exposição do DNA. Após resfriados, 30 µL do material lisado foram adicionados nos tubos de PCR e processados no Sistema Real Time PCR do Sistema BAX<sup>®</sup>Q7. Esse *kit* não só detecta *Campylobacter* spp., como diferencia as espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

### 3.6.5. Estudo do limite de detecção relativo

Após a detecção da inibição do leite cru (indicado no item resultados e discussão), o leite foi submetido a um tratamento térmico de 80 °C por 15 minutos para a desnaturação das enzimas inibidoras de atividade bacteriana, antes de ser inoculado com a cepa de *C. jejuni*.

Após os testes, para identificar as interferências sobre o teste de qPCR, o estudo do limite de detecção foi realizado da seguinte maneira:

Amostras de 10 mL de leite cru, tratadas termicamente, foram inoculadas com *C. jejuni* em diferentes níveis, sendo que cinco amostras com nível negativo, 23 amostras com níveis baixos, variando de 2,7 a 28 UFC por amostra, e cinco amostras com um nível mais elevado de contaminação, de 260 UFC por amostra. Pela dificuldade de manipulação do microrganismo, esse estudo foi realizado em três etapas, e analisadas 11 amostras a cada etapa, para se conseguir atingir o menor número possível do inóculo.

As amostras foram pareadas, com inoculação em caldo Preston (Sigma-Aldrich) contendo suplemento seletivo (Merck) e sangue lisado de equino, conforme ISO 10272-1: 2017. Após a incubação desse caldo em microaerofilia a 42 °C por 24 horas, uma alíquota de 200 µL foi adicionada em 10 mL de caldo Bolton (Oxoid), sem suplemento, e incubada a 42 °C em microaerofilia por 18 horas, para posterior análise no BAX<sup>®</sup>Q7. Com a adição da segunda etapa de enriquecimento, à partir do caldo Bolton (Oxoid), 5 µL da amostra foi inoculada em 200 µL de solução tampão adicionado de protease, conforme procedimento do BAX<sup>®</sup> para detecção da bactéria em carne de frango (BAX, 2019).

A partir do caldo Preston (Sigma-Aldrich) com suplemento seletivo (Merck) e sangue lisado de equino incubado, uma alíquota de 10 µL foi inoculada em placas contendo mCCDA e incubada em microaerofilia a 42 °C por 48 horas para a continuação da análise de acordo com a ISO 10272-1:2017.

### 3.6.6. Estudo da sensibilidade

Dez amostras de leite cru individual, provenientes de vacas da fazenda experimental Professor Hélio Barbosa, da UFMG, localizada em Igarapé (MG), foram analisadas pelas duas metodologias, conforme descrito no estudo do limite de detecção. Como não foram detectadas amostras positivas, as mesmas foram inoculadas com o valor teórico de cerca de dez vezes o limite de detecção com diferentes cepas de *Campylobacter* (sete amostras com *C. jejuni*, duas com *C. coli* e uma com *C. lari*) e analisadas.

Sessenta amostras de QMA produzido com leite cru, colhidas no comércio de Belo Horizonte e região metropolitana, foram analisadas em paralelo pelas duas metodologias para a detecção de *Campylobacter* spp. Após resultado negativo dessas amostras, vinte amostras desses queijos, selecionadas aleatoriamente, foram inoculadas com o valor teórico de cerca de 100 vezes o limite de detecção com diferentes cepas de *Campylobacter* (14 amostras com *C. jejuni*, quatro com *C. coli* e duas com *C. lari*) e analisadas pelas duas metodologias.

### 3.6.7. Teste de TTC

Foram colocados 10 mL de leite em tubo de ensaio e aquecidos em banho-maria a 80 °C por 15 minutos. Os tubos foram resfriados a 45 °C e inoculados com 1 mL de iogurte e, após homogeneização, foram levados para incubação por 2 horas em banho-maria a 42 °C. Após esse período, foi adicionado 0,3 mL de solução de 2,3,5 trifenil cloreto tetrazólio (TTC) a 4 % em cada tubo; após homogeneização, os tubos permaneceram em banho-maria por mais 30 minutos. Para amostras positivas para a presença de resíduos de inibidores, a cor do leite conserva-se branca. A alteração da cor do leite para rosa indica ausência de inibidores (Neal e Calbert, 1955).

### 3.6.8. Análise dos dados

Os limites de detecção, sensibilidade, taxa de falso positivo e veracidade relativa foram calculados de acordo com a ISO 16140-2:2016.

LOD<sub>50</sub> é a concentração em unidades formadoras de colônia (UFC) por amostra para a qual a probabilidade de detecção é de 50 %. Os cálculos para LOD<sub>50</sub> foram realizados usando uma planilha Excel disponibilizada (Wilrich e Wilrich, 2009).

### 3.7. Resultados e Discussão

#### 3.7.1. Estudo do limite de detecção relativo

No estudo prévio, que visava estabelecer o limite de detecção relativo, para os diferentes níveis de inoculação de células de *C. jejuni* em leite cru, não houve detecção desse microrganismo tanto na qPCR, quanto pelo método tradicional (Tabelas 1 e 2). Na primeira repetição foram inoculadas cerca de 110 células em cinco amostras e 1.100 células em uma amostra de 10 mL de leite (Tabela 1). A partir da ausência de detecção, outro teste foi realizado, inoculando-se três amostras de leite com cerca de 2.400 células/amostra e três amostras foram inoculadas com cerca de 2.400 células diretamente no caldo Preston. Nesse caso, o microrganismo foi detectado pelo método de qPCR somente na ausência do leite (Tabela 2).

Tabela 1. Teste de limite de detecção, com e sem a inoculação de *C. jejuni* em amostras de leite cru, sem a detecção do microrganismo inoculado, utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX®) e método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)	
		BAX	ISO
0	5	0 (0)	0 (0)
110	5	0 (0)	0 (0)
1100	1	0 (0)	0 (0)

Tabela 2. Teste de limite de detecção, com a inoculação de valores elevados de *C. jejuni* com leite cru ou direto no caldo Preston, utilizando a metodologia qPCR (sistema BAX®)

Amostra	Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)
			BAX
Leite cru	0	3	0 (0)
Caldo Preston	0	3	0 (0)
Leite cru	2400	3	0 (0)
Caldo Preston	2400	3	3 (100)

Diante desses resultados, um terceiro teste foi realizado, com o objetivo de se observar se o problema era com a cepa de *C. jejuni* e também confirmar a inibição da viabilidade da bactéria por substâncias naturalmente presentes em leite cru. Nesse teste, inoculou-se *C. coli* e *C. jejuni* em elevadas concentrações em amostras de leite UAT (ultra alta temperatura), leite

cru e direto no caldo Preston com sangue, confirmando a inibição do leite cru para as cepas de *Campylobacter*, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Teste de limite de detecção, com leite cru e leite UAT e inoculação de *C. jejuni* e *C. coli*, utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX®) e método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Amostra	Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)	
			BAX	ISO
Leite cru + <i>C. coli</i>	250	1	0 (0)	0 (0)
Leite cru + <i>C. Jejuni</i>	1600	1	0 (0)	0 (0)
Leite UAT + <i>C. coli</i>	250	1	1 (100)	1 (100)
Leite UAT + <i>C. jejuni</i>	1600	1	1 (100)	1 (100)
<i>C. coli</i> + <i>C. jejuni</i>	1600 e 250	1	1 (100)	1 (100)
Amostra não inoculada	0	1	0 (0)	0 (0)

Após a confirmação da incapacidade de *Campylobacter* sobreviver no leite cru, o teste do TTC (Neal e Calbert, 1955) foi realizado nessa matriz para verificar a presença de inibidores no leite. O resultado da ausência de substâncias inibidoras externas confirma a presença de inibidores naturais do leite cru (Figura 2).

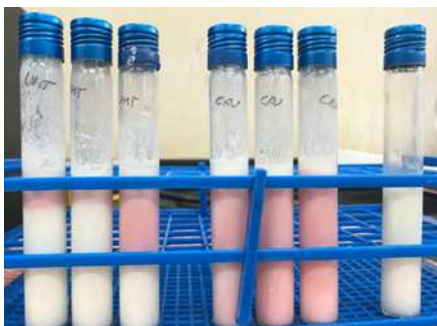


Figura 2. Teste TTC em leite cru e leite UAT para observar a presença de substâncias inibidoras para o crescimento de microrganismos no leite.

Outro estudo também observou que *Campylobacter* se multiplicou mais facilmente em caldos de enriquecimento com leite UAT do que em caldos de enriquecimento com leite cru, no qual foi sugerido que foi devido a diferenças na química do leite (por exemplo, menor teor de gordura) ou à falta de microbiota completa no leite UAT (Kingsbury e Soboleva, 2020).

Dentre os inibidores naturais do leite, o sistema lactoperoxidase (LPS) e a lactoferrina são conhecidos. O LPS consiste em três componentes: a enzima lactoperoxidase, íons tiocianato e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e é ativo apenas na presença de todos esses três integrantes. A

enzima lactoperoxidase catalisa a oxidação do tiocianato à custa de  $H_2O_2$ , e gera produtos como os ácidos cianossulfuroso e cianossulfúrico, que possuem propriedades antibacterianas e têm um amplo espectro de efeitos antimicrobianos contra bactérias, fungos e vírus (Seifu *et al.*, 2005; Corbo *et al.*, 2009). O efeito bactericida do LPS contra *C. jejuni* no leite foi demonstrado, sendo mais pronunciado em temperatura de 30 °C, quando comparado com temperatura de 7 °C (Beumer *et al.*, 1988; Seifu *et al.*, 2005).

A enzima lactoferrina é um membro da família das proteínas ligantes de ferro (transferrina), encontrada em superfícies mucosas e em fluidos biológicos, incluindo o leite. Embora a lactoferrina seja encontrada no leite da maioria dos mamíferos, sua concentração é bastante variável e dependente do estágio de lactação. Essa enzima é considerada um dos mais poderosos agentes antimicrobianos no leite. Por muitos anos, a atividade antimicrobiana da lactoferrina foi atribuída à capacidade de sequestrar ferro, privando os patógenos potenciais desse nutriente essencial. Estudos mostraram que pode atuar também como um quelante, liberando lipopolissacarídeos da membrana externa de bactérias Gram negativo ou podendo interagir com os sítios de ligação no lipopolissacarídeo, causando distorção na integridade da membrana externa e, finalmente, formando poros (Corbo *et al.*, 2009). Outros estudos indicam que a lactoferrina interrompe a ligação de outros componentes ao lipopolissacarídeo na célula bacteriana, inibindo a patogênese de alguns enteropatógenos importantes, ou interferindo nos fatores de patogênese expressos na superfície, como a sua capacidade de adesão (Jahani *et al.*, 2015).

Estudos de validação de métodos para pesquisa ou contagem de *Campylobacter* spp. não observaram essa presença de inibidores naturais ao inocular o microrganismo em amostras de leite cru (Vencia *et al.*, 2014; Biesta-Peters *et al.*, 2014; Razzuoli *et al.*, 2018; Wulsten *et al.*, 2020; Hazeleger *et al.*, 2022). Biesta-Peters (2014) observou uma variação no valor de limite de detecção de 0,84 UFC para matriz espinafre congelado até 57 UFC para o leite cru, e cita que uma possível explicação para os resultados ruins de sensibilidade para o leite cru seja a presença de um sistema lactoperoxidase no leite cru, que pode inibir o crescimento de *Campylobacter*.

Nem todas as cepas têm a mesma capacidade de sobreviver no leite cru devido à exposição à microbiota do leite, compostos bactericidas, armazenamento a frio e às técnicas usadas para fabricar certos produtos lácteos crus (Barata *et al.*, 2022). Um estudo foi realizado para

observar a sobrevivência de *Campylobacter* em leite cru sob refrigeração. Foram utilizadas três diferentes cepas de *Campylobacter*: duas cepas de referência (*C. jejuni* DSM 4688 e *C. coli* DSM 4689) e uma cepa isolada de leite cru, associada a um surto (*C. jejuni* BfR-CA-13290). Elas foram adicionadas com um inóculo inicial de  $6 \log_{10}/\text{mL}$ . Como esperado, o número de UFC diminuiu significativamente ao longo do tempo de maneira dependente da cepa. O número de UFC de *C. coli* DSM 4689 diminuiu rapidamente ao longo de 2 dias e não foi cultivável em três dias; já *C. jejuni* BfR-CA 13290 foi inibida mais lentamente e a cepa não foi detectada somente após 6 dias. *C. jejuni* DSM 4688 apresentou um comportamento intermediário entre as duas cepas, sendo não cultivável em 4 dias (Wulsten et al., 2020). Jaakonon et al. (2020) identificaram que isolados de *C. jejuni* de amostras de leite cru foram capazes de sobreviver por mais tempo nessa matriz em comparação com isolados de outras fontes agrícolas.

No presente estudo, não se conseguiu detectar *Campylobacter* adicionado ao leite cru nem com um valor de  $2,4 \times 10^3$  UFC/porção teste. As duas cepas testadas (*C. jejuni* – CCAMP 419 e *C. coli* CCAMP 494) não sobreviveram à inoculação do leite cru, mesmo sem o armazenamento, podendo-se sugerir que essas cepas são mais sensíveis a alguma substância natural presente no leite cru utilizado, o que gerou a necessidade de realizar um tratamento térmico de 80 °C por 15 minutos em banho-maria.

Um novo teste foi realizado, dessa vez utilizando tratamento térmico no leite com o intuito de se desnaturar as enzimas inibidoras do leite cru (Tabela 4). Mas, nessa etapa observou-se que o método de qPCR não obteve o resultado esperado para a detecção do *Campylobacter* spp., com uma sensibilidade de 28,57 %, quando o ideal é de no mínimo 90 % para um teste de triagem (MLG, 2020).

Testes adicionais foram realizados para detectar o que poderia estar influenciando no resultado da análise do BAX<sup>®</sup>Q7. A primeira possibilidade foi testar o volume de inóculo utilizado, à partir da solução de protease com tampão de lise e a amostra, para o microtubo com reagente de lise (Tabela 5). Mas foi observado que o aumento da alíquota da amostra não melhorou o desempenho do método como previsto, o uso de alíquota de 10  $\mu\text{L}$  resultou numa sensibilidade de 28,57 %, enquanto que nos volumes de 20 e 30  $\mu\text{L}$  a sensibilidade foi de 14,28 % para a detecção de *C. jejuni*.

Tabela 4. Teste de limite de detecção de *Campylobacter* spp. em leite com tratamento térmico, utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX®) e método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)	
		BAX	ISO
2	5	0 (0)	1 (20)
7	5	1 (20)	5 (100)
200	1	1 (100)	1 (100)

Tabela 5. Teste da influência do volume de inóculo da amostra fortificada com *C. jejuni* no resultado do BAX utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX®) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)			
		BAX (volume do inóculo)			ISO
		10 µL	20 µL	30 µL	
0	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3,25	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (71,4)
93	2	2 (100)	1 (50)	1 (50)	2 (100)

Uma segunda possibilidade foi a retirada do sangue equino lisado do Caldo Preston, já que o procedimento do BAX® para a matriz frango é o uso do caldo Bolton sem o sangue, pois esse suplemento pode influenciar no resultado de qPCR. Em um primeiro teste, onze amostras de leite cru foram inoculadas com diferentes níveis de fortificação (cinco amostras contendo 5,6 UFC, quatro amostras contendo 16 UFC e duas amostras com 160 UFC) de *C. jejuni* e incubadas no caldo Preston sem adição do sangue de equino lisado (Tabela 6). Nessa etapa, foi observado que a sensibilidade pela qPCR aumentou para 42,85 %, mas ainda um valor abaixo do aceitável.

Nessa etapa, também se suspeitou que a recuperação do *Campylobacter* no caldo Preston sem o sangue foi pior do que com a adição de sangue, quando comparamos os resultados de detecção pelo método tradicional. Nos testes anteriores, o microrganismo foi detectado em 100 % das amostras com 7 UFC (Tabela 4) e 71,4 % das amostras com 3,25 UFC (Tabela 5). No teste sem adição de sangue no caldo Preston, a detecção foi de 40 % das amostras com 5,6 UFC e mesmo com a adição de 16 UFC, o *C. jejuni* foi detectado em somente em 75 % das amostras. Por isso, um segundo teste foi realizado para a confirmação.



Tabela 6. Teste da influência do sangue no caldo Preston sobre o resultado do BAX utilizando amostras fortificadas com *C. jejuni* e incubadas em caldo de enriquecimento sem adição de sangue equino, e analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX<sup>®</sup>) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)	
		BAX	ISO
5,6	5	0 (0)	2 (40)
16	4	1 (25)	3 (75)
160	2	2 (100)	2 (100)

Onze amostras de leite cru foram inoculadas com diferentes níveis de fortificação de *C. jejuni*. Foram utilizadas também amostras não pareadas, conforme descrito: 20 mL de cada amostra de leite foram fortificadas, homogeneizadas e 10 mL foram inoculados em cada caldo Preston com e sem adição de sangue equino lisado. Os resultados estão descritos na Tabela 7. A sensibilidade do BAX<sup>®</sup> foi de 33,33 % e 57,14 % para amostras incubadas no caldo Preston com e sem adição de sangue, respectivamente, indicando que o sangue diminui a capacidade de detecção pelo qPCR. O PCR é uma reação enzimática e, portanto, sensível a inibidores. Substâncias presentes no sangue, tais como IgG e hemoglobina são descritas como inibidoras de PCR, pela inibição da DNA polimerase ou da atividade da transcriptase reversa (Schrader *et al.*, 2012).

Tabela 7. Teste da influência do sangue no caldo Preston sobre a recuperação de *Campylobacter* spp. utilizando as metodologias qPCR (sistema BAX<sup>®</sup>) e o método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)			
		BAX		ISO	
		Preston + sangue	Preston	Preston + sangue	Preston
50	5	1 (20)	1 (20)	4 (80)	3 (60)
100	5	2 (40)	3 (60)	5 (100)	3 (60)
250	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (100)

Por outro lado, quando a recuperação do *C. jejuni* é comparada entre o caldo Preston com e sem suplementação de sangue nos resultados da metodologia tradicional, observa-se um índice de recuperação de 82 % e 64 %, podendo-se concluir que a recuperação do microrganismo foi prejudicada pela ausência do suplemento.

Um estudo comparando o caldo Bolton com e sem adição de sangue equino concluiu que não houve diferença significativa na recuperação de *Campylobacter* spp. em amostras de carnes bovina e de frango (Odongo *et al.*, 2009). Mas o caldo Bolton possui uma formulação mais completa que o caldo Preston. Enquanto o caldo Preston é somente um caldo nutritivo, com proteases e cloreto de sódio, o caldo Bolton possui piruvato de sódio e metabisulfito de sódio. Esses componentes aumentam a aerotolerância de *Campylobacter*, pois neutralizam os efeitos tóxicos de compostos produzidos na presença de oxigênio e da luz (Bolton *et al.*, 1983; Odongo *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2020).

Com o objetivo de se manter o caldo Preston com a adição do sangue e retirar a interferência da matriz sobre o método, foi adicionada uma etapa de enriquecimento secundário, como usado no procedimento para a detecção de *Salmonella* spp. para algumas matrizes. Semelhante ao procedimento para pesquisa de *Salmonella*, que indica a inoculação de 10 µL da amostra em 500 µL de caldo BHI e incubação a 37 °C por 3 h, as amostras incubadas em caldo Preston com adição de sangue foram inoculadas, na mesma proporção, de 200 µL em 10 mL de caldo Bolton sem suplemento. Esse caldo foi incubado a 42 °C em microaerofilia por cerca de 18 horas, para posterior análise no BAX<sup>®</sup>Q7. O aumento do tempo de incubação foi considerado pelas características de *Campylobacter*. Com a adição da segunda etapa de enriquecimento para o método BAX<sup>®</sup>, à partir do caldo Bolton, 5 µL da amostra foram inoculados em 200 µL da solução tampão adicionado de protease, conforme procedimento do BAX<sup>®</sup> para detecção da bactéria em carne de frango (BAX, 2019).

Novos testes, realizados em três etapas, foram conduzidos para a determinação do limite de detecção (Tabela 8). A partir dos resultados obtidos, os cálculos para LOD<sub>50</sub> foram realizados usando uma planilha Excel disponibilizada (Wilrich e Wilrich, 2009). O valor de LDO<sub>50</sub>, calculado com 95% de intervalo de confiança, considerando UFC/porção teste, foi de 2,378 (com limite de confiança de 1,289 a 4,390) para o método tradicional e 2,041 (limite de confiança de 1,110 a 3,754) para o método por qPCR.

Os valores de LDO<sub>50</sub> encontrados estão de acordo com dados de outros estudos, como Vencia *et al.* (2014), que encontraram 4 UFC/25 g para matriz leite cru durante validação para kit de PCR. Já Biesta-Peters *et al.* (2018) encontraram valores de LOD<sub>50</sub> variando de 0,84 UFC/porção teste em espinafre congelado e 2,2 UFC/porção teste em carne moída a 14 UFC/porção teste em pele de frango e 57 UFC/teste porção em leite cru, durante o estudo de

validação do método ISO 10272-1:2017, realizado por meio de estudo colaborativo em 2013. A validação realizada pela AOAC para o Sistema BAX<sup>®</sup> em matrizes carcaça de frango e peru fatiado embalado a vácuo não calculou o limite de detecção (Hoelzer *et al.*, 2018).

Tabela 8. Estudo do limite de detecção, com a inoculação em diferentes concentrações de *C. jejuni* em amostras de leite, utilizando-se amostras pareadas, analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX<sup>®</sup>) e método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas	
		BAX	ISO
0	5	0	0
2,7	7	3	3
3,15	8	6	5
9,8	5	5	5
28	3	3	3
260	5	5	5

Hazeleger *et al.* (2022), compararam o LOD<sub>50</sub> entre três cepas de *C. jejuni* e duas cepas de *C. coli* em caldo Bolton e caldo Preston, usando diferentes matrizes alimentares: leite cru, pele de frango, carne picada congelada e espinafre congelado. O LOD<sub>50</sub> para *Campylobacter* em caldo Preston variou de 0,9 UFC por porção teste em pele de frango a 8.900 UFC por porção teste em leite cru e essa variação foi dependente da matriz alimentar e da cepa. Também foi observado que o enriquecimento em caldo Preston resultou em LOD<sub>50</sub> mais elevado do que em caldo Bolton, especialmente para *C. coli*. Esse fato pode ser explicado pelo caldo Preston conter polimixina B, que é um bom inibidor de microrganismos produtores de ESBL, porém também inibe o crescimento da maioria das cepas Gram negativos incluindo algumas cepas de *C. jejuni* e *C. coli*.

Com os valores obtidos dos testes anteriores, pode-se calcular o valor de LDO<sub>50</sub> para o método de qPCR sem a etapa de enriquecimento secundário com o caldo Bolton. O valor de LDO<sub>50</sub> foi 28,059 (limite de confiança de 9,017 a 121,271), confirmando, dessa forma, que há uma grande influência da matriz no resultado. Estudos mostram que o leite possui inibidores de PCR, tais como a lactoferrina, cálcio e plasmina. A plasmina degrada a Taq polimerase, além disso, altas concentrações de cálcio podem levar a uma ligação competitiva pela DNA polimerase em vez de magnésio, que é um cofator para a polimerase, diminuindo a sua atividade (Schrader *et al.*, 2012). Com o resultado obtido do presente estudo, pode-se

considerar que a adição da etapa de enriquecimento secundário em caldo Bolton solucionou o problema da interferência do sangue e do leite na detecção do microrganismo pela qPCR.

A interferência da matriz leite também foi detectada durante avaliação de desempenho de um kit qPCR para detecção de *Campylobacter* spp. O método de qPCR detectou *Campylobacter* em somente 53% das amostras inoculadas, enquanto que o método de cultivo detectou em 96 % (Kingsbury e Soboleva, 2020). Por outro lado, Dell Collo *et al.* (2017) não observaram essa interferência da matriz, apesar de utilizar o mesmo kit qPCR comercial do estudo anterior para detectar *Campylobacter* em leite cru e filtro de leite enriquecidos com culturas. *Campylobacter* foi detectado em maior proporção de amostras pelo método qPCR (27/234 de leite e 69/231 de filtros de leite) do que pela cultura convencional (14/234 de leite e 33/231 de filtros de leite).

### 3.7.2. Estudo da sensibilidade

Os resultados do estudo da sensibilidade estão apresentados na Tabela 9. Esse estudo foi realizado em diferentes etapas. A contaminação do leite para a obtenção dos resultados positivos foi abaixo do valor esperado, resultando em amostras negativas.

Tabela 9. Resultado do estudo da sensibilidade, utilizando diferentes amostras de leite e QMA negativas e fortificadas com *Campylobacter* spp., utilizando-se amostras pareadas, e analisadas pelas metodologias qPCR (sistema BAX<sup>®</sup>) e método tradicional (ISO 10272-1:2017)

Matriz	Nível de inoculação (UFC/amostra)	Número de amostras inoculadas	Número de amostras positivas (%)	
			BAX	ISO
Leite	0	10	0 (0)	0 (0)
Leite	10 x LDO	10	7 (70)	9 (90)
QMA	0	60	1 (1,7)	0 (0)
QMA	100 x LDO	20	20 (100)	20 (100)

Como também não foram detectadas amostras naturalmente contaminadas nas 60 amostras de QMA, foi necessário inocular cepas de *Campylobacter* para a obtenção de amostras positivas.

Uma amostra de queijo teve resultado positivo pelo qPCR para *C. jejuni*, mas não foi confirmado pelo método tradicional, o que se considera resultado final negativo para a

amostra. Nessa amostra, o número de ciclos necessários para o início da amplificação (CT) foi muito alto (valor de 39,6), o que indica uma quantidade muito baixa desse microrganismo e/ou um provável resultado falso positivo. Essa mesma amostra permaneceu congelada e foi analisada novamente 45 dias após, na etapa de análises das amostras fortificadas, e o resultado foi negativo pelo PCR, descartando-se a possibilidade de detecção de células mortas pelo qPCR.

A partir dos resultados obtidos, os dados foram redistribuídos (Tabela 10), de acordo com os resultados positivos e negativos, concordantes e discordantes relacionados aos dois métodos, sendo o método tradicional considerado o método de referência e o método qPCR, o método alternativo, para a realização dos cálculos da sensibilidade, veracidade relativa e taxa de falso positivo, conforme Norma ISO 16140-2:2016.

Tabela 10. Resumo dos resultados obtidos com os métodos qPCR (sistema BAX<sup>®</sup>) e método tradicional (ISO 10272-1:2017) para todas as amostras

	Nº resultados positivos método de referência	Nº resultados negativos método de referência
Nº resultados positivos método alternativo	26 (CP)	1 (DP)
Nº resultados negativos método alternativo	2 (DN)	71 (CN)

Legenda: CP: Concordância de Positivos; DP: Discordância de Positivos; DN: Discordância de Negativos; CN: Concordância de negativos.

Assim, a sensibilidade para o método alternativo foi calculada como:

$$= \frac{(CP + DP)}{(CP + DN + DP)} \times 100\% = \frac{(26 + 1)}{(26 + 2 + 1)} \times 100\% = 93,10\%$$

A sensibilidade para o método de referência:

$$= \frac{(CP + DN)}{(CP + DN + DP)} \times 100\% = \frac{(26 + 2)}{(26 + 2 + 1)} \times 100\% = 96,55\%$$

A veracidade relativa:

$$= \frac{(CP + CN)}{N} \times 100\% = \frac{(26 + 71)}{100} \times 100\% = 97\%$$

Taxa de falso positivo para o método alternativo:

$$= \frac{DP}{CN} \times 100\% = \frac{1}{71} \times 100\% = 1,4\%$$

Vale ressaltar que a sensibilidade do método alternativo foi inferior ao método de referência, mas, ao mesmo tempo, obteve um valor de LDO<sub>50</sub> mais baixo. Esse resultado pode ter sido prejudicado pelo número de células inoculadas nas amostras de leite na etapa de sensibilidade, pois, apesar de se estabelecer uma rotina para o preparo da fase estacionária, *Campylobacter* spp. é muito instável; e, nessa etapa do estudo, não se conseguiu estabelecer o valor inoculado, pois não se recuperou as células para a enumeração da fase estacionária, podendo-se concluir que o valor foi abaixo do valor indicado de 10 vezes o LDO<sub>50</sub>. Segundo Hoelzer *et al.* (2018), por serem as amostras inoculadas com baixos volumes e testadas em níveis próximo ao limite de detecção, alguma discrepância entre os dois métodos é esperada baseado em fatores tais como a distribuição do microrganismo dentro da amostra. A validação do mesmo kit BAX<sup>®</sup> pela AOAC indica uma sensibilidade de 90 a 100 % para amostras contendo 7,6 UFC/ 25 g de carne de peru fatiado (Hoelzer et al., 2018).

O FSIS dos EUA indica os seguintes critérios de desempenho ao avaliar a adequação de um método alternativo para um determinado analito e amostra pareada de matriz: sensibilidade, especificidade e precisão de 90% ou mais (MLG, 2022). O limite de aceitabilidade do método é estabelecido na ISO 16140-2:2016 pelo cálculo da diferença entre DN e DP e a soma desses. Esse valor é estabelecido de acordo com o tipo de estudo (pareado ou não pareado) e o número de categorias usadas na avaliação. Para o presente estudo, que se utilizou de amostras pareadas e uma categoria de matriz, o limite de aceitabilidade é de 3 (DN - DP) e 6 (DN + DP) e o valor encontrado foi de 1 e 3, respectivamente, concluindo que o método está dentro do limite de aceitabilidade.

O uso de método rápido de triagem, sistema BAX<sup>®</sup>, supera problemas com condições de cultura, permitindo a identificação rápida de amostras positivas dentro de 48 h, enquanto que o método de referência requer três dias para determinar amostras negativas e cerca de 10 dias para identificação de espécies. Além disso, esse sistema de detecção tem outra vantagem, que é a identificação das três espécies predominantes transmitidas por alimentos *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

Quando se considera o *Campylobacter* spp, além da dificuldade na manipulação desse microrganismo, pela necessidade de microaerofilia e transformação rápida em células viáveis e não cultiváveis ao ser mantido em atmosfera normal, a técnica tradicional depende muito do treinamento do analista, principalmente pela dificuldade de se identificar e isolar as colônias no ágar mCCDA, pela presença de colônias pequenas e da cor do meio (Figuras 3 e 4).

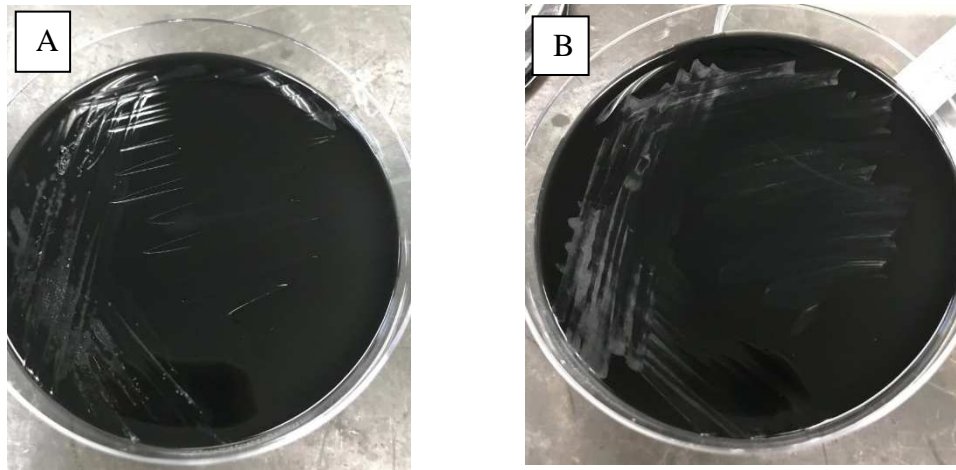


Figura 3. Placas de mCCDA inoculadas com amostras de leite cru com (A) e sem (B) adição de *C. jejuni*, após incubação em caldo Preston.

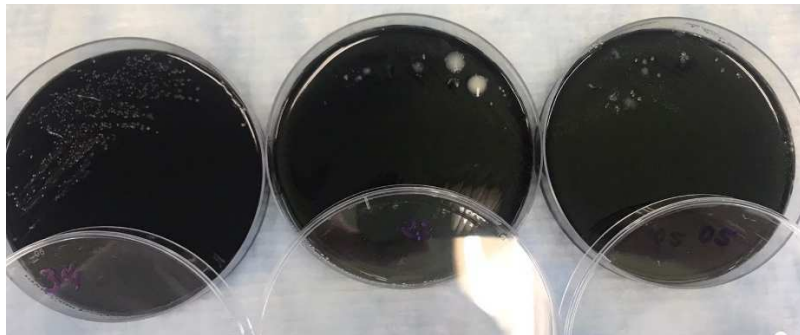


Figura 4. Placas de mCCDA inoculadas com amostras de QMA fortificadas com *C. jejuni* após incubação em caldo Preston.

### 3.7.3. Identificação das espécies

Durante todo o estudo, a identificação pelo método de qPCR da espécie de *Campylobacter* inoculada foi corretamente obtida em 100 % das amostras. Resultados semelhantes foram encontrados durante o estudo de validação, que apresentou 100 % de concordância para inclusividade e exclusividade (Hoelzer *et al.*, 2018).

O método tradicional para detecção de *Campylobacter* foi testado nas vinte amostras de QMA, que foram inoculadas para o estudo de sensibilidade. A identificação do

microrganismo foi realizada por intermédio de provas bioquímicas (Figura 5). Uma amostra foi identificada como *C. coli* (negativa para o teste de hidrólise do hipurato), mas foi inoculada com a cepa de *C. jejuni*, resultando em 95 % de acerto. Resultados semelhantes foram encontrados durante estudo de validação de métodos de PCR para a confirmação e identificação de espécies de *Campylobacter* termotolerantes, onde 1,9 % das amostras de *C. jejuni* não foram identificadas pelo método tradicional, mas confirmadas por Maldi-Tof, durante o estudo de comparação de métodos (Ferrari *et al.*, 2023, apêndice E).

Como não houve a detecção de *Campylobacter* nas amostras analisadas, não foi possível comparar os dados entre os métodos.

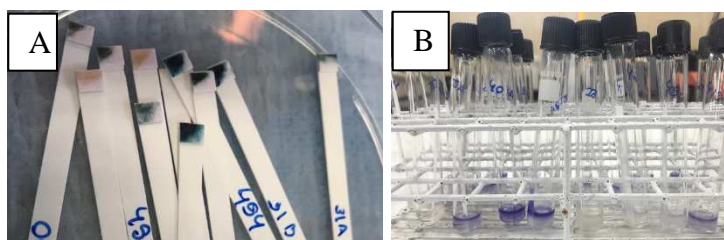


Figura 5. Testes bioquímicos para identificação da espécie de *Campylobacter* segundo ISO 10272-1. Figura A - teste de acetato de indoxil. Figura B - teste de hidrólise do hipurato.

### 3.8. Conclusão

O sistema BAX<sup>®</sup> de qPCR apresenta as características de desempenho necessárias e foi validado para a detecção de *Campylobacter* spp. em QMA. Os dados apresentados sugerem que este kit comercial, com a adição da etapa de enriquecimento em caldo Bolton, é adequado para uso, de acordo com a ISO 16140-2, e com o critério de aceitação de uso do FSIS (MLG, 2020).

As metodologias para detecção de *Campylobacter* spp. em queijo Minas artesanal pelos métodos ISO e qPCR apresentaram valores de limite de detecção e sensibilidade considerados semelhantes, e foi observada uma melhor diferenciação das três espécies estudadas pelo qPCR.

Além disso, com os testes realizados para se adequar à detecção do LDO<sub>50</sub>, pode-se concluir que o leite possui inibidores naturais que podem inativar algumas cepas de *Campylobacter*



spp.; a recuperação de *C. jejuni* no caldo Preston suplementado com sangue é melhor do que quando incubado em caldo Preston sem sangue; e também foi demonstrado que o caldo Preston suplementado com sangue e a matriz leite prejudicam o resultado do BAX®.

### 3.9. Referências

- ADMASIE, A.; ESHETU, A.; TESSEMA, T.S.; VIPHAM, J.; KOVAC, J.; ZEWDU, A. Prevalence of *Campylobacter* species and associated risk factors for contamination of dairy products collected in a dry season from major milk sheds in Ethiopia. **Food Microbiology**, v. 109, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104145>
- ANDRZEJEWSKA, M., SZCZEPANSKA, B., SPICA, D., KLAWE, J. Prevalence, virulence, and, antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in raw milk, beef, and pork meat in northern Poland, **Foods**, v. 8, n. 420, p. 1-13, 2019.
- BARATA, A.R.; NUNES, B.; OLIVEIRA, R.; GUEDES, H.; ALMEIDA, C.; SAAVEDRA, M.J.; DA SILVA, G.J.; ALMEIDA, G. Occurrence and seasonality of *Campylobacter* spp. in portuguese dairy farms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 383, 2022. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109961.
- BAX® System Real-Time PCR Assay. *Campylobacter jejuni/coli/lari Part KIT2018 (D12683449)*, 2019. **Protocolo de teste**. Hygiena, data efetiva 26 de março de 2019. 2 p. Disponível em: <https://cdn.brandfolder.io/VZSMQ4LE/at/rmwbbbsr9p7cgz6vr9w7c5qp/ins-bax-q7-assay-campylobacter-rt.pdf>
- BEUMER, R.R.; CRUYSE, J.J.M.; BIRTANTILE, I.R.K. The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, p. 93-96, 1988.
- BIESTA-PETERS, E.G.; ENNE DE BOER, I.J.; JACOBS-REITSMA, W.F. Validation by interlaboratory trials of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 1: Detection method. **International Journal of Food Microbiology**. v. 288, p. 39-46, 2018.
- BOLTON, F.J.; COATES, D.; HINCHLIFFE, P.M.; ROBERTSON, L. Comparison of selective media for isolation of *Campylobacter jejuni/coli*. **Journal of Clinical Pathology**. v. 36, n. 1, p. 78-83, 1983. doi: 10.1136/jcp.36.1.78. PMID: 6822680; PMCID: PMC498109.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 18161, 19 dez. 1950.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Aprova o regulamento técnico de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: Brasília, DF, p. 10785, 7 jul. 1952.
- CASTRO, A.G.S.C. **Detecção e quantificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas e congeladas por PCR em tempo real associada a propídio monoazida**

(PMA). 2015. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal.) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017, Annual Report**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.

CERVA, C.; BREMM, C.; REIS, E. M.; et al. Food safety in raw milk production: risk factors associated to bacterial DNA contamination. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 5, p. 877-882, 2014.

CHON, J. W.; SEO, K.H.; KIM, B.; JEONG, D.; SONG, K.Y. Advanced Methods for Isolating from and Confirming *Campylobacter* spp. in Milk and Dairy Products: Review. **Journal of Dairy Science and Biotechnology**, v. 38, n. 3, p. 121 – 133, 2020.

CHLEBICZ, A.; SLIZEWSKA, K. *Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 863, n. 15, 29 p, 2018.

**CIDASC alerta para o risco do consumo de leite cru**, Santa Catarina, 11 de maio de 2021. Disponível em:

<http://www.cidasc.sc.gov.br/blog/2021/05/11/cidasc-alerta-para-o-risco-do-consumo-de-leite-cru/>. Acesso em: jun. 2020.

CLAEYS, W.; CARDOEN, S.; DAUBE, G.; DE BLOCK, J.; DEWETTINCK, K.; DIERICK, K.; DE ZUTTER, L.; et al. Raw or heated cow milk consumption: review of risks and benefits. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 251–262, 2013.

CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; D'AMATO, D.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Prolonging microbial shelf life of foods through the use of natural compounds and non-thermal approaches – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 223–241, 2009. DOI:10.1111/j.1365-2621.2008.01883.x

COSTARD, S.; ESPEJO, L.; GROENENDAAL, H.; ZAGMUTT, F.J. Outbreak-Related Disease Burden Associated with Consumption of Unpasteurized Cow's Milk and Cheese, United States, 2009-2014. **Emerging Infectious Diseases**, v.23, n. 6, p. 957-964, 2017.

DE LONGHI, R.; MORENO, A.C.P.; REIS, A.B.; OKANO, W.; ARAGON-ALEGRO, L.C.; SANTANA, E.H.W. Perfil dos consumidores de leite cru da cidade de Araçongas – PR. **Revista do Instituto Laticínio Cândido Tostes**, Mar/Abr, v. 65, n. 373, p. 14-19, 2010.

DEL COLLO, L., KARNS, J.S., BISWAS, D., LOMBARD, J.E., HALEY, B.J., KRISTENSEN, R.C., KOPRAL, C.A., FOSSLER, VAN KESSEL, J.A.S. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* spp. in bulk tank milk and milk filters from US dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3470-3479, 2017.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal** 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

EL-ZAMKAN, M.A., ABDEL HAMEED, K.G. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in raw milk and some dairy products, **Veterinary World**, v. 9, n. 5, p. 1147-1151. 2016.

FERRARI, S.; ÁSTVALDSSON, A.; JERNBERG, T.; STINGL, K.; MESSELHÄUßER, U.; SKARIN, H. Validation of PCR methods for confirmation and species identification of thermotolerant *Campylobacter* as part of EN ISO 10272 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 388, 2023.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110064>.

FERREIRA, M.F.P.; BONATO, M.C.; REDIN, F.C.; LOSS D. *et al.* Surto de gastroenterite aguda por *Campylobacter jejuni*, município de Cascavel-PR, 2017. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE SAÚDE COLETIVA, 2018, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/saude-coletiva-2018/papers/surto-de-gastroenterite-aguda-por-campylobacter-jejuni--municipio-de--cascavel-pr--2017>> Acesso em: 10 ago. 2021.

GHARST, G.; OYARZABAL, O.A.; HUSSAIN, S.K. Review of current methodologies to isolate and identify *Campylobacter* spp. from foods, **Journal of Microbiological Methods**, v. 95, p. 84-92, 2013.

GÖLZ, G.; KITTLER, S., MALAKAUSKAS, M. *et al.* Survival of *Campylobacter* in the Food Chain and the Environment. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, p. 126–134, 2018.

HAZELEGER, W.C.; JACOBS-REITSMA, W.F.; DEN BESTEN H.M.W. Level of Detection (LOD<sub>50</sub>) of *Campylobacter* is strongly dependent on strain, enrichment broth, and food Matrix. **Frontiers in Microbiology**. v. 13, art. 834568, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.834568

HOELZER, S.; WALLACE, F.M.; FLECK, L.; DiCOSIMO, D.; HARRIS, J., ANDALORO, B.; FARNUM, A.; DAVIS, E.; ROHRBECK, J. Evaluation of Qualicon Diagnostics LLC, a Hygiena company BAX<sup>®</sup> System Real- Time PCR Assay for *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari*. **AOAC Performance Tested**. Certification number 04702. 23 january 2018.

IGWARAN, A., OKOH, A.I. Human campylobacteriosis: a public health concern of global importance, **Heliyon**, v. 5, e02814, p. 1-14, 2019.

International Organization of Standardization. **ISO 10272-1**: microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method. Switzerland: ISO, 2017.

International Organization of Standardization. **ISO 16140-2**: microbiology of food chain – Method Validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. Switzerland: ISO, 2016.

International Organization of Standardization. **ISO 16140-3**: microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference methods and validated alternative methods in a single laboratory. Switzerland: ISO, 2021.

ISO/TC 34/SC 9/WG 3 “Method validation”. Overview of the ISO 16140 series – standards for validation and verification of microbiology methods. Version: 20210322, 22 de março de 2021. Disponível em: [https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/1\)%20Presentation\\_Overview\\_ISO\\_16140\\_series\\_20210322.pdf](https://committee.iso.org/files/live/sites/tc34sc9/files/Method%20validation-verification/1)%20Presentation_Overview_ISO_16140_series_20210322.pdf). Acesso em: 20 mar. 2022.

JAAKKONEN, A.; KIVISTÖ, R.; AARNIO, M.; KALEKIVI, J.; HAKKINEN, M. Persistent contamination of raw milk by *Campylobacter jejuni* ST-883. PLoS One. 2020 Apr 21;15(4):e0231810. doi: 10.1371/journal.pone.0231810. PMID: 32315369; PMCID: PMC7173850.

JAHANI, S.; SHAKIBA, A.; JAHANI, L. The Antimicrobial Effect of Lactoferrin on Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. **International Journal of Infection**, v. 2, n. 3, e27954. 2015. DOI: 10.17795/iji27594

KASHOMA, I.P.; KASSEM, I.I.; JOHN, J., et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* Isolated from Dressed Beef Carcasses and Raw Milk in Tanzania. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 1, p. 40-52, 2016.

KINGSBURY, J.M.; SOBOLEVA, T.K. Evaluation of culture-based and molecular detection methods for *Campylobacter* in New Zealand raw cows' milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 130, p. 478-492, 2020. doi:10.1111/jam.14798

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S. Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

KRALIK, P.; RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, art., 108, 2017. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108

KRELING, V.; FALCONE, F. H.; KEHRENBERG, C.; HENSEL, A. *Campylobacter* sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 24, p. 10409-10436, 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10974-5.

LOPES, G.V. ***Campylobacter* spp. no abate e varejo: ocorrência em carcaças de bovinos para exportação e em cortes refrigerados de aves e bovinos**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Alerta para perigos do consumo de leite cru**, Brasília, 25 de junho de 2019. Disponível em:

<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/ministerio-alerta-para-perigos-do-consumo-de-leite-cru>. Acesso em jun. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 40 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico 32**. Brasília: Ministério da Saúde, v. 51, n. 32, agosto de 2020.

MLG. Microbiology Laboratory Guidebook. MLG 41.07. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. *Isolating and Identifying *Campylobacter jejuni/coli/lari* from poultry rinsate, sponge and raw product samples*. Rev. 7, 03/07/2022.

MLG. Microbiology Laboratory Guidebook. MLG Appendix 1.10. Food Safety and Inspection Service. United States Department of Agriculture. *Media and Reagents*. Rev. 10, 03/07/2022.

MODI, S., BRAHMBHATT, M.N., CHATUR, Y.A.; NAYAK, J.B. Prevalence of *Campylobacter* species in milk and milk products, their virulence gene profile and antibiogram, **Veterinary World**, 8(1): 1-8. 2015.

NACHAMKIN, I.; SZYMANSKI, C.M.; BLASER, M.J. et al. ***Campylobacter***. 3ª edição. Washington, DC: ASM Press. 2008.

NARCIZO, D.K; MONTANHINI, M.T.M. Ocorrência de *Campylobacter jejuni* em leite cru e pasteurizado comercializado em Curitiba, estado do Paraná, Brasil. **Revista do Instituto Cândido Tostes**, v. 69, n. 5, p. 341-347, 2014.

NEAL, C. E., CALBERT, H. E., The use of 2, 3, 5 – triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. **Journal of Food Protection**, v. 38, n. 6, p. 629 – 633, 1955.

NOTA INFORMATIVA conjunta CEVS/SES/RS - SMS SANTA MARIA. Surto de doença diarreica aguda no município de Santa Maria. 01 de Setembro de 2020. Disponível em: <<https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/202009/04182017-relatorio-final-sesi-dtha.pdf>>.

ODONGO, R.; REILLY, S.S.; GILLILAND, S.E. Validation of an Improved Method for Detection of *Campylobacter jejuni* in Foods. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. M207-M212, 2009. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01153.x

OLIVER, S.P.; JAYARAO, B.M.; ALMEIDA, R.A. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 2, n.2, p.115-129, 2005.

PARK, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177-188, 2002.

PARTE, A.C. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 68, 1825-1829. 2018. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/campylobacter>>. Acesso em 05 de jun. 2020.

PITKANEN, T.; HANNINEN, M-L. Members of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) Global. Water Pathogens Project. Part 3 – Specific excreted pathogens: environmental and epidemiology aspects. 2ª ed. 2017. 39 p. Disponível em: <http://www.waterpathogens.org> (A. Pruden, N. Ashbolt and J. Miller (eds) Part 3 Bacteria)

POST, D. E. Food-Borne Pathogens Monograph Number 3 Campylobacter. Oxoid, 38 p. 1995.

RAZZUOLI, E.; VENCIA, W.; FEDELE, V.; MIGNONE, G.; LAZZARA, F.; RUBINI, D.; VITO, G.; PORCARIO, C.; BOZZETTA, E.; FERRARI, A. Evaluation and validation of an alternative method to detect *Campylobacter* spp. in dairy products. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n.7180. p. 89-94, 2018.

RICKE, S.C.; FEYE, K.M.; CHANEY, W. E.; SHI, Z.; Pavlidis, H. and Yang, Y. Developments in Rapid Detection Methods for the Detection of Foodborne *Campylobacter* in the United States. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, n. 3280, 2019.

ROHDE, A., HAMMERL, J.A; BOONE, I.; JANSEN, W.; FOHLER, S.; KLEIN, G.; DIECKMANN, R.; DAHOUK, S. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens, **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 113-118, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.006>.

SANTOS, E.L.S. **Detecção e identificação de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango de corte produzidas no estado de Minas Gerais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal.) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK L.; JOHNE R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014-26, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22747964.

SEIFU, E.; BUYS, E. M.; DONKIN, E.F. Significance of the lactoperoxidase system in the dairy industry and its potential applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 137–154, 2005.

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: Blucher, 2017. 560 p.

SILVEIRA, D. R. et al. *Campylobacter* sp. in dairy cows from southern Brazil. **Archives of Veterinary Science**, v. 26, n. 1, mar. 2021. ISSN 2317-6822. Available at: <<https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/74559/43261>>. Date accessed: 29 mar. 2023. doi:<http://dx.doi.org/10.5380/avs.v26i1.74559>.

SIMUNOVIC, K.; RAMIC, D.; XU, C.; MOŽINA, S.S. Modulation of *Campylobacter jejuni* Motility, Adhesion to Polystyrene Surfaces, and Invasion of INT407 Cells by Quorum-Sensing Inhibition. **Microorganisms**, v. 104, n. 8, p. 1-14, 2020.

SOTO-BELTRÁN, M.; LEE, B.G.; AMÉZQUITA-LÓPEZ, B. A.; QUIÑONES, B. Overview of methodologies for the culturing, recovery and detection of *Campylobacter*. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 33, n. 3, p. 307-323. 2023. <https://doi.org/10.1080/09603123.2022.2029366>

SPEEGLE, L.; MILLER, M.E., BACKERT, S.; OYARZABAL, O.A. Use of Cellulose Filters To Isolate *Campylobacter* spp. from Naturally Contaminated Retail Broiler Meat. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 12, p. 2592-2596, 2009.

TACK, D.M.; Ray, L.; Griffin, P. M., et al. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2016–2019. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**. v. 69, p. 509–514, 2020

TAYLOR, E.V; HERMAN, K.M.; AILES, E.C.; FITZGERALD, C.; YODER, J.S; MAHON, B.E.; TAUXE, R.V. Commom source outbreaks of *Campylobacter* infection in the USA, 1997-2008. **Epidemiology & Infection**, v. 141, p. 987-996, 2013.

TRAM, G.; DAY, C. J.; KOROLIK, V. Bridging the Gap: A Role for *Campylobacter jejuni* Biofilms. **Microorganisms**, v. 452, n. 8, p. 1-11, 2020.

TRIBBLE, D.R, BAQAR, S., SCOTT, D.A., OPLINGER, M.L., TRESPALACIOS, F., ROLLINS, D., WALKER, R.I., CLEMENTS, J.D., WALZ, S., GIBBS, P., BURG, E.F., MORAN, A. P., APPLEBEE, L., BOURGEOIS, A.L. Assessment of the duration of protection in *Campylobacter jejuni* experimental infection in humans. **American Society for Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1750-1759, 2010.

USDA-APHIS (USDA Animal and Plant Health Inspection Service). 2011. Salmonella, Listeria, and *Campylobacter* on U.S. Dairy Operations, 1996–2007. USDA-APHIS-VS, CEAH, Fort Collins, CO.

VENCIA, W.; NOGAROL, C.; BIANCHI, D.M.; GALLINA, S.; ZUCCON, F.; ADRIANO, D.; GRAMAGLIA, M.; DECASTELLI, L. Validation according to ISO 16140:2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, and *C. lari* in foods. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 177, p. 78-80, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.009>

WILLIAMS, E.N.; VAN DOREN, J. M.; LEONARD, C. L.; DATTA, A. R. Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, and *Campylobacter* spp. in raw milk in the United States between 2000 and 2019: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Food Protection**, v. 86, n. 2, 2023. doi: 10.1016/j.jfp.2022.11.006. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36916568.

WILRICH, C.; WILRICH, P.T. Estimation of the POD Function and the LOD of a Qualitative Microbiological Measurement Method, **Journal of AOAC INTERNATIONAL**, v. 92, Issue 6, 1 November 2009, p. 1763-1772, <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.6.1763>

WHO. World Health Organization. *Campylobacter*. Disponível em: <  
<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>>. Maio de 2020.

WHYTE, P.; HAUGHTON, P; O'BRIEN; FANNING, S.; MAHONY, E; MURPHY, M.  
Pathogens in Milk | *Campylobacter* spp. Ireland: Elsevier, 2011. p.40-46.

WULSTEN, I.F.; GALEEV, A.; STINGL K. Underestimated Survival of *Campylobacter* in  
Raw Milk Highlighted by Viability Real-Time PCR and Growth Recovery. **Frontiers in  
Microbiology**, 2020 Jun 17;11:1107. doi: 10.3389/fmicb.2020.01107. PMID: 32625171;  
PMCID: PMC7311638.



## 4. CAPÍTULO II – OCORRÊNCIA DE *Campylobacter* spp. E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA EM QUEIJOS MINAS ARTESANAL

### 4.1. Introdução

A ocorrência de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) vem aumentando de modo significativo em nível mundial e vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, entre os quais destacam-se o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui, ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações e à mudança de hábitos dos consumidores, que procuram alimentos preparados com aditivos e conservantes. Sem deixar de considerar mudanças ambientais, globalização e as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive internacionalmente (Lanza, 2017; Ministério da Saúde, 2022b).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil, no período de 2012 a 2021, foram identificados 6.347 surtos de DTHA, totalizando 104.839 doentes e 89 óbitos. Os dez agentes etiológicos mais identificados em 1.559 surtos nesse período foram: *Escherichia coli* (29,6 %), *Staphylococcus aureus* (12,9 %), *Salmonella* (11,2 %), *Bacillus cereus* (7,2 %), Norovírus (5,2 %), coliformes (4,9 %), Rotavírus (4,4 %), *Clostridium perfringens* (3,0 %), *Escherichia coli* enteropatogênica (2,8 %), *Trypanosoma cruzi* (2,0 %), *Shigella sonnei* (1,7 %), vírus da hepatite A (1,5 %) e outros (13,7 %). Dentre os alimentos identificados em 2.126 surtos investigados, a água e os alimentos mistos são os mais envolvidos nos surtos com 25,2 e 22,1 %, respectivamente, seguidos de múltiplos alimentos (10,7 %), doces e sobremesas (9,9 %) e em quinta posição o leite e derivados (7,1 %) (Ministério da Saúde, 2022b).

A contaminação microbiana na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os produtos lácteos, pela própria matéria prima e alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente suscetíveis a essa contaminação (Perry, 2004). Dentre esses alimentos, merecem destaque os queijos, pelo fato de serem produtos muito manipulados e também ricos em nutrientes, o que facilita a multiplicação microbiana, podendo levar à transmissão de microrganismos patogênicos.

No Brasil, a concentração das indústrias de laticínios se dá, em sua maior parte, nas regiões de maior produção de leite, principalmente na região centro-sul de Minas Gerais, que abriga 36% de todos os estabelecimentos fiscalizados (Zoccal, 2016). Além da forte presença industrial no Estado, os queijos artesanais têm sido cada vez mais valorizados e consumidos. Desde maio de 2008, o “modo de fazer” do queijo Minas artesanal (QMA) foi considerado patrimônio cultural pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN (IPHAN, 2014).

Devido à ausência do tratamento térmico na matéria prima, o QMA pode veicular bactérias potencialmente patogênicas e/ou suas toxinas trazendo risco à saúde do consumidor, principalmente quando somado ao fato de que é consumido pela população, em muitos casos, ainda fresco. O objetivo desse capítulo foi determinar a ocorrência de *Campylobacter* spp. e avaliar a qualidade microbiológica e físico-química de queijos Minas artesanais com e sem inspeção governamental no estado de Minas Gerais.

#### **4.2. Queijo Minas Artesanal (QMA)**

Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), “entende-se por queijo o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, coagulados pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de 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” (MAPA, 1996).

Embora o processo básico de fabricação de queijos seja comum a quase todos eles, variações na origem do leite, nas técnicas de processamento e no tempo de maturação criam a imensa variedade conhecida – cerca de 1.000 tipos (Perry, 2004).

Os queijos artesanais caracterizam-se tipicamente por serem produzidos em pequena escala, utilizando leite oriundo da propriedade rural e seguindo técnicas tradicionais próprias de cada região (kamimura *et al.*, 2019). O modo de fazer do QMA compreende a seguinte sequência de atividades: obtenção do leite por ordenha manual ou mecânica; coagem do leite e acondicionamento em vasilhame próprio; adição do coalho (natural, feito de estômago de bezerro, ou industrial); adição do pingo (fermento natural); coagulação do leite, por um período de até 90 minutos; corte da massa e mexedura; dessoragem e colocação da massa em

formas de 13 a 15 cm de diâmetro e prensagem manual. Esta pode ser feita apenas com o uso das mãos (Serro), ou com a ajuda de um pano (Serra da Canastra e Serra do Salitre/ Alto Paranaíba); seguida por salga (sal grosso), durante 6 a 12 horas; recolhimento do pingo a partir do soro que drena dos queijos após a salga; viragem do queijo e segunda salga, por 12 horas. Após 48 horas, o queijo é retirado da forma e colocado em prateleiras para maturar (curar). O tempo de maturação (ou de cura) varia de região para região. O acabamento também varia com a região: grosagem, ou rala (rela), feita na região do Serro com ralos artesanais ou industriais. Nas regiões da Canastra e de Serra do Salitre, o acabamento é feito com lixas, ou então não se faz, deixando a casca amarela ao natural (IPHAN, 2014).

As legislações federais e estaduais exigem, para queijos produzidos com leite sem tratamento térmico, a obrigatoriedade da utilização da etapa de maturação. Quando o período de maturação for inferior a 60 (sessenta) dias, o tempo deve ser definido após pesquisas técnico-científicas comprovarem a eficácia, sem prejuízo da qualidade e inocuidade dos produtos (IMA, 2013; Brasil, 2017). Já está estabelecido o período de maturação mínimo para algumas regiões produtoras de QMA, como: 14 (quatorze) dias para as microrregiões de Araxá, Canastra e Serra do Salitre, 17 (dezesete) dias para a microrregião do Serro, e para as demais regiões do Estado, caracterizadas ou não como produtora de QMA, o período mínimo de maturação será de 22 (vinte e dois) dias ou pelo maior período especificado em estudos científicos (IMA, 2021).

Diferentes estudos para caracterizar a qualidade do QMA ao longo de sua maturação foram realizados para a região do Serro (Martins *et al.*, 2015), Serra do Salitre (Figueiredo, 2018), Araxá (Sales, 2015), Serra da Canastra (Dores *et al.*, 2013; Ferraz, 2016; Campos, 2019), Campo das Vertentes (Oliveira, 2014; Pereira, 2019; Valente, 2022) e Uberlândia (Soares, 2014). O tempo mínimo de maturação encontrado, considerando-se os parâmetros microbiológicos das legislações, foi de 14 dias (Sales, 2015; Figueiredo, 2018), 17 dias (Ferraz, 2016; Martins *et al.*, 2015), 22 dias (Dores *et al.*, 2013; Campos, 2019; Valente, 2022), 24 dias (Oliveira, 2018) e 26 dias (Soares, 2014). Mas alguns autores encontraram um tempo mínimo de 60 dias, principalmente quando as pesquisas da produção do QMA foram realizadas durante a época chuvosa (Oliveira, 2014; Pereira, 2019; Valente, 2022).

O QMA deve “apresentar consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite

integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem” (Minas Gerais, 2002; Minas Gerais, 2011).

A utilização do nome das regiões específicas ficou restrita aos locais caracterizados ou que possuíssem Indicação Geográfica. Até o momento, dez regiões produtoras de QMA foram devidamente reconhecidas pelo Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), a partir de Portarias publicadas, como tipicamente produtoras de queijo Minas artesanal. A primeira região a ser reconhecida como produtora de QMA no Estado foi o Serro, em 2002, seguida pelas regiões de Araxá e Alto Paranaíba em 2003 e Canastra em 2004. Posteriormente, a região do Alto Paranaíba passou a ser denominada de Cerrado (IMA, 2002; IMA, 2003a; IMA, 2003b; IMA, 2004; IMA, 2007). A identificação da microrregião do Campo das Vertentes foi feita em 2009 e as regiões do Triângulo Mineiro e da Serra do Salitre foram reconhecidas em 2014. A microrregião da Serras do Ibitipoca foi identificada em 2020 e, as últimas microrregiões legalmente identificadas são Diamantina e Entre Serras da Piedade ao Caraça em 2022 (IMA, 2009; IMA, 2014a; IMA, 2014b; IMA, 2020; IMA, 2022a; IMA, 2022b).

A divisão dessas microrregiões é baseada em fatores abióticos, como altitude, temperatura média, umidade relativa do ar e peculiaridades do processo de fabricação do queijo. Esses fatores conferem características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas distintas aos queijos artesanais produzidos. Embora as etapas do processo de fabricação do queijo sejam bastante semelhantes entre as microrregiões, os fatores climáticos favorecem o desenvolvimento de espécies microbianas específicas durante o período de produção e maturação, resultando em uma assinatura microbiana desses produtos. Conseqüentemente, as condições naturais associadas ao saber fazer específico de cada região produtora conferem a cada queijo mineiro artesanal uma identidade única, apesar da ausência de diferenças documentadas (Kamimura *et al.*, 2019).

#### **4.3. Qualidade microbiológica em queijos**

Estudos para verificar a qualidade microbiológica dos QMA comercializados em diferentes regiões do País foram realizados, tais como em Brasília/DF (Amorim *et al.*, 2014), Belo Horizonte/MG (Sobral *et al.*, 2017b), Montes Claros/MG (Pinto *et al.*, 2016), Uberlândia/MG (Rezende *et al.*, 2010), São Paulo/SP (Ferreira, 2020) e também nas regiões do Serro/MG (Brant *et al.*, 2007; Andretta *et al.*, 2019) e Serra da Canastra/MG (Campos *et al.*, 2021). Todos esses autores encontraram um alto índice de amostras em desacordo com os padrões

microbiológicos das legislações vigentes, principalmente pelas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, que variou de 32 a 42 % (Ferreira, 2020; Campos *et al.*, 2021) até 100 % das amostras (Rezende *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2016) e contagens de coliformes totais, variando de 19 % (Campos *et al.*, 2021) a 80 – 100 % (Brant *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2016; Sobral *et al.*, 2017b). Contaminação por *Salmonella* não foi detectada (Brant *et al.*, 2007; Rezende *et al.*, 2010; Amorim *et al.*, 2014; Andretta *et al.*, 2019; Campos *et al.*, 2021) ou encontrada em 1 % (Ferreira, 2020) e 11 % das amostras (Pinto *et al.*, 2016). Assim como *L. monocytogenes*, que não foi detectada (Brant *et al.*, 2007; Amorim *et al.*, 2014; Andretta *et al.*, 2019) ou detectada em baixa frequência de 1 % (Campos *et al.*, 2021) e 3 % (Ferreira, 2020).

#### 4.3.1. Legislação

O MAPA, de acordo com a Instrução Normativa 146, de 07 de março de 1996 (MAPA, 1996), estabeleceu como critérios microbiológicos para inspeção de queijos as contagens de coliformes totais e termotolerantes e de *Staphylococcus* coagulase positivo e detecções de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*. O critério de aceitação varia de acordo com o teor de umidade do queijo, sendo que para queijos de baixa umidade (umidade menor que 36 %) não se analisa *L. monocytogenes* e para queijos de muita alta umidade (umidade > 55%), é adicionada a contagem de fungos.

Já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, revisou recentemente os critérios microbiológicos para alimentos e, de acordo com a Instrução Normativa 161, de 1 de julho de 2022, os padrões microbiológicos para queijo são: detecção de enterotoxinas estafilocócicas e de *Salmonella* spp. e contagens de estafilococos coagulase positiva e *Escherichia coli*, conforme demonstrada na Tabela 11 (Ministério da saúde, 2022a). A contagem de bolores e leveduras é considerada somente para queijos ralados ou em pó,

Para os QMA, o estado de Minas Gerais indica, através da Portaria 2.238 de 27 de junho de 2023, os parâmetros estabelecidos nos regulamentos técnicos de identidade e qualidade (RTIQ) do MAPA (MAPA, 1996). Nesse caso, o regulamento técnico geral para fixação dos requisitos microbiológicos de queijo do MAPA classifica os queijos segundo o teor de umidade e, para o QMA indica-se um teor de umidade abaixo de 46 % (Tabela 12).

Tabela 11 – Padrões microbiológicos para queijos estabelecidos pela ANVISA

Microrganismo / Toxina	Padrão
Enterotoxinas estafilocócicas (ng/g)	n=5; c=0; m=10; M=-
<i>Salmonella</i> spp./25 g	n=5; c=0; m=10; M=-
Estafilococos coagulase positivo /g	n=5; c=2; m=100; M=1.000
<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade abaixo de 46%	n=5; c=2; m=10; M=100
<i>Escherichia coli</i> /g, para queijos com umidade igual ou acima de 46%	n=5; c=2; m=100; M=1000
<i>Listeria monocytogenes</i> /g	n=5; c=0; m=100; M=-

Legenda: **n** = nº de amostras colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente, **c** = nº máximo aceitável de amostras com contagens entre os limites de m e M, **m** = limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; **M** = limite que separa o produto aceitável do inaceitável.

Tabela 12 - Padrões microbiológicos para queijos de média umidade (umidade entre 36 % e 46 %) estabelecido pelo MAPA

Parâmetro	Padrão
Coliformes a 35°C (UFC /g)	n=5; c=2; m=1.000; M=5.000
Coliformes a 45°C (UFC /g)	n=5; c=2; m=100; M=500
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo (UFC /g)	n=5; c=2; m=100; M=1.000
<i>Salmonella</i> spp. (/25 g)	n=5; c=0; m=0; M=-
<i>Listeria monocytogenes</i> (/25 g)	n=5; c=0; m=0; M=-

Legenda: **n** = nº de amostras colhidas aleatoriamente de um mesmo lote e analisadas individualmente, **c** = nº máximo aceitável de amostras com contagens entre os limites de m e M, **m** = limite que, em um plano de três classes, separa o lote aceitável do produto ou lote com qualidade intermediária aceitável; **M** = limite que separa o produto aceitável do inaceitável.

#### 4.3.2. Microrganismos

##### 4.3.2.1. Coliformes e *Escherichia coli*

A detecção de coliformes em produtos finais, incluindo queijos, tem sido tradicionalmente usada como indicadora se o alimento foi processado sob condições higiênico-sanitárias inadequadas (Trmcic *et al.*, 2016). Uma das aplicações mais comuns da contagem de coliformes como microrganismos indicadores é a sua associação com as condições higiênicas e a qualidade em geral, especialmente em alimentos processados por aquecimento. Coliformes em quantidades baixas são eliminados pela maioria dos processos de aquecimento, como, por exemplo, a pasteurização do leite; portanto, a sua presença geralmente indica um processo inadequado de aquecimento ou uma contaminação após o processamento térmico (Cornell University, 2007). Também podem ser usados como indicadores de falhas de higiene durante

a fabricação de alimentos, já que são facilmente inativados pelos sanitizantes (Silva *et al.*, 2017).

Coliformes totais ou a 30 °C são definidos como um grupo não taxonômico de bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, Gram negativos, não formadores de esporos que fermentam a lactose com a produção de ácido e gás em 48 horas a 35 °C (32-37 °C) (Cornell University, 2007; Trmcic *et al.*, 2016). O grupo é formado por mais de 20 espécies, dentre as quais encontram-se tanto bactérias oriundas do trato gastrointestinal de humanos e outros animais de sangue quente (*Escherichia coli*), como também não entéricas, encontradas no meio ambiente e no solo (espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, dentre outras) (Silva *et al.*, 2017, Antonio e Borelli, 2020).

Os coliformes não são inerentes à microbiota do leite cru e podem ser introduzidos no leite a partir do ambiente, água, úbere e equipamentos de ordenha durante e após a ordenha (Metz *et al.*, 2020). Trmcic *et al.* (2016) realizaram um experimento com a finalidade de caracterizar os coliformes presentes em diferentes queijos para avaliar suas prováveis fontes e relevância para a saúde pública. Um total de 273 queijos foram analisados e 588 isolados de coliformes foram identificados pelo sequenciamento de parte do rDNA 16S e classificados em 13 gêneros diferentes dentro da família Enterobacteriaceae (*Buttiauxella*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Lelliottia*, *Rahnella*, *Raoultella* e *Serratia*). O gênero mais frequentemente isolado de todos os queijos testados foi *Hafnia*, seguido de *Raoultella* e *Serratia*. *Hafnia* e *Serratia* possuem enzimas proteolíticas ativas que degradam caseínas e influenciam na textura, bem como nas propriedades sensoriais do queijo. *Hafnia alvei* é uma espécie muito comum em queijos e contribui para o acúmulo de compostos voláteis de aroma. Os gêneros *Cedecea*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Lelliottia*, *Rahnella*, *Buttiauxella* e *Leclercia* foram isolados de menos de 5% de amostras de queijo e são comumente encontrados em diferentes fontes de água, bem como em peixes, moluscos e insetos. Esses autores sugerem que muitos dos coliformes presentes no queijo podem contribuir para sua qualidade final e não representam indicadores das condições anti-higiênicas nas quais o queijo foi fabricado. Já *Escherichia* foi um dos gêneros mais encontrados em queijos produzidos com leite cru, e foi identificada a sua origem fecal direta ou indireta no queijo.

Como os coliformes nem sempre se originam de fontes fecais, o conceito de coliformes termotolerantes ou fecais, que têm a capacidade de fermentar a lactose a 45 °C, foi introduzido para refletir melhor a origem fecal (Metz *et al.*, 2020). Quase todas as linhagens de *E. coli* estão dentro dessa definição e também linhagens de *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* spp. (*E. agglomerans*, *E. aerogenes* e *E. cloacae*) (Cornell University, 2007).

Dentre os coliformes termotolerantes, *E. coli* é o melhor indicador de contaminação fecal por ser microrganismo específico do trato gastrointestinal de animais de sangue quente, estar presente nas fezes em um número alto o suficiente para ser facilmente detectado após diluição, ter uma alta taxa de sobrevivência na amostra e ser facilmente detectado, mesmo em baixos números (Cornell University, 2007). Alguns países, como aqueles pertencentes à comunidade europeia, não mais pesquisam coliformes totais ou termotolerantes como indicadores da qualidade higiênico-sanitária do processamento de alimentos, tendo substituído por *E. coli*, tal como indicado no Regulamento da Comunidade Europeia nº 2073/2005 (CE, 2019), assim como na revisão atual da legislação da ANVISA, pela Instrução Normativa nº 161 de 2022 (Ministério da saúde, 2022a).

#### 4.3.2.2. *Staphylococcus* spp. e enterotoxinas

Os estafilococos coagulase positivos são *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. *S. hyicus* é coagulase variável. Essas espécies são consideradas patógenos potencialmente sérios e, por essa razão, a produção de coagulase é considerada uma indicação de patogenicidade entre as espécies de *Staphylococcus*. Dentre essas espécies, *S. aureus* é a mais comumente associada em intoxicações alimentares (Silva *et al.*, 2017).

*S. aureus* não são bons competidores, mas possuem a capacidade de crescer em ambientes adversos, tais como atividade de água relativamente baixa ( $a_w = 0,86$ ), baixo pH (4,8) e altas concentrações de sal e açúcar (15 %) e na presença de  $\text{NO}_2$ . A temperatura ótima de crescimento é de 35 °C, mas cresce na faixa de 7 a 47,8 °C; suas células morrem quando expostas a 66 °C por 12 minutos e a 72 °C por 15 segundos, mas suas toxinas são termorresistentes (Ray, 2003; Silva *et al.*, 2017).



Várias espécies de estafilococos produzem enterotoxinas, incluindo coagulase positivos e negativos. A intoxicação alimentar estafilocócica é considerada uma das doenças alimentares mais frequentes em todo mundo. *S. aureus*, juntamente com muitos outros estafilococos, são naturalmente presentes no nariz, garganta, pele e cabelos (penas) de seres humanos saudáveis, animais e pássaros e pode estar presente em infecções, como cortes na pele e abscessos. A contaminação dos alimentos geralmente ocorre a partir dessas fontes (Ray, 2003; Silva *et al.*, 2017).

Muitos alimentos foram implicados em surtos estafilocócicos de origem alimentar. Em geral, a bactéria cresce nos alimentos e produz toxinas sem afetar a qualidade de aceitação. Alimentos ricos em proteínas, que são muito manipulados, alimentos em que bactérias associadas crescem mal e alimentos mantidos fora da temperatura de refrigeração estão associados à intoxicação estafilocócica (Ray, 2003).

A presença desse microrganismo em QMA é comum, conforme observado em vários estudos (Ornelas *et al.*, 2012; Dores *et al.*, 2013; Soares, 2014; Ferreira, 2020). Esse fato ocorre devido as condições sanitárias inadequadas na produção, desde a obtenção do leite até o processamento do queijo, tais como a mastite nas vacas, presença do microrganismo na pele dos manipuladores e no ambiente de produção do queijo e comercialização (Ferreira, 2020).

*S. aureus* expressa uma grande variedade de fatores de virulência secretados e associados a células. Essas propriedades o tornam um patógeno versátil capaz de uma ampla gama de infecções. Os fatores secretados incluem várias enzimas, citotoxinas, exotoxinas e toxinas esfoliativas. A principal função dessas enzimas é transformar os componentes do hospedeiro em nutrientes que as bactérias podem usar para se multiplicar. Entre os outros fatores secretados estão as exotoxinas que incluem as enterotoxinas estafilocócicas (SE) e a toxina da síndrome do choque tóxico (Pinchuk *et al.*, 2010). A maioria dos genes que codificam SEs estão localizados em elementos móveis, como plasmídeos, bacteriófagos ou ilhas de patogenicidade. Assim, a transferência horizontal entre cepas não é rara (Pinchuk *et al.*, 2010; Duquenne *et al.*, 2016).

As enterotoxinas de *S. aureus* (SEs) são classificadas como superantígenos, que têm a capacidade de desencadear uma resposta imune muito mais forte do que os antígenos normais. Essas proteínas SE têm uma notável capacidade de resistir ao calor e ao ácido. Portanto, elas

podem não ser completamente desnaturadas pelo cozimento moderado de alimentos contaminados. Elas são pirogênicas e compartilham algumas outras propriedades importantes que incluem a capacidade de induzir vômito e gastroenterite, bem como sua notável superantigenicidade. Elas são resistentes à inativação por proteases gastrointestinais, incluindo pepsina, tripsina, renina e papaína, assim, podem facilmente permanecer além das bactérias que as produzem (Pinchuk *et al.*, 2010).

Embora existam mais de 20 enterotoxinas estafilocócicas descritas, apenas SEH e as cinco SE clássicas, SEA a SEE, foram claramente envolvidas em surtos de intoxicação alimentar. As enterotoxinas estafilocócicas mais comuns são SEA e SEB. A SEA é a toxina mais comum nas intoxicações alimentares relacionadas ao estafilococo. A SEB, embora esteja associada à intoxicação alimentar, foi estudada para uso potencial como uma arma biológica inalada. Sugere-se que a SED seja a segunda toxina estafilocócica mais comum associada à intoxicação alimentar em todo o mundo, necessitando de quantidades muito pequenas para induzir a intoxicação alimentar. A SEE também foi documentada em alguns casos de intoxicação alimentar, enquanto a SEF foi implicada na síndrome do choque tóxico (Pinchuk *et al.*, 2010; Duquenne *et al.*, 2016).

A quantidade de toxina necessária para causar doença é inferior a 1 µg. Num surto devido a leite com chocolate contaminado com enterotoxina (SEA), a quantidade de toxina relatada foi de apenas 0,5 ng/mL. A doença tem um curto período de incubação que varia de apenas alguns minutos a horas, desde que a toxina seja pré-formada. Os sintomas incluem náuseas, vômitos, dor abdominal, cólicas e diarreia. A SEA é responsável por aproximadamente 80% dos casos de surtos de intoxicação alimentar nos EUA, enquanto a SEB é responsável por 10% dos casos. A doença geralmente se resolve sozinha, raramente é letal e os idosos são mais suscetíveis (Pinchuk *et al.*, 2010).

Desde 2005, critérios sobre *Staphylococcus* coagulase positivo e SEs em várias categorias de alimentos foram listados na União Europeia (UE). Nesse regulamento nº 2073/2005, de 15 de novembro de 2005 da UE, a detecção de SE deve ser realizada quando as contagens de *Staphylococcus* forem superiores a 10<sup>5</sup> UFC/g, no estágio em que se espera que sejam as mais altas. Se forem detectadas SEs em uma porção de teste de 25 g, o alimento é considerado não seguro e este deve ser descartado (Duquenne *et al.*, 2016; CE, 2019). No Brasil, somente em 2019 que a Anvisa, pela Instrução Normativa nº 60, introduziu critérios de enterotoxinas

estafilocócicas em alguns alimentos, incluindo os queijos. Essa IN foi revogada e substituída pela IN nº 161, em 2022, mantendo a pesquisa das SEs.

Em 2019, 18 surtos de evidências fortes e 59 surtos de evidências fracas causados por intoxicação por enterotoxinas de *S. aureus* foram relatados na UE. A maioria desses surtos foi relatada como surtos gerais (N = 54) e envolveu um total de 1.324 casos (94,6 % causados por *S. aureus*). Dois grandes surtos foram relatados, causando doenças em 380 pessoas na Hungria e em 300 indivíduos, incluindo uma hospitalização, na França. O surto mais grave foi descrito na Itália, onde 44 dos 70 casos (62 %) precisaram de hospitalização. Nenhuma morte foi relatada (EFSA e ECDC, 2021).

No Brasil, entre 2012 a 2021, foram notificados 6.347 surtos de doenças transmitidas por alimentos, dos quais 1.559 tiveram os agentes identificados. Dentre esses, 12,9 % foram causados por *S. aureus*, sendo o segundo microrganismo mais envolvido em surtos alimentares no País (Ministério da Saúde, 2022b).

#### 4.3.2.3. *Salmonella*

*Salmonella* é um gênero membro da família Enterobacteriaceae, definido como bastonetes Gram negativos não esporogênicos, anaeróbicos facultativos e oxidase negativos. A temperatura de multiplicação varia entre 5 e 46 °C, com ótima entre 35 e 43 °C. O pH de multiplicação varia entre 3,8 e 9,5, com ótimo entre 7,0 e 7,5. A atividade de água mínima para crescimento é de 0,94 (Silva *et al.*, 2017).

O principal habitat das salmonelas é o trato gastrintestinal de humanos e animais e é transmitida por alimentos quando esses são contaminados por fezes de animais, ou por manipuladores de alimentos. As infecções ocasionadas por *Salmonella* spp. ocorrem através do consumo de água ou alimentos contaminados, especialmente produtos de origem animal, como ovos, leite, carne ou ainda, vegetais que tenham sido irrigados com água contaminada ou fertilizados com estrume contendo o patógeno. Além disso, a falta de higiene na manipulação dos alimentos também pode carrear a bactéria. No caso de produtos lácteos, *Salmonella* spp. pode ser transmitida por meio do consumo, em especial, de leite cru ou leite pasteurizado, com falhas no processo, e de queijos fabricados com leite contaminado (CDC, 2017a; Foodsafety, 2017, Silva *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2021).

*Salmonella* spp. são microrganismos altamente patogênicos e possuem parâmetros na legislação de ausência em 25 gramas em alimentos prontos para consumo, pois um número pequeno desses microrganismos pode causar a enfermidade (Ministério da saúde, 2022a).

Em geral, os sintomas da salmonelose duram de quatro a sete dias e a maioria das pessoas se cura sem a necessidade de um tratamento. Mas pode haver enfermidades mais graves nas pessoas imunodeprimidas, como idosos, crianças e pessoas com sistema imunológico enfraquecido (CDC, 2017a; Foodsafety, 2017, Silva *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2021). Os sintomas mais comuns de salmonelose ocorrem entre seis e 72 horas e incluem febre, dor de cabeça, cólicas abdominais e diarreia, que pode ocorrer com sangue. Náusea e vômito podem acontecer, mas com menos frequência. Quando a infecção por *Salmonella* é invasiva, elas podem atingir a corrente sanguínea, ossos, articulações, cérebro ou sistema nervoso, ou outros órgãos internos (CDC, 2017a). Os sorotipos mais comuns de *Salmonella* que causam infecção humana são: Enteritidis, Typhimurium, Newport e Javiana (CDC, 2017a; Silva *et al.*, 2017).

A salmonelose é a segunda infecção gastrointestinal mais comumente relatada em humanos após a campilobacteriose, e uma importante causa de surtos de origem alimentar na UE. Em 2019, foram notificados 87.923 casos confirmados de salmonelose em humanos, com uma taxa de notificação de 20 casos por 100.000 habitantes. *Salmonella* causou 17,9 % de todos os surtos de origem alimentar em 2019. A grande maioria (72,4 %) dos surtos de salmonelose de origem alimentar foi causada por *S. Enteritidis*. Os quatro veículos alimentares mais implicados nos surtos de origem alimentar com forte evidência foram ovos e derivados, seguidos por produtos de panificação, carne de porco e seus derivados e alimentos mistos (EFSA e ECDC, 2021). Nos EUA, *Salmonella* foi a segunda causa mais comum após o norovírus, respondendo por 113 (29 %) surtos e 3.007 (34 %) doenças e 472 hospitalizações em 2017 (CDC, 2019). No Brasil, esse patógeno foi o terceiro mais frequente, sendo identificado em 11,2 % dos surtos notificados causados por alimentos entre 2012 e 2021 (Ministério da saúde, 2022b).

Apesar do uso de leite cru, a incidência reportada de *Salmonella* em QMA é baixa. Alguns estudos mostraram ausência de *Salmonella* spp. em QMA (Brant *et al.*, 2007; Pedrosa, 2010; Dores *et al.*, 2013; Amorim *et al.*, 2014; Oliveira, 2014; Andretta *et al.*, 2019; Campos, 2019),

enquanto outros evidenciaram a baixa frequência de *Salmonella* em queijos, variando de 0,4 % a 2,5 % (Martins *et al.*, 2014; Soares, 2014; Sales, 2015; Ferreira, 2020).

#### 4.3.2.4. *Listeria monocytogenes*

As espécies do gênero *Listeria* são compostas de bastonetes Gram positivos, não esporogênicos, anaeróbicos facultativos e requerem a presença de carboidrato para multiplicação. Podem multiplicar-se entre 4 °C e 50 °C, mas não sobrevivem à pasteurização clássica (60 °C / 30 minutos). Crescem na faixa de pH entre 6,0 e 9,0 e suportam a presença de 10 % de NaCl (algumas cepas suportam até 20 %) (Silva *et al.*, 2017; Ferreira, 2020).

*Listeria* spp. se encontra no ambiente, como no solo, água e em alguns animais, como aves e bovinos e pode estar presente no leite cru e nos alimentos elaborados com o mesmo. Essas bactérias também podem sobreviver nas plantas de processamentos de alimentos e contaminar uma grande variedade de alimentos processados. *Listeria* tem como característica diferencial a sua capacidade de crescer em temperaturas baixas, inclusive de refrigeração (Foodsafety, 2017).

A listeriose pode causar uma variedade de sintomas, dependendo da imunidade do paciente e a parte do corpo afetada. *Listeria* pode causar febre e diarreia, similares a outras doenças de origem alimentar, mas a infecção por *Listeria* é raramente diagnosticada devido ao longo período de incubação de uma a quatro semanas, podendo chegar a 70 dias, após a exposição ao microrganismo (CDC, 2017b). Mulheres grávidas são vinte vezes mais propensas a contrair a listeriose que outros adultos são. Nas grávidas, geralmente é uma enfermidade leve, parecida com uma gripe, mas pode causar aborto espontâneo, natimorto ou problemas de saúde na criança. Pessoas com sistema imunitário deficiente, como idosos, apresentando câncer e em seu tratamento, diabetes, HIV/SIDA e transplantados podem desenvolver infecções graves na corrente sanguínea (causando sepsis) ou no cérebro (causando meningite ou encefalite). As infecções por *Listeria* às vezes podem afetar outras partes do corpo, incluindo ossos, articulações e locais no peito e no abdômen (CDC, 2017b; Foodsafety, 2017).

Em 2019, 28 Estados-Membros da UE notificaram 2.621 casos humanos invasivos confirmados de listeriose, com uma taxa de notificação de 0,46 casos por 100.000 habitantes.

A tendência de casos confirmados de listeriose permaneceu estável no período de 2015 a 2019. As infecções por *Listeria* foram mais comumente relatadas na faixa etária acima de 64 anos e particularmente na faixa etária acima de 84 anos. A letalidade geral foi alta (17,6 %), o que torna a listeriose uma das doenças mais graves transmitidas por alimentos sob vigilância da UE (EFSA and ECDC, 2021). Nos EUA, dos 58 surtos de listeriose relatados durante 1998-2014, um total de 17 (30 %) foram associados ao queijo macio e resultaram em 180 doenças, 14 perdas fetais e 17 mortes (Jackson *et al.*, 2018).

No Brasil não há relatos de surtos envolvendo *Listeria* (Ministério da saúde, 2022b), apesar do microrganismo ser detectado em alimentos. O Programa de controle de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo foi instituído em 2009 pelo MAPA com o objetivo de detectar a presença desse patógeno em produtos que apresentam pH > 4,4 ou atividade de água (aw) > 0,92 ou concentração de cloreto de sódio < 10 % (MAPA, 2009). Entre os anos de 2014 a 2021, a frequência de detecção em alimentos de origem animal variou de 0,86 a 2,52 %, e para produtos lácteos variou de 0 a 1,65 %, conforme Tabela 13:

Tabela 13 - Resultado das análises para detecção de *L. monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para consumo, Serviço de Inspeção Federal, Brasil, no período de 2014 a 2021.

Ano	Amostra positiva/total analisada (%)			
	Produtos cárneos	Produtos de pesca	Produtos lácteos	TOTAL
2014	20/291 (6,87)	0/4 (0)	9/1.253 (0,72)	29/1.548 (1,87)
2015	10/153 (6,54)	0/16 (0)	11/665 (1,65)	21/834 (2,52)
2016	18/511 (3,52)	0/0 (0)	6/590 (1,02)	24/1.104 (2,17)
2017	1/166 (0,6)	0/0 (0)	2/184 (1,09)	3/350 (0,86)
2018	12/449 (2,67)	0/0 (0)	6/643 (0,93)	18/1.092 (1,65)
2019	5/213 (2,34)	0/12 (0)	5/810 (0,61)	10/1.035 (0,96)
2020	6/223 (2,96)	0/15 (0)	0/286 (0)	6/524 (1,15)
2021	19/401 (4,73)	0/31 (0)	0/342 (0)	19/774 (2,45)

Surtos de listeriose têm sido associados a alimentos prontos para consumo refrigerados, incluindo cachorros-quentes, frios, queijos macios, leite e outros produtos lácteos. Para queijos frescos, o risco de listeriose por porção é estimado em 50 a 160 vezes maior para queijos feitos com leite não pasteurizado do que com leite pasteurizado. A pasteurização mata *L. monocytogenes*; no entanto, produtos pasteurizados podem ser contaminados devido a práticas inadequadas de higiene após a pasteurização (Jackson *et al.*, 2018).

#### 4.4. Material e métodos

##### 4.4.1. Coleta de amostras e local de realização do experimento

O estudo avaliou 60 amostras de QMA obtidas no comércio de Belo Horizonte e região metropolitana coletadas nos meses de novembro e dezembro de 2022 e janeiro de 2023. Foram colhidas 34 amostras sem inspeção e 26 com inspeção, dentre essas últimas, 21 com registro no Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e 5 com Serviço de Inspeção Municipal (SIM). As amostras foram adquiridas de forma aleatória e distribuídas entre as regiões caracterizadas como produtoras de QMA ou cidades, conforme Tabela 14.

Para os queijos sem inspeção e sem rótulos, as informações sobre a origem foram obtidas durante a compra do produto. Além disso, ao se registrar as amostras, também foram identificadas aquelas comercializadas sem embalagens para posteriores análises comparativas.

Tabela 14. Distribuição das amostras de acordo com a região de origem e selo de inspeção.

REGIÃO	Com inspeção	Sem Inspeção
Canastra	8	7
Araxá	5	5
Serro	4	9
Serra do Salitre	1	7
Cerrado	3	6
Campo das Vertentes	1	0
CIDADE		
Aiuruoca	1	0
Entre Rios de Minas	1	0
Itanhandu	1	0
Virgínia	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>26</b>	<b>34</b>

As amostras foram coletadas nas suas embalagens originais, ou em embalagens fornecidas no comércio, e transportadas em caixa de material isotérmico (isopor) contendo gelo para o laboratório de Microbiologia em Alimentos do LFDA/MG. Essas foram mantidas no laboratório sob refrigeração até o momento das análises microbiológicas.

As amostras, após a retirada de material para pesquisas microbiológicas, foram congeladas e enviadas ao laboratório de Físico-Química do DTIPOA da Escola de Veterinária da UFMG para realização das análises físico-químicas. Dez amostras foram analisadas por semana, resultando num período de três meses de análises.

#### 4.4.2. Análises microbiológicas

Foram realizadas as seguintes análises microbiológicas nas amostras de QMA: detecção de *Campylobacter* spp., (qPCR pelo sistema BAX<sup>®</sup> Q7 e também pela metodologia tradicional ISO 10272-1:2017); detecção de *Salmonella* spp. (método de triagem pelo sistema de detecção molecular - MDS 3M e confirmação pela ISO 6579-1:2017); detecção de *L. monocytogenes* (método de triagem pelo MDS 3M e confirmação pela ISO 11290-1:2017); contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo (ISO 6888-1:1999), coliformes totais e *E. coli* (AOAC 991.14); contagem de bactérias ácido-láticas (ISO 7889:2003) e; detecção de toxinas estafilocócicas (Vidas Staph enterotoxin).

##### 4.4.2.1. *Campylobacter* spp.

As amostras de QMA foram pesadas em 10 g e hidratadas em 90 mL de caldo Preston (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) contendo suplemento seletivo Preston (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e sangue equino lisado e incubadas a 42 °C por 24 horas em jarras de anaerobiose e gerador atmosférico Microaerobac (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após incubação, foram inoculadas em ágar modificado carvão-cefoperazone-deoxicolato (mCCDA) (Neogen, Lansing, MI, EUA) contendo suplemento seletivo (Merck, Kenilworth, NJ, EUA), e as placas incubadas a 42 °C por 44 ± 4 horas em microaerofilia. As colônias típicas foram isoladas em ágar sangue [ágar base Columbia (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil) com sangue de equino lisado]. As placas foram incubadas a 42 °C por 24 a 48 horas em microaerofilia. As colônias foram confirmadas pelo teste de oxidase pela solução de N`N`N`N`-tetrametilparafenileno-diamina (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) e crescimento aeróbico a 25 °C em ágar sangue (Kasvi). Para a diferenciação das espécies, foram realizadas as análises de catalase, hidrólise de hipurato (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA) e hidrólise de acetato de indoxil (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) (ISO 10272-1: 2017).



Para o método BAX<sup>®</sup>, em paralelo, após a incubação do caldo Preston (Sigma-Aldrich), uma alíquota de 200 µL de cada amostra foi inoculada em tubos contendo 10 mL de caldo Bolton (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) sem suplemento e incubados a 42 °C por 18 horas em microaerofilia. Após esse período, uma alíquota de 5 µL foi inoculada em 200 µL da solução tampão adicionada de protease, disponível no BAX<sup>®</sup> *System PCR kit* para *Campylobacter* (Hygiena, Camarillo, CA, EUA) e, em seguida, colocados a 37 °C por 20 minutos e 95 °C por 10 minutos, para realizar a lise das células e extração do DNA. Após resfriados, 30 µL do material lisado foram adicionados nos tubos de PCR e processados no Sistema Real Time PCR do BAX<sup>®</sup>Q7. Esse *kit* detecta *Campylobacter* spp., e também diferencia as espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari*.

#### 4.4.2.2. *Staphylococcus* coagulase positivo

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e adicionadas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1 %, resultando na diluição  $10^{-1}$ . Alíquotas de 0,1 mL de diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram inoculadas com ajuda de alça de Drigalsky em ágar Baird-Parker (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) enriquecido com emulsão de gema de ovo (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) e telurito de potássio (Sigma-Aldrich, San Luis, MI, EUA).

As placas foram incubadas, sob aerobiose, a  $36 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  por  $48 \pm 4$  horas. A contagem foi feita separando-se colônias típicas de atípicas. Quando presentes, 3 a 5 cinco colônias típicas e 3 a 5 cinco colônias atípicas foram selecionadas por amostra e inoculadas em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) (Merck, Kenilworth, NJ, EUA). Após incubação a  $36 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  por 24 horas, 0,1 mL de cada cultura foi inoculado em 0,3 mL de plasma de coelho reconstituído (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil). Após incubação idêntica à etapa anterior, observou-se a formação de coágulos (ISO 6888-1:1999).

#### 4.4.2.3. Coliformes totais e *E. coli*

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e adicionadas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1 % e homogeneizadas, resultando na diluição  $10^{-1}$ . Alíquotas de 1 mL de diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  foram inoculadas em Petrifilm EC (3M, Saint Paul, MI, EUA) e incubadas sob aerobiose em estufa a 37 °C por 48 horas (AOAC 991.14).

#### 4.4.2.4. *Salmonella* spp.

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e adicionadas em 225 mL de água peptonada tamponada (Biokar, Beauvais, França), homogeneizadas e incubadas sob aerobiose a  $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Para o método de triagem MDS (3M, Saint Paul, MI, EUA), após incubação, uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi inoculada em tubos de solução de lise disponível no *kit 3M Salmonella 2* em temperatura ambiente. Os tubos foram aquecidos a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos, para realizar a lise das células e extração do DNA. Após resfriados, 20  $\mu\text{L}$  do material lisado foram adicionados nos tubos de reagente de ensaio (disponível no kit) e processados no equipamento MDS (3M, 2017).

Amostras positivas pelo MDS foram confirmadas pelo método tradicional. Foram transferidos, para enriquecimento seletivo, 1 mL e 0,1 mL das amostras para caldo Muller-Kauffmann tetracionato com novobiocina (MKTTn) (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e Rappaport Vassiliadis com soja (RVS) (Merck, Kenilworth, NJ, EUA), respectivamente. Os tubos contendo RVS foram incubados em banho-maria a  $41,5 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, e os tubos contendo MKTTn foram incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, ambos sob aerobiose. Após esse período, para isolamento em meios sólidos seletivos, com auxílio de uma alça, as amostras foram estriadas sobre ágar desoxicolato-lisina-xilose (XLD) (Biokar, Beauvais, França) e Rambach (Merck, Kenilworth, NJ, EUA). Então, as placas foram incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose. De cada placa, pelo menos uma colônia considerada típica foi inoculada para os testes bioquímicos: ágar ferro três açúcares (TM Media, Delhi, Índia), ágar uréia segundo Christensen (Himedia, Mumbai, Índia), caldo para descarboxilação da lisina (Himedia, Mumbai, Índia) e ágar nutriente (Himedia, Mumbai, Índia). Os meios foram incubados por 24 horas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob aerobiose. Amostras com leitura suspeita nas provas bioquímicas, a partir das colônias em ágar nutriente, foram submetidas ao teste de confirmação sorológica por meio do soro anti-*Salmonella* polivalente O (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e do soro anti-*Salmonella* polivalente H (SSI Diagnóstica, Hillerod, Dinamarca). As placas de XLD e Rambach foram armazenadas em refrigerador, para posterior isolamento de pelo menos quatro colônias suspeitas, caso as primeiras colônias isoladas não forem confirmadas como *Salmonella* spp. (ISO 6579-1: 2017).

#### 4.4.2.5. *Listeria monocytogenes*

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e adicionadas de 225 mL de caldo Demi-Fraser (BioMeurieux, Marcy-Létoile, França), homogeneizadas e incubadas a  $30 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose.

Para o método de triagem MDS (3M, Saint Paul, MI, EUA), uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi inoculada em tubos de solução de lise disponível no *kit 3M Listeria monocytogenes 2* em temperatura ambiente. Os tubos foram aquecidos a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  por 15 minutos, para realizar a lise das células e extração do DNA. Após resfriados, 20  $\mu\text{L}$  do material lisado foram adicionados nos tubos de reagente de ensaio (disponível no *kit*) e processados no equipamento MDS (3M, 2016).

Amostras positivas pelo MDS foram confirmadas pelo método tradicional. Foi transferido, para enriquecimento seletivo secundário, 0,1 mL das amostras para caldo Fraser (BioMeurieux, Marcy-Létoile, França), seguido de incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose. Após esse período, para isolamento em meios sólidos seletivos, as amostras foram estriadas em ágar *Listeria*, segundo Ottaviani e Agosti (ALOA) (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e Oxford modificado (Neogen, Lansing, MI, EUA), sendo incubadas a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose. De cada placa, pelo menos uma colônia considerada típica foi inoculada em ágar soja triptona com extrato de levedura (TM Media, Delhi, Índia) para reisolamento, seguida por incubação a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose. A partir dessa etapa, foram realizadas as provas bioquímicas da fermentação de xilose e ramnose pela inoculação em caldo púrpura de bromocresol (Fluka, St Louis, EUA) com adição de xilose (Dinâmica, São Paulo, SP, Brasil) ou de ramnose (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil), incubados a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 a 48 horas, sob aerobiose; além do teste de beta-hemólise, pela inoculação por picada em ágar sangue de carneiro (ágar base sangue n° 2 ; TM Media, Delhi, Índia) e incubação também a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas, sob aerobiose (ISO 11290-1:2017).

As cepas isoladas também foram testadas pelo sistema compacto VITEK (BioMeurieux, Marcy-Létoile, França), inoculadas em cartão VITEK 2 GP ID, para identificação de bactérias Gram-positivos (BioMeurieux, Marcy-Létoile, França), para confirmação da espécie de *Listeria*.

#### 4.4.2.6. Bactérias ácido-láticas

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e adicionadas em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizadas, resultando na diluição  $10^{-1}$ . Alíquotas de 1 mL de diluições seriadas de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  foram inoculadas em placas e adicionadas de ágar MRS (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil). Após homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, sob aerobiose (ISO 7889:2003).

#### 4.4.2.7. Toxinas estafilocócicas

Alíquotas de  $25 \pm 0,25$  g de QMA foram pesadas e congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$  para posterior análise. As amostras foram então descongeladas e adicionadas de 40 mL de água deionizada aquecida a  $38 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após agitação em *stomacher* por 3 minutos, a solução ficou em repouso por 30 minutos em temperatura ambiente. O pH foi ajustado para 3,5-4,0 com solução de HCl 5N (Cromoline Química Fina, Diadema, SP, Brasil) e centrifugada por 15 minutos a 4.000 g em temperatura de  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi recuperado e o seu pH ajustado para 7,5-8,0 com solução de NaOH 1N (Merck, Kenilworth, NJ, EUA) e foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi filtrado com tiras de gaze (BioMeurieux, 2018).

Alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  desse filtrado foram transferidas para o poço de amostra do barrete do teste qualitativo imunoenzimático Vidas Staph Enterotoxin (SET2, 30705, BioMeurieux, Marcy-Létoile, França), que permite a detecção de sete tipos sorológicos designados pelas siglas SEA, SEB, SEC<sub>1,2,3</sub>, SED e SEE. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica em Alimentos, do Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA.

#### 4.4.3. Análises físico-químicas

Para os parâmetros físico-químicos dos queijos foram realizadas as determinações dos teores percentuais de umidade e matéria gorda do extrato seco, de acordo com o especificado pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 1996), além de determinações de pH e teores percentuais de cloretos e gordura. As análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.4.3.1. Teores percentuais de extrato seco total e umidade

Os teores percentuais de extrato seco total foram determinados de acordo com a metodologia ISO 5534/IDF 4 (2004). Para tal finalidade, 20 g de areia lavada e peneirada foram adicionados a placas de Petri, previamente secas em estufa a  $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por no mínimo uma hora. Após esse período, as placas foram pesadas em balança analítica, tendo suas massas registradas. Em seguida, em cada uma das placas, foram pesados aproximadamente  $3,0 \pm 0,05$  g das respectivas amostras de QMA em duplicata. Em um primeiro momento, as placas contendo as amostras foram transferidas para estufa a  $102\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por três horas. Depois de retiradas da estufa, as placas foram acondicionadas em dessecador por 15 minutos para que esfriassem e, em seguida, foram pesadas. O procedimento de aquecimento foi repetido por uma hora, de forma consecutiva, até que a diferença de massa entre as pesagens não excedesse 0,001 g. Para a determinação da porcentagem de extrato seco total (EST), foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Extrato seco total (\%)} = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_4)}{m_1 - m_0} \times 100\%$$

Sendo que:

$m_0$  = massa da placa de Petri que contém a areia após a secagem;

$m_1$  = massa inicial da amostra somada à da placa de Petri antes da secagem;

$m_2$  = massa final da amostra somada à da placa de Petri após secagem;

$m_3$  = massa final da placa de Petri com areia utilizada no teste do branco;

$m_4$  = massa inicial da placa de Petri utilizada no teste do branco.

O teor de umidade foi obtido por cálculo:

$$\% \text{ Umidade (U)} = 100 - \% \text{ EST}$$

#### 4.4.3.2. Teor de cloretos

A determinação do teor de cloretos foi feita a partir do resíduo obtido na análise do resíduo mineral fixo. As cinzas foram adicionadas de 50 mL de água destilada morna e, na sequência, foram transferidas para *Erlenmeyer* de 125 mL, onde também foi adicionado 1 mL de solução de cromato de potássio a 5 %. Por fim, esse conteúdo foi titulado com solução de nitrato de prata 0,1 N, até coloração vermelho tijolo. A concentração de cloretos foi estimada a partir da aplicação da seguinte fórmula (Merck, 1993):

$$\text{NaCl (\%)} = \frac{V \times f \times N \times 0,0585}{m} \times 100$$

Sendo que:

$V$  = volume da solução de nitrato de prata 0,1 N gasto na titulação, em mL;

$f$  = fator de correção da solução de nitrato de prata 0,1 N;

$m$  = massa da amostra, em gramas;

$N$  = representa a normalidade da solução de nitrato de prata 0,1 N;

0,0585 = miliequivalente-grama do cloreto de sódio.

#### 4.4.3.3. Teor de gordura e gordura no extrato seco

Para a determinação do teor percentual de gordura, as amostras de queijo foram submetidas ao método butirométrico (ISO 3433/IDF 222, 2008). Em balança analítica foram pesados 3 g da amostra de QMA diretamente no copo coletor de butirômetros de Van Gulik. Após acoplar e vedar o copo ao butirômetro, também foram adicionados 5 mL de água morna, 10 mL da solução de ácido sulfúrico e 1 mL de álcool isoamílico. Na sequência, o conteúdo foi homogeneizado e o butirômetro foi transferido para banho-maria a 65 °C para auxiliar na dissolução da amostra. Após completa dissolução, foi feita a adição de água destilada no interior no butirômetro até que o volume alcançasse a última marcação da haste graduada. Feito isso, a borda do butirômetro foi enxugada com papel absorvente e ele foi centrifugado por dez minutos a 1.200 RPM em centrífuga de Gerber. A centrifugação permitiu a separação, por densidade, da fase gordurosa da amostra. A leitura do teor percentual de gordura foi feita diretamente na escala da haste graduada do butirômetro, medindo-se a extensão da coluna de gordura.

O teor de gordura no extrato seco (GES) foi obtido por cálculo:

$$\text{GES (\%)} = \frac{G}{EST} \times 100$$

Sendo que:

$G$  = teor de gordura

$EST$  = teor de extrato seco

#### 4.4.3.4. pH

O pH dos queijos foi determinado a partir da transferência de 10 g das amostras de QMA e 50 mL de água destilada isenta de gás carbono para um béquer. Em seguida, o conteúdo foi misturado com bastão de vidro até obtenção de uma pasta homogênea. Na sequência, o

eletrodo de pHmetro (Gehaka PG1800, São Paulo, Brasil) previamente calibrado foi submerso e mantido até estabilidade da resposta (Helrich, 1990).

#### 4.4.4. Análises estatísticas

Para a comparação da qualidade microbiológica, o experimento foi delineado em amostras casualizadas, independentes, para avaliação dos dois tipos de tratamentos (queijos produzidos com ou sem inspeção).

Para as variáveis mensuradas de natureza quantitativa que não atendem aos pressupostos para aplicação das técnicas paramétricas, os resultados foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Para a variável mensurada de natureza quantitativa, paramétrica, os resultados foram avaliados pelo teste t de *Student*.

Testes de correlação de Pearson (resultados paramétricos) e teste de correlação de Spearman (resultados não paramétricos) foram realizados entre os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas.

As análises estatísticas foram realizadas usando o software BioStat 5.3, considerando 95 % de confiança ( $p = 0,05$ ).

## 4.5. Resultados e discussão

### 4.5.1. Detecção de *Campylobacter* spp.

Das 60 amostras analisadas, a presença de *Campylobacter jejuni* foi detectada pelo método de triagem PCR em somente uma amostra de QMA sem registro no serviço de inspeção, mas não foi confirmada pelo método tradicional, sendo considerado como negativa.

A metodologia da qPCR é baseada na detecção e quantificação do sinal fluorescente, que aumenta em proporção direta com a quantidade do produto amplificado na reação de PCR. O ciclo de amplificação onde o sinal cruza o threshold é chamado de *cycle threshold* ou Ct. Valores de Ct elevados são considerados “tardios”, podendo ou não ser verdadeiros (Salgado *et al.*, 2013). No caso da amostra positiva, foi observado no gráfico do PCR um valor de Ct

(*threshold cycle*) muito elevado (39,6), com um valor calculado de quantificação de  $< 1,0 \times 10^4$ , mesmo após a etapa de pré-enriquecimento, quando ocorre a multiplicação desse microrganismo, sugerindo um resultado não verdadeiro, que foi confirmado pela não detecção pelo método de cultivo (Figuras 6 e 7).

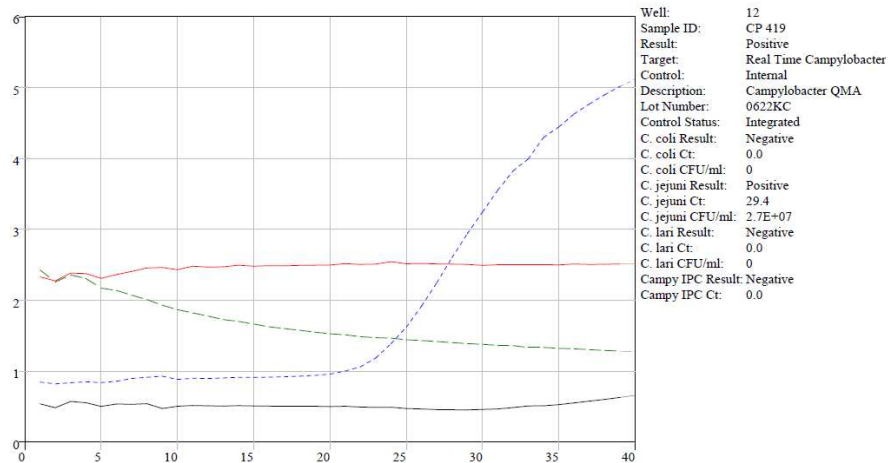


Figura 6. Gráfico de um resultado positivo para *Campylobacter jejuni* (linha azul), mostrando um Ct 29,4, com uma curva exponencial de detecção do template

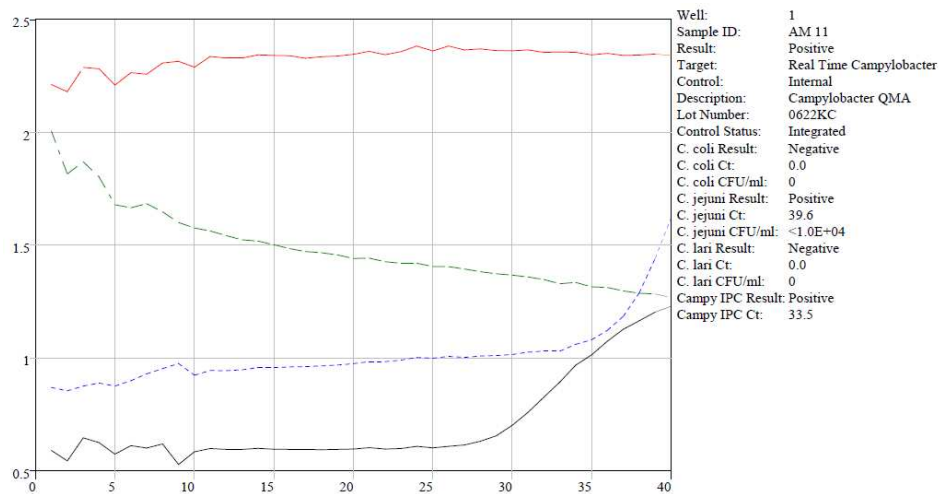


Figura 7. Gráfico do resultado da amostra, mostrando um Ct tardio, de 39,6 para *Campylobacter jejuni* (linha azul) e uma curva pequena.

Existem poucos estudos sobre a prevalência de *Campylobacter* em queijos no Brasil. Um estudo realizado após padronização de um método PCR multiplex com 81 amostras de QMA identificou 30 amostras (35,8 %) como positivas para o gênero, quando apenas o primer do gene *16S rRNA* foi usado. Na confirmação, usando o protocolo de PCR multiplex, nenhuma amostra foi confirmada, considerando os resultados como não conclusivos (Gonçalves, 2018).



Estudos relacionados com queijos frescos detectaram ausência de *Campylobacter* em 60 amostras de queijos Minas frescais com e sem fiscalização (Salotti *et al.*, 2006) e em 38 queijos frescais preparados com leite cru em São Paulo pelo teste bacteriológico (Kobayashi *et al.*, 2017). Nesse mesmo estudo, *Campylobacter* foi detectado em 47,37% das amostras pelo teste de PCR. Vale destacar que não houve a etapa de pré-enriquecimento. As amostras foram concentradas pela centrifugação. Nesse caso, essa diferença nos resultados pode ter sido tanto pela deficiência do método de cultivo, quanto pela detecção de células mortas e, ou de células viáveis e não cultiváveis pelo teste de PCR.

Acredita-se que *Campylobacter* spp. não pode sobreviver à tecnologia de fabricação de queijos maturados adicionados de fermento láctico. Em estudo para a verificar a viabilidade de *C. jejuni* inoculados no leite para a produção de queijos frescos, observou-se que o microrganismo não permaneceu viável após o quarto dia de produção. Os teores de umidade, pH e acidez foram correlacionados com a sobrevivência das cepas ( $p < 0,05$ ). Assim, tanto a diminuição da umidade e do pH quanto o aumento da acidez dos queijos foram correlacionados com a diminuição da viabilidade de *C. jejuni* (Monteiro *et al.*, 2020).

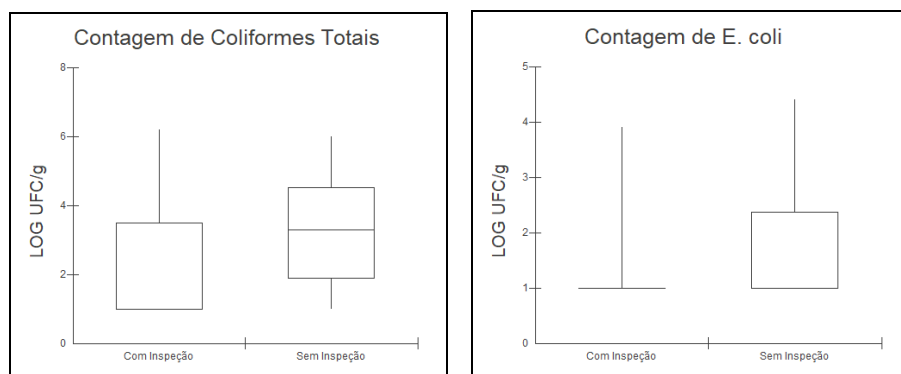
Os dados relacionados a surtos envolvendo queijos no relatório da UE não diferenciam se o queijo é fresco ou maturado (EFSA, 2021). Dados retirados do *National Outbreak Reporting System* (NORS), dos EUA, indicam que no período de 2009 a 2020, dos dez surtos relacionados a queijos, três foram associados à coalhada de queijo, um ao queijo tipo *cottage*, dois a queijos frescos e quatro a queijos inespecíficos, preparados com leite não pasteurizado (NORS, 2023), ou seja, a maioria de queijos frescos e com alto teor de umidade.

#### 4.5.2. Qualidade microbiológica dos queijos segundo os parâmetros oficiais

##### 4.5.2.1. Contagens de coliformes totais e *Escherichia coli*

Das 60 amostras de QMA analisadas, 33 % e 70 % obtiveram resultados de contagens  $< 10$  UFC/g para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. As demais amostras apresentaram contagens entre  $2,0 \times 10^1$  e  $1,0 \times 10^6$  UFC/g para coliformes totais e entre  $5,0 \times 10^1$  e  $2,4 \times 10^4$  UFC/g para *E. coli*, conforme indicado no gráfico de boxplot indicado na Figura 8.

Figura 8. Intervalo da contagem de Coliformes totais e *E. coli* em Log<sub>10</sub> UFC/g, comparando amostras de QMA com e sem inspeção, coletadas no comércio varejista da região Metropolitana de Minas Gerais



Para que fosse possível a plotagem dos dados, com ausência de colônias nas placas (abaixo do limite de detecção do método), foi adotado o log 1.

A contagem de coliformes totais foi a única análise microbiológica em que se observou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre amostras de QMA com e sem inspeção, sendo que os QMA com inspeção apresentaram valores significativamente menores daqueles sem inspeção. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de *E. coli* em queijos produzidos em queijarias com inspeção e sem inspeção. O fato de somente contagem de coliformes totais apresentar diferença significativa pode ser explicada pelo menor índice de valores  $< 10$  encontrados, ou seja, 67 % das amostras obtiveram resultado com contagens.

Um total de 23 % das amostras com inspeção e 41 % das amostras sem inspeção estavam fora do limite aceitável de  $5,0 \times 10^3$  UFC/g (MAPA, 1996) para contagem de coliformes totais. Para contagem de *E. coli*, 23 % e 32 % das amostras de QMA com e sem inspeção, respectivamente, estiveram em desacordo a legislação brasileira, que estabelece limite máximo aceitável de  $10^3$  UFC/g para *E. coli* em queijos com umidade abaixo de 46 % (Ministério da saúde, 2022a).

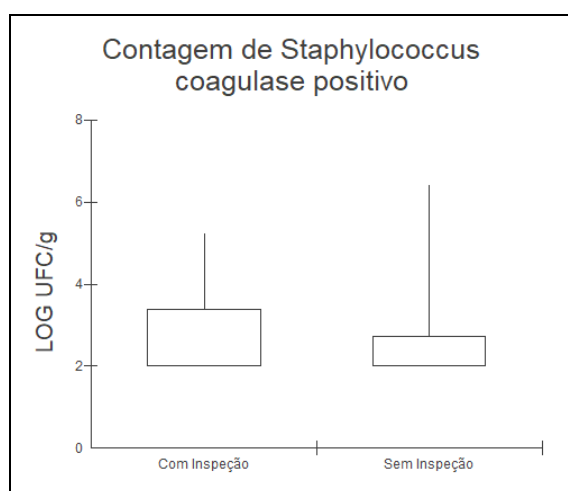
A presença de coliformes e *E. coli* em QMA com amostras em desacordo com a legislação é comum nos estudos de caracterização. Brant *et al.* (2007), Pinto *et al.* (2016), Campos (2019) e Ferreira (2020) observaram 80 %, 100 %, 19 % e 24 %, respectivamente, de amostras em desacordo com a legislação para a contagem de coliformes totais. Enquanto Pinto *et al.* (2016), Campos (2019) e Ferreira (2020) encontraram *E. coli* acima do permitido pela legislação vigente à época dos estudos em 94,14 %, 18 % e 10 %, respectivamente.

Esses resultados podem ser explicados pela forma artesanal de fabricação dos queijos, por queijeiros com baixa instrução tecnológica, pela pouca qualidade do leite cru utilizado em sua fabricação, decorrente de falhas de higiene durante a ordenha, conservação inadequada após a ordenha ou ocorrência de mastite no rebanho. Por outro lado, não é possível descartar a possibilidade dos queijos terem sido contaminados no varejo, por deficiências de higiene (Ferreira, 2020), principalmente no caso daqueles produtos comercializados sem embalagem.

#### 4.5.2.2. Contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo e detecção de toxinas estafilocócicas

Estafilococos coagulase positivo não foram detectados em 61,67 % das 60 amostras analisadas, com contagens  $< 10^2$  UFC/g. As demais amostras apresentaram contagens entre  $1,0 \times 10^2$  e  $2,4 \times 10^6$  UFC/g, conforme mostra o gráfico de boxplot da Figura 9.

Figura 9. Intervalo da contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo em  $\text{Log}_{10}$  UFC/g, comparando amostras de QMA com e sem inspeção, coletadas no comércio varejista da região Metropolitana de Minas Gerais



Para que fosse possível a plotagem dos dados, com ausência de colônias nas placas (abaixo do limite de detecção do método), foi adotado o  $\log 2$ .

A presença desse microrganismo em QMA é comum, conforme observado em outros estudos (Ornelas *et al.*, 2012; Dores *et al.*, 2013; Soares, 2014; Andretta *et al.*, 2019; Campos, 2019; Ferreira, 2020). Na literatura são encontrados relatos que mesmo em períodos mais avançados de maturação, e em condições adversas, *S. aureus* pode estar presente em queijos (Soares, 2014). Dores *et al.* (2013) identificaram *S. aureus* como a espécie limitante para a definição do tempo mínimo de maturação, pois foi o microrganismo que sobreviveu por mais tempo durante a maturação de QMA da Canastra.

Em relação à legislação brasileira, que estabelece limite máximo aceitável de  $10^2$  UFC/g para estafilococos coagulase positivo em queijos com umidade abaixo de 46 % (Ministério da saúde, 2022a), 34,6 % e 20,6 % das amostras com e sem inspeção, respectivamente, estiveram em desacordo. Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as contagens da bactéria em queijos produzidos em queijarias com inspeção e sem inspeção. Como *S. aureus* pode contaminar os alimentos pela manipulação, também foi feita a comparação entre os queijos comercializados embalados e sem embalagens, mas também não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ).

Valente (2022) durante estudo de caracterização do QMA da região de Campo das Vertentes, mostrou que *Staphylococcus* spp. foi um dos microrganismos mais predominantes nas prateleiras de todas queijarias estudadas. Nessas circunstâncias, a bancada de produção pode exercer um efeito inoculante desses microrganismos nos queijos ou contaminar o soro durante a coleta do soro-fermento.

Apesar da presença de estafilococos nos queijos, enterotoxinas estafilocócicas (SE) não foram detectadas. Martins *et al.* (2014) também não detectaram enterotoxinas em 256 amostras analisadas durante monitoramento do tempo de maturação de QMA da região do Serro, mesmo com as contagens iniciais de *S. aureus* nos queijos encontradas acima do estabelecido pela legislação atual. O autor sugere que este resultado indica a possível presença no queijo de algum mecanismo inibidor da expressão de genes relacionados à produção de toxinas.

Também não foram detectadas SE em 53 amostras de QMA da região do Serro, mesmo com 75,5 % das amostras com valores acima do limite aceitável da legislação vigente de estafilococos coagulase positivo. Nesse mesmo estudo, 116 isolados confirmados como *S. aureus* foram testados para a produção de enterotoxinas por Elisa e PCR e nenhum apresentou a produção de SE e o gene para a produção das toxinas de A a E (Andretta *et al.*, 2019).

A presença de nenhum tipo de SE não foi detectada em 42 queijos, apesar da alta contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo nas amostras de QMA de Araxá. Sugere-se que as linhagens de *Staphylococcus* presentes nos queijos não eram produtoras de enterotoxinas ou não estavam expressando o seu gene para produção. Diante disso, há indícios de que exista no meio ambiente dos queijos algum mecanismo inibidor de produção de toxinas. Este fato remete à necessidade de mais estudos acerca do tema, abordando, inclusive, a influência da

maturação e época de fabricação dos queijos sobre toxinas pré-formadas, a possível relação com as bactérias ácido lácticas, a presença do gene para produção nos microrganismos e o seu potencial para manifestação (Sales, 2015).

Duquenne *et al.* (2016) investigaram a influência da produção de um queijo semi-duro para a multiplicação de *S. aureus* e produção de enterotoxinas. Foi observado que o pH alcançado após as primeiras horas de fabricação determina a evolução de uma população contaminante de *S. aureus*. A cinética de acidificação foi mais lenta com cepa *starter* única de *Lactococcus lactis* (pH 6h > 6,3) em comparação com cepas *starters* industriais (*L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lb. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) ( $5,4 < \text{pH}_{6\text{h}} < 6,1$ ), permitindo que *S. aureus* crescesse por mais tempo, com uma densidade celular máxima ( $10^7$  UFC/g de queijo) observada 12 h após a coagulação do leite, enquanto que na com *starters* industriais, *S. aureus* atingiu sua densidade celular máxima (cerca de  $10^6$  UFC/g de queijo) em menos de 6 h após a coagulação do leite. As concentrações máximas de SED foram encontradas 4 horas após a moldagem do queijo e diminuíram no primeiro dia de fabricação, sendo sugerido que as SED, proteínas solúveis, foram eliminadas no soro durante o processo de fabricação. Sendo assim, foi concluído que a primeira etapa do processo é o ponto crítico para limitar o risco de intoxicação alimentar estafilocócica, principalmente temperatura e tempo de coagulação do leite, sugerindo, nas condições do estudo, temperatura abaixo de 35 °C em 30 minutos.

#### 4.5.2.3. Detecção de *Salmonella* spp.

Das 60 amostras analisadas, a presença de *Salmonella* spp. foi detectada pelo método de triagem MDS em somente uma amostra sem registro no serviço de inspeção, mas não foi confirmada pela metodologia ISO 6579-1:2017, apesar de várias tentativas, sendo assim, considerada como não detectada.

Estudos mostraram ausência de *Salmonella* spp. em QMA, como, por exemplo, 161 amostras de QMA comercializados em feira livre de São Paulo (Pedrosa, 2010), 40 amostras de QMA do Serro (Brant *et al.*, 2007), 21 amostras de diferentes tipos de queijos, dentre os quais, o queijo Minas artesanal (Amorim *et al.*, 2014), 35 amostras de QMA do Campo das Vertentes

(Oliveira, 2014), 96 amostras (Dores *et al.*, 2013) e 78 amostras (Campos, 2019) de QMA da Serra da Canastra e 53 amostras do Serro (Andretta *et al.*, 2019).

Outros estudos evidenciaram a baixa frequência de *Salmonella* em queijos, variando de 0,4 % a 2,5%. Ferreira (2020) detectou *Salmonella* pelo método ISO 6579-1 (2017) em somente uma amostra de QMA de 100 amostras coletadas no comércio de São Paulo, mas com um total de oito amostras positivas pelo método de PCR. Outros estudos detectaram a bactéria em uma amostra de QMA produzido em Uberlândia, MG, entre 40 analisadas (Soares, 2014); uma amostra positiva entre 84 queijos analisados durante o estudo com amostras de QMA da região de Araxá (Sales, 2015) e uma amostra positiva entre 256 queijos analisados durante o estudo com amostras de QMA da região do Serro (Martins *et al.*, 2014).

A baixa frequência de isolamento ou mesmo de ausência de *Samonella* spp. nos queijos artesanais pode ser atribuída a vários fatores, tais como a presença de uma microbiota muito diversificada, como bactérias lácticas, produtoras de ácidos orgânicos ao longo do processo de maturação, tornando o ambiente adverso à sobrevivência de *Salmonella* spp. (Dores *et al.*, 2013, Oliveira, 2014).

#### 4.5.2.4. Detecção de *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* foi encontrado em duas amostras pelo método de triagem MDS, mas em uma amostra o microrganismo não foi detectado na confirmação pela metodologia tradicional e, na outra, foi confirmada somente a presença de *Listeria innocua* pelo método ISO 11290-1:2017, sendo assim, o resultado final das duas amostras foi considerado como não detectado para *L. monocytogenes*.

*L. innocua* é mais comumente encontrada em alimentos prontos para consumo do que *L. monocytogenes*. Desafios associados à detecção e confirmação de *Listeria*, incluindo cepas atípicas ou *L. monocytogenes* presentes em baixas concentrações devido a presença de *L. innocua*, cepas competidoras, durante o enriquecimento ou que mascaram a detecção de *L. monocytogenes* em placas de ágar seletivos, como meio ALOA já foram estudados (Keys *et al.*, 2013; Kaszoni-Rückerl *et al.*, 2020).

Keys *et al.* (2013) observaram que espécies não patogênicas de *Listeria*, especialmente *L. innocua*, possuem uma taxa de multiplicação superior a *L. monocytogenes* durante a etapa de enriquecimento em meios seletivos e/ou diferenciais, resultando em sua recuperação preferencial. Também foi verificado um aumento na dificuldade de se isolar *L. monocytogenes* pelo método de cultivo na presença de *L. innocua*. *L. monocytogenes* não foi detectada em 18 das 30 culturas de enriquecimento. Este achado sugere que embora ambas as espécies de *Listeria* estivessem presentes na placa, o diferencial populacional entre elas restringiu *L. monocytogenes* a áreas da placa com crescimento confluyente e que colônias individuais isoladas eram apenas *L. innocua*.

Por esses motivos, o uso de *L. innocua* como indicador para a presença de *L. monocytogenes*, apesar de não detectada, foi sugerido por diferentes autores (Keys *et al.*, 2013; Kaszoni-Rückerl *et al.*, 2020).

Vários outros estudos relataram a ausência de *L. monocytogenes* em QMA, tais como: Brant *et al.* (2007), Martins *et al.* (2014) e Andretta *et al.* (2019), que analisaram 40, 256 e 53 amostras de QMA da região do Serro, respectivamente; Soares (2014) em 40 amostras de QMA produzidos em Uberlândia, Amorim *et al.* (2014) em 21 amostras de diferentes tipos de queijos, dentre os quais QMA, e Dores *et al.* (2013) em 96 amostras de QMA da Canastra. Estudos que detectaram esse patógeno em QMA observaram uma baixa frequência, de 1,3 % a 3 % (Sales, 2015; Campos, 2019; Ferreira, 2020).

A baixa detecção desses patógenos pode ser atribuída à alta contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) presentes no queijo, que competem e inibem o patógeno (Oliveira, 2014). Estudos isolando BAL de queijos Minas artesanais encontraram cepas com forte atividade anti *Listeria* (Cavicchioli *et al.*, 2017; Margalho *et al.*, 2020).

As BAL são capazes de produzir diversos metabólitos, como o ácido láctico, o diacetil e o peróxido de hidrogênio. O principal ácido orgânico produzido é o ácido láctico, que diminui o pH do meio. O diacetil é produzido a partir da fermentação do citrato e age bloqueando o sítio de ligação da enzima responsável pela utilização da arginina, inibindo a síntese de proteínas essenciais. É considerado um antimicrobiano de amplo espectro. O peróxido de hidrogênio, produzido na presença de oxigênio, atua como oxidante, desnaturando enzimas de membrana das bactérias, aumentando assim sua permeabilidade (Antonio e Borelli, 2020).

Além dessas substâncias, as bacteriocinas também são produzidas e apresentam efeitos tóxicos contra bactérias patogênicas. Bacteriocinas são polipeptídeos de baixo peso molecular ou proteínas. A maioria dessas substâncias atua na membrana citoplasmática dos microrganismos levando à formação de poros. Também podem inibir por meio da degradação do DNA da célula ou inibição da síntese de peptidoglicanos. Elas atuam preferencialmente em bactérias Gram positivo, como *Listeria* spp. (Antonio e Borelli, 2020; Cavicchioli *et al.*, 2017).

#### 4.5.2.5. Contagem de bactérias lácticas

As bactérias acido-láticas (BAL) foram os microrganismos predominantes em todos os QMA analisados. Resultados similares foram encontrados em diversos estudos em QMA (Oliveira, 2014; Resende *et al.*, 2011; Ferraz, 2016). As BAL são o principal grupo responsável pela maturação do queijo Minas artesanal. Elas atuam no desenvolvimento de aroma e sabor característicos deste produto e possuem importante papel na inibição da microbiota contaminante e patogêna (Resende *et al.*, 2011).

Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de BAL em queijos produzidos em queijarias com inspeção e sem inspeção, com uma variação de  $2,4 \times 10^5$  a  $4,3 \times 10^8$  UFC/g. Estudos mostram contagens de BAL entre 7 e 8 log UFC/g em QMA (Resende *et al.*, 2011; Ferraz, 2016). No presente estudo houve uma maior variação na contagem.

Ferraz (2016) observou uma redução na contagem de BAL entre os tempos um e oito dias de maturação de menos de um ciclo logarítmico e uma concentração final de  $10^8$  UFC/g. A partir deste período, não houve diferença até 28 dias de maturação, o que demonstra alta atividade e viabilidade deste grupo microbiano durante a maturação do QMA.

#### 4.5.2.6. Qualidade geral dos queijos

De acordo com os dados obtidos, 47 % dos QMA atenderam a todos os requisitos microbiológicos exigidos pela legislação. Um total de 53 % não atendeu a pelo menos um dos requisitos da legislação referente aos parâmetros microbiológicos analisados, ou seja,



contagens de coliformes totais (33 %), *E. coli* (28 %) e/ou *Staphylococcus* coagulase positivo (27 %), conforme mostrado na Tabela 15.

Tabela 15. Número e percentual de amostras de QMA, coletadas no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG), que atenderam ou não a legislação vigente.

	Atenderam (%)	Não atenderam (%)
Geral	28 (47)	32 (53)
Tipo de inspeção		
Com inspeção	13 (50)	13 (50)
Sem inspeção	15 (44)	19 (56)
Parâmetro		
Coliformes totais	40 (67)	20 (33)
<i>Escherichia coli</i>	43 (72)	17 (28)
<i>Staphylococcus</i> coagulase positivo	44 (73)	16 (27)
Enterotoxinas estafilocócicas	60 (100)	
<i>Salmonella</i> spp.	60 (100)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	60 (100)	

Legislação vigente: Portaria MAPA ° 146, de 7 de março de 1996 e Instrução Normativa ANVISA n°161, de 1 de julho de 2022.

Um estudo de QMA provenientes da Serra da Canastra indicou resultados semelhantes, onde de 78 amostras analisadas, somente 38 % atenderam a todos os requisitos microbiológicos exigidos pela legislação. Um total de 62% não atendeu a pelo menos um requisito da legislação, ou seja, contagens de coliformes totais (19%), *E. coli* (18%), *Staphylococcus* coagulase positivo (42 %) e/ou ausência de *L. monocytogenes* (1%) (Campos, 2019). Já em estudo de QMA da região de Montes Claros, 100 % das amostras analisadas não atenderam a legislação (Pinto *et al.*, 2016).

Sales (2015) constatou que a qualidade microbiológica do QMA foi influenciada pelas condições da água, soro-fermento, leite e das boas práticas de fabricação aplicadas nas unidades de produção. Durante o trabalho, o QMA apresentou contaminações de diversos microrganismos, o que remete ao risco que esse produto representa para a população quando é elaborado de maneira inadequada ou é comercializado sem ser submetido à maturação.

Entre os produtores com inspeção, somente 50 % atenderam a todos os parâmetros, o que indica que mesmo com as exigências de inspeção, a porcentagem de produtores que não atendem aos requisitos da legislação ainda é alta. Esse número elevado de amostras em desacordo com a legislação pode refletir condições higiênicas inadequadas, implantação e

implementação incompletas de boas práticas tanto no campo quanto na produção de queijos, necessidade de conscientização, ou a falta de apoio de órgão regulador, no que diz respeito a auditorias nessas queijarias, bem como cursos para mostrar a importância da gestão da qualidade na produção desse tipo de alimento (Campos, 2019).

Por outro lado, durante a discussão, pode-se observar que estudos mais atuais apresentam melhores resultados para a qualidade microbiana dos QMA, mostrando que há uma evolução na sua qualidade. O Estado, através de empresas como EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural), vinculada à Secretaria de Estado de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Estado de Minas Gerais, EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), vinculada ao MAPA, deve oferecer permanentemente projetos de apoio e capacitação para a conscientização dos produtores quanto às boas práticas de produção e fabricação para que essa melhora seja contínua.

#### 4.5.3. *Qualidade Físico-química*

Apesar de se observar diferença significativa somente para contagem de coliformes totais nos parâmetros microbiológicos para os QMA com e sem inspeção, no caso dos parâmetros físico-químicos, a maioria apresentou diferença significativa entre as médias. O resultado de teor de umidade está diretamente relacionado com o tempo de maturação do queijo, que foi mais adequado nos queijos produzidos sob inspeção. Esse resultado influencia os teores de extrato seco total e gordura.

##### 4.5.3.1. pH

Na Tabela 16 são apresentados os valores médios e os coeficientes de variação da determinação de pH dos QMA com e sem inspeção. Os valores de pH foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois tratamentos (com e sem inspeção).

Estudos da maturação de QMA mostram que o pH dos queijos não foi significativamente influenciado pelo período de maturação ou época do ano (Oliveira, 2014; Valente, 2022). Ainda que ocorra acidificação inicial da matriz do queijo pela ação de bactérias ácido-láticas, ao longo da maturação ocorre degradação de proteínas pela presença de proteases naturais do

leite e das próprias BAL. Esses fenômenos são observados em produtos feitos a partir de leite cru com altas contagens de células somáticas, BAL e bolores e leveduras (Oliveira, 2014).

Tabela 16. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do pH dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	5,63 ± 0,42 <sup>a</sup>	4,83	6,53	7,41
Sem Inspeção	5,41 ± 0,38 <sup>b</sup>	5,03	7,30	6,87

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de Student ( $p < 0,05$ )

Campos (2019) observou que não houve diferença significativa de pH e atividade de água entre as amostras que atenderam e não atenderam a legislação, podendo concluir, no caso de QMA da Canastra, que o pH não é um parâmetro controlador de crescimento de indicadores ou pela presença/ausência de patógenos exigidos pela legislação. O mesmo resultado foi encontrado no presente estudo, conforme mostrado na Tabela 17, onde não há diferença significativa entre os valores médios de pH, quando as amostras foram separadas considerando o atendimento ou não da legislação para critérios microbiológicos.

Tabela 17. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do pH dos QMA, separados por amostras que atenderam ou não a legislação para critérios microbiológicos

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Atendeu	5,48 ± 0,38 <sup>a</sup>	4,86	6,53	6,89
Não atendeu	5,53 ± 0,45 <sup>a</sup>	4,83	7,30	8,08

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de Student ( $p < 0,05$ )

#### 4.5.3.2. Teor de umidade

Para os QMA, o estado de Minas Gerais estabeleceu os parâmetros e padrões físico-químicos e microbiológicos pela Portaria 2.033 de janeiro de 2021, com teor de umidade máxima de 45,9 g/100 g. Dentre as amostras analisadas, 85 % estavam com valores de umidade abaixo de 45,9 g/100 g nos queijos com inspeção, enquanto que para os queijos sem inspeção, somente 30 % apresentaram valores adequados, observando-se uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois tratamentos, conforme demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18. Estimativa da média e desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de umidade (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	39,37 ± 6,53 <sup>a</sup>	29,64	50,66	16,26
Sem Inspeção	48,59 ± 7,18 <sup>b</sup>	33,11	60,77	14,56

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

Estudos sobre a influência do período de maturação sobre as características físico-químicas de QMA foram realizados de acordo com a região, para a identificação do tempo mínimo de maturação. Oliveira *et al.* (2018) encontraram teor de umidade médio de 41,14 % e 40,34 % para QMA da região do Serro com 17 dias de maturação. Já Ferraz (2016) encontrou valores médios de 44,3 % e 40,1 % de umidade com oito e 14 dias de maturação, respectivamente em QMA da Serra da Canastra. Soares (2014) detectou 35,9% de umidade após dez dias de maturação em queijos da região de Uberlândia.

A variação da concentração de umidade está ligada ao tempo de maturação, ao processo de produção, à quantidade e ao tipo de salga, bem como à pressão exercida no momento da prensagem. A redução da umidade pode estar ainda diretamente relacionada à época de produção do queijo (Oliveira *et al.*, 2018). Sales (2015) observou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) do teor de umidade em QMA de Araxá durante o período de maturação, prevalecendo menores valores de umidade na época seca, quando comparado com a época da chuva. Nessa época, a umidade relativa do ar foi menor e a temperatura e a velocidade do vento maior, proporcionando que os queijos perdessem maior quantidade de água.

Já Valente (2022) não encontrou diferença significativa entre as épocas de chuva e seca nos QMA do Campo das Vertentes. Nesse caso, sugere-se que os produtores adotam estratégias, para minimizar essa ocorrência durante o período seco. Costa Júnior *et al.* (2014) observaram que produtores de QMA do Campo das Vertentes durante o período seco cortam a massa dos queijos em grãos com maiores dimensões para evitar a perda de umidade. Além disso, durante a enformagem é aplicada uma menor pressão manual na massa para minimizar a drenagem do soro. Alguns produtores podem ainda lavar os queijos mais precocemente no período da seca para prevenir o ressecamento excessivo.

O resultado de teor de umidade no presente estudo indica uma maturação mais adequada daqueles queijos com inspeção, mas que não foi suficiente para atingir a qualidade microbiológica em 50 % dos mesmos. Essa observação coincide com o resultado da análise de que não há diferença significativa entre os valores médios de teor de umidade, quando as amostras são agrupadas entre as que atenderam e não atenderam a legislação para o critério microbiológico, conforme mostrado na tabela 19.

Tabela 19. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de umidade dos queijos, separados por amostras que atenderam ou não a legislação para critérios microbiológicos

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Atendeu	43,28 ± 8,32 <sup>a</sup>	29,64	56,32	19,22
Não atendeu	45,75 ± 8,15 <sup>a</sup>	29,99	60,77	17,82

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

Soares (2014) observou que a redução da umidade em porcentagens  $\leq 45,9$  % influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) na diminuição das contagens de *E. coli* e coliformes totais, mas não foi suficiente para atingir o padrão preconizado pela legislação à época.

#### 4.5.3.3. Teor percentual de extrato seco total

A perda de umidade dos queijos ao longo da maturação leva à concentração dos componentes sólidos dos queijos. Os sólidos totais, compostos principalmente pela gordura, proteínas e minerais, representam a contraparte do teor de umidade. Em outras palavras, a soma das frações de umidade e sólidos totais equivalem a 100 % da matéria dos queijos. Dessa forma, a oscilação que ocorre no teor de umidade influencia inversamente o teor de sólidos: enquanto o teor de umidade diminui ao longo da maturação, observa-se um aumento do teor de sólidos totais dos queijos (Valente, 2022).

Os valores dos teores percentuais de extrato seco total (EST) foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois tratamentos (com e sem inspeção), como mostrado na Tabela 20.

Tabela 20. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de EST (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	60,62 ± 6,53 <sup>a</sup>	49,34	70,35	10,56
Sem Inspeção	51,41 ± 7,18 <sup>b</sup>	39,23	66,89	13,76

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

O extrato seco total é o resultado de uma série de fatores, entre eles, da evaporação da água, da mexedura e quebra da massa e da pressão exercida na prensagem do queijo (Sales, 2015).

#### 4.5.3.4. Gordura

Os valores dos teores percentuais de gordura foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre os dois tratamentos (com e sem inspeção), como mostrado na Tabela 21.

Tabela 21. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de gordura (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	36,00 ± 7,15 <sup>a</sup>	19	47	19,48
Sem Inspeção	29,47 ± 4,01 <sup>b</sup>	24,25	38,75	13,42

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

O teor de gordura variou entre 19 % a 47 % para produtos com inspeção e de 24,25 % a 38,75 % para QMA sem inspeção. Oliveira *et al.* (2018) encontraram resultados semelhantes, com percentuais de gordura variando de 20,50 % a 30,67 % para queijos fabricados com pingo e de 21,42 % a 30,25 % para queijos fabricados com “rala”.

O leite utilizado na fabricação de QMA não sofre nenhum tipo de padronização quanto ao teor de gordura. E essa variação nos percentuais de gordura pode ser explicada pelo fato da gordura no leite ser o componente mais variável, tendo em vista que é influenciada por diversos fatores: genéticos, ambientais, de manejo e de nutrição animal, estágio de lactação, implicando assim em variações no teor de lipídios do queijo. O período de maturação dos queijos é outro fator que influencia decisivamente no teor de gordura do produto, uma vez que

no decorrer da maturação a perda de água leva conseqüentemente, ao aumento na proporção dos constituintes sólidos, entre eles a gordura (Ferraz, 2016; Oliveira *et al.*, 2018).

Durante a maturação ocorre a lipólise do queijo Minas artesanal, que contribui para diminuir o percentual de gordura no queijo. No entanto, essa diminuição é pequena, pois à medida que se diminui o percentual de umidade do queijo, o extrato seco total aumenta e conseqüentemente eleva a concentração de gordura, um dos principais constituintes do queijo (Sales, 2015).

A classificação dos queijos quanto ao teor de gordura é realizada tendo em vista a legislação federal, baseando-se na porcentagem de gordura no extrato seco (MAPA, 1996). Os valores dos teores percentuais de gordura no extrato seco não foram significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) entre os dois tratamentos (com e sem inspeção), como mostrado na Tabela 22.

Os valores oscilaram entre 37,11 a 77,72 %, com média de cerca de 58 %. Os valores médios observados classificam os QMA como gordos (entre 45 e 59,9%), e extra gordo (acima de 60%). Resultados semelhantes foram encontrados por Sales (2015), com valores médios observados nas duas épocas de produção classificando os queijos de Araxá como gordos (entre 45 e 59,9%), com exceção do queijo recém-produzido, na época da chuva, que foi classificado como extra gordo (acima de 60%).

Tabela 22. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de gordura no extrato seco (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	59,23 ± 9,45 <sup>a</sup>	37,11	77,72	15,96
Sem Inspeção	57,97 ± 8,64 <sup>a</sup>	40,14	77,39	14,90

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

#### 4.5.3.5. Teor de cloretos

Os valores dos teores percentuais de cloretos não foram diferentes ( $p > 0,05$ ) entre os dois tratamentos (com e sem inspeção), como mostrado na Tabela 23.

Tabela 23. Estimativa da média, desvio padrão e coeficientes de variação (CV) do teor de cloretos (%) dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Tratamento	Média e desvio padrão	Menor valor	Maior valor	CV (%)
Com Inspeção	1,51 ± 0,55 <sup>a</sup>	0,40	3,04	36,73
Sem Inspeção	1,59 ± 0,71 <sup>a</sup>	0,60	3,70	44,81

Médias com sobrescritos distintos diferem significativamente pelo teste de *Student* ( $p < 0,05$ )

O teor médio encontrado foi de 1,55 %, sendo o menor valor de 0,40 % e o maior valor de 3,70 %. Este resultado está dentro dos valores encontrados em outros estudos para QMA (Pinto *et al*, 2016; Valente, 2022). O teor de cloretos nos queijos está diretamente relacionado ao procedimento de salga. Devido ao caráter artesanal de produção dos queijos, a salga não é um procedimento padronizado em todas as queijarias. Cada estabelecimento usa seus próprios métodos no que diz respeito à quantidade de sal adicionada, tempo de exposição dos queijos ao sal e viragem dos queijos (Valente, 2022).

#### 4.5.4. Correlações entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos queijos Minas artesanal.

A Tabela 24 apresenta as correlações resultantes do estudo das características físico-químicas (determinação do pH, teores percentuais de umidade, extrato seco total, gordura, gordura no extrato seco e cloretos) e microbiológicas (contagens de coliformes totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo e BAL) dos queijos Minas artesanal.

Tabela 24. Estimativas das correlações entre os parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos QMA, coletados no comércio varejista da região metropolitana de Belo Horizonte (MG)

Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos QMA										
	COL	EC	Scop	BAL	pH	Umi	EST	Gord	Gest	Clor
COL	1	<b>0,41</b>	0,18	<b>0,38</b>	0,27	0,06	-0,06	-0,03	-0,15	-0,26
EC		1	0,23	0,2	0,09	0,06	-0,06	-0,11	-0,21	-0,11
Scop			1	0,17	-0,05	0,12	-0,12	-0,16	-0,19	-0,04
BAL				1	0,21	0,25	-0,25	<b>-0,35</b>	-0,25	<b>-0,34</b>
pH					1	-0,03	0,03	0,10	0,08	-0,11
Umi						1	<b>-1</b>	<b>-0,63</b>	0,16	-0,17
EST							1	<b>0,63</b>	-0,16	0,17
Gord								1	<b>0,66</b>	0,18
Gest									1	0,07
Clor										1

Col – Coliformes totais, EC – *E. coli*, Scop – *Staphylococcus* coagulase positivo, BAL – bactérias ácido-láticas, pH, Umi – umidade, EST – extrato seco total, Gord – gordura, Gest – gordura no extrato seco, Clor – cloretos.



A correlação de Pearson mede o grau de influência que uma variável pode ter em relação a outra, ou seja, se estão correlacionadas. Uma regra prática de interpretação da correlação é que a essa é considerada perfeita quando o valor for igual a 1, entre 0,7 e 0,99 é considerada forte, entre 0,5 e 0,7 é moderada, entre 0,3 e 0,5 é fraca e abaixo de 0,3 considera-se uma correlação insignificante (Mukaka, 2012; Sales, 2015).

A umidade apresentou correlação moderada negativa ( $p < 0,05$ ) com teores de gordura e correlação forte negativa com extrato seco total. Esse comportamento era esperado, pois a perda de água é natural durante o processo de maturação do queijo e a redução da umidade acontece paralelamente ao aumento da concentração dos sólidos totais no queijo, entre eles, a gordura (Sales, 2015). Essa relação também pode ser comprovada pela correlação positiva do teor de extrato seco total com a gordura.

A sobrevivência de microrganismos é fortemente influenciada pela umidade do queijo. A perda de água impõe condições adversas ao crescimento microbiano, pois reduz a atividade de água e aumenta a concentração de cloreto de sódio no queijo, os quais exercem efeito inibitório sobre a população de bactérias (Sales, 2015). Foi observado uma correlação fraca negativa do teor de umidade com a concentração de cloreto de sódio. Isso pode ser explicado pelas amostras serem originadas de diferentes regiões, onde o processo de salga pode variar bastante.

Não se observou correlação entre os microrganismos com a umidade. Somente as BAL tiveram uma correlação negativa moderada ( $p < 0,05$ ) com teor de gordura e cloretos. Contagem de coliformes totais apresentaram correlação moderada positiva ( $p < 0,05$ ) com contagens de *E. coli* e BAL e baixa correlação com *Staphylococcus* coagulase positivo. A correlação positiva com *E. coli* já era esperada, pois *E. coli* faz parte do grupo de coliformes, mas uma correlação positiva com BAL já não era esperada, pois, além das BAL inibirem os outros microrganismos pela produção de ácido lático, os coliformes competem com BAL por nutrientes, como a lactose. Esse fato pode ser explicado por uma contaminação de coliformes pela manipulação.

#### 4.6. Conclusões

O QMA, que utiliza em sua fabricação a adição de bactérias ácido lácticas e também passa por um período de maturação, foi considerado um alimento seguro à saúde do consumidor quanto à contaminação por *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e quanto a presença de enterotoxinas estafilocócicas.

No entanto, altas contagens de coliforme totais, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positivo, que são indicadores higiênicos-sanitários, foram encontradas nas amostras de QMA com e sem fiscalização governamental, demonstrando a necessidade de treinamentos constantes para a conscientização dos produtores quanto à importância das boas práticas de produção, desde a ordenha até a comercialização.

A qualidade físico-química foi significativamente diferente entre os QMA com e sem inspeção, sendo que a maioria dos produtos inspecionados estava conforme quanto ao teor de umidade, o que reflete num tempo de maturação adequado. Os valores obtidos de pH e teor de umidade, estratificados em grupos que atenderam, ou não, ao critério microbiológico da legislação atual, não mostraram diferença significativa, indicando que os mesmos não são suficientes para garantir a qualidade microbiológica do alimento.

Não foi observada correlação forte entre os resultados dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos estudados. Isso pode ser esperado pela grande variação de origem dos queijos, o que influencia o modo de fazer do QMA, além disso, a análise do produto final é um parâmetro no qual não se tem o histórico do processamento do alimento, como, por exemplo, o nível de contaminação inicial da matéria-prima.

#### 4.7. Referências

3M. **Instruções do produto: Ensaio para detecção molecular de *Salmonella* 2.** Março de 2017. 13 p.

3M. **Instruções do produto: Ensaio para detecção molecular de *Listeria monocytogenes* 2.** Outubro de 2016. 12 p.

ANDRETTA, M.; ALMEIDA, T.T.; FERREIRA, L.R.; CARVALHO, A.F.; YAMATOGLI, R.S.; NERO, L.A. Microbial safety status of Serro artisanal cheese produced in Brazil, **Journal of Dairy Science**, v. 102, Issue 12, p. 10790-10798, 2019. ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16967>.

ANTONIO, M.B.; BORELLI, B.M. A importância das bactérias lácticas na segurança e qualidade dos queijos Minas artesanais. **Revista do Instituto Laticínio “Cândido Tostes”**, jul/set, v. 75, n. 3, p. 204-221, 2020. DOI: 10.14295/2238-6416.v75i3.799

AMORIM, A.L.B.C; COUTO, E.P.; SANTANA, A.P; RIBEIRO, J.L.; FERREIRA, M.A. Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, n.4, p. 364-367, 2014.

AOAC. Official Method 991.14. **Coliform and Escherichia coli counts in foods**. Dry rehydratable film (Petrifilm™ E. coli/coliform count plate™ and Petrifilm™ coliform count plate™) Methods. 1991.

BioMérieux. **Instruções do produto: VIDAS® Staph enterotoxin II (SET 2)**. Referência 30705. Agosto de 2018. 8p.

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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, p.3, 30 mar. 2017.

CAMPOS, G.Z. **Avaliação microbiológica de queijos minas artesanais provenientes da Serra da Canastra durante e após o período de maturação**. 2019. Dissertação (Mestrado em ciência dos alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

CAMPOS, G.Z.; LACORTE, G.A.; JURKIEWICZ, C.; HOFFMANN, C.; LANDGRAF, M.; MELO FRANCO, B.D.G.; PINTO, U.M. Microbiological characteristics of canastra cheese during manufacturing and ripening, **Food Control**, v. 121, 2021, 107598, ISSN 0956-7135, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107598>.

CAVICCHIOLI, V.Q.; CAMARGO, A.C.; TODOROV, S.D.; NERO L.A. Novel bacteriocinogenic *Enterococcus hirae* and *Pediococcus pentosaceus* strains with antilisterial activity isolated from Brazilian artisanal cheese, **Journal of Dairy Sciences**, v. 100, p. 2526-2535, 2017, <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12049>.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Salmonella home page: Information for Healthcare Professionals and Laboratories**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/sal.monella/general/technical.html>. Acesso em 28 set. 2017a.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. **Listeria (listeriosis): Symptoms**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/listeria/faq.html>>. Acesso em 28 set. 2017b.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2017, Annual Report**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019.

COMUNIDADE EUROPEIA. REGULAMENTO (CE). Regulamento (CE) n° 2073/2005 relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos géneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, 8 de fevereiro de 2019.

CORNELL UNIVERSITY. Dairy Foods Science Notes. Coliform Bacteria – indicator in food & water. New York, 2007.

COSTA JÚNIOR, L. C. G.; MORENO, V. J.; MAGALHÃES, F. A. R. *et al.* Maturação do Queijo Minas Artesanal da Microrregião Campo das Vertentes e os efeitos dos períodos seco e chuvoso. **Revista do Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 2, p. 111-120, 2014.

DORES, M. T.; NOBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F. Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese. **Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000003>

DUQUENNE, M.; DERZELLE, S.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; HENNEKINNE, J.A.; MUTEL, I.; BOUIX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. Milk maturation temperature and time are key technological parameters to limit staphylococcal enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacture. **Food Control**, v. 59, p. 118-127, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.003>

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. **EFSA Journal** 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>

FERRAZ, W.M. **Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência do ambiente sobre a maturação**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2016.

FERREIRA, J.R.A. **Caracterização microbiológica do queijo Minas artesanal comercializado em São Paulo: segurança, higiene e diversidade microbiana**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

FIGUEIREDO, R. C. **Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de queijo Minas artesanal de Serra do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano**. 2018. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

FOOD SAFETY. **Intoxicación Alimentaria: Bacterias y Vírus**. Disponível em: <https://espanol.foodsafety.gov/intoxicaci%C3%B3n/causas/bacteriasvirus/xa2/%C3%ADndice.html>. Acesso em 28 set. 2017.

GONÇALVES, A.G. **Padronização de PCR para detecção direta e diferenciação de espécies de *Campylobacter* em queijo Minas artesanal**. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados). Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2018.

HELRICH, K. Standard solutions and certified reference. Em: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: food composition: additives: natural contaminants. 15 ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, v. 2, p. 640-641, 1990.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 546, de 29 de outubro de 2002**. Identifica a microrregião do Serro. Belo Horizonte: IMA, 2002.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 594, de 10 de junho de 2003**. Identifica a microrregião de Araxá. Belo Horizonte: IMA, 2003a.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 619, de 1 de dezembro de 2003**. Identifica a microrregião do Alto do Paranaíba como produtora do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2003b (revogada).

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 694, de 17 de novembro de 2004**. Identifica a microrregião da Canastra. Belo Horizonte: IMA, 2004.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 874, de 2 de outubro de 2007**. Altera a denominação da microrregião do Alto do Paranaíba como produtora do queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2007 (revogada).

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 1022, de 03 de novembro de 2009**. Identifica a microrregião do Campo das Vertentes. Belo Horizonte: IMA, 2009.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 1305, de 30 de abril de 2013**. Estabelece diretrizes para produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2013.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 1397, de 13 de fevereiro de 2014**. Identifica a microrregião do Triângulo Mineiro como produtora de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2014a.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 1428, de 29 de agosto de 2014**. Identifica a microrregião da Serra do Salitre como produtora de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2014b.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 2016, de 26 de novembro de 2020**. Identifica a Região Serras da Ibitipoca como Produtora do Queijo Minas Artesanal e Revoga a Portaria IMA n° 1834, de 04 de julho de 2018. Belo Horizonte: IMA, 2020.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria n° 2051, de 07 de abril de 2021**. Define o período de Maturação do Queijo Minas Artesanal produzido nas microrregiões de Araxá, Campo das Vertentes, Canastra, Cerrado, Serra do Salitre, Serro e Triângulo Mineiro. Belo Horizonte: IMA, 2021.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 2129, de 22 de março de 2022.** Identifica a Região de Diamantina como produtora de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2022a.

IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 2141, de 19 de abril de 2022.** Identifica a Região Entre Serras da Piedade ao Caraça como produtora de queijo Minas artesanal. Belo Horizonte: IMA, 2022b.

International Organization of Standardization. **ISO 10272-1:** microbiology of the food chain — Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. — Part 1: Detection method. Switzerland: ISO, 2017.

International Organization of Standardization. **ISO 11290-1:** microbiology of food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.- Part 1: Detection method. 2 ed. Switzerland: ISO, 2017.

International Organization of Standardization. **ISO 3433 [IDF 222]:** cheese – determination of fat content – Van Gulik method. 2 ed. Switzerland: ISO, 2008.

International Organization of Standardization. **ISO 5534 [IDF 4]:** cheese and processed cheese – determination of the total solids content (reference method). 2 ed. Switzerland: ISO, 2004.

International Organization of Standardization. **ISO 6579-1:** microbiology of food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* – Part 1: Detection of *Salmonella* spp. Switzerland: ISO, 2017.

International Organization of Standardization. **ISO 6888-1:** microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Technique using Baird-Parker medium. Switzerland: ISO, 1999.

International Organization of Standardization. **ISO 7889 [IDF 117]:** yogurt – enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37°C. Switzerland: ISO, 2003.

IPHAN - Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba).** Brasília, DF: 2014. 140p.

JACKSON, K.; GOULD, L.; HUNTER, J. C.; KUCEROVA, Z.; JACKSON, B. Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 6, p. 1116-1118, 2018. <https://doi.org/10.3201/eid2406.171051>.

KAMIMURA, B. A.; MAGNANI, M.; LUCIANO, W. A.; CAMPAGNOLLO, F. B.; PIMENTEL, T. C.; ALVARENGA, V. O.; PELEGRINO, B. O.; CRUZ, A. G.; SANT'ANA, A.S. Brazilian artisanal cheeses: an overview of their characteristics, main types and regulatory aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, p. 1636-1657, 2019. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12486>

KASZONI-RÜCKERL, I.; MUSTEDANAGIC, A.; MURI-KLINGER, S.; BRUGGER, K.; WAGNER, K.H.; WAGNER, M.; STESSL, B. Predominance of distinct *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* in recurrent contamination events at dairy processing facilities. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 234. 2020. doi: 10.3390/microorganisms8020234. PMID: 32050536; PMCID: PMC7074772.

KEYS, A.L.; DAILEY, R.C.; HITCHINS, A.D.; SMILEY, R. D. Post enrichment population differentials using buffered listeria enrichment broth: implications of the presence of *Listeria innocua* on *Listeria monocytogenes* in food test samples. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 11, p. 1854-1862, 2013. ISSN 0362-028X, <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-089>.

KOBAYASHI, P. F.; CARVALHO, A. F.; FREDRIGO, R. C.; COSTA, A. M.; PIATTI, R. M.; PINHEIRO, E. S. Detection of *Brucella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* in raw milk and cheese of uninspected production in the metropolitan area of São Paulo. **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 38, n. 4, p. 1897-1904, 2017.

LANZA, J. Surtos Alimentares no Brasil – Dados atualizados em maio de 2017. Disponível em: <http://foodsafetybrazil.org/surtos-al.imentares-no-brasil-dados-atual.izados-em-maio-de-2017/>>. Acesso em: 07 de outubro de 2017.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996**. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos em anexo. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 9, de 8 de abril de 2009**. Institui os procedimentos de controle de *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2009.

MARGALHO, L.P.; FELICIANO, M.D.; SILVA, C.E.; ABREU, J.S.; PIRAN, M.V.F.; SANT'ANA, A.S. Brazilian artisanal cheeses are rich and diverse sources of nonstarter lactic acid bacteria regarding technological, biopreservative, and safety properties—Insights through multivariate analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 7908-7926, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18194>

MARTINS, J.M.; GALINARI, E.; PIMENTEL-FILHO, N.J.; RIBEIRO, J.I.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L.L.F. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n.1, p. 219-230, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131003>

MERCK. **Reactivos, diagnóstica, productos químicos**. Darmstadt, 1993. 1584 p.

METZ, M.; SHEEHAN, J.; FENG, P. C. H. Use of indicator bacteria for monitoring sanitary quality of raw milk cheeses - A literature review. **Food Microbiology**, v. 85, 2020. doi: 10.1016/j.fm.2019.103283.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Decreto nº 42.645, de 05 de junho de 2002**. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2002.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Lei n° 19.492, de 13 de janeiro de 2011**. Altera dispositivos da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Instrução Normativa n° 161, de 1 de julho de 2022**. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília : ANVISA, 2022a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar no Brasil*. Brasília, Janeiro de 2022b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2022>> Acesso em fevereiro de 2023

MONTEIRO, G.P.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; 1; NALEVAIKO, P.C.; CARREON; M.M.; BUIATTE, A.B.G.; SANTOS, F.A.L.; PACHECO, C.R.; MAIA, Y.C.P; ROSSI, D.A. Consumption of minas frescal cheese may be a source of human infection by *Campylobacter jejuni*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 2, p. 546-555, mar./apr. 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n2a2020-42429>

MUKAKA, M.M. Statistics corner: a guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. **Malawi Medical Journal**, v. 24, n. 3, p. 69-71, september 2012.

NORS, National Outbreak Reporting System. Center for Disease Control and Prevention, CDC, USA. <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>. Acesso em abril de 2023.

OLIVEIRA, L.G. **Caracterização microbiológica e físico-química durante a maturação em diferentes épocas do ano de queijo Minas artesanal de produtores cadastrados da mesorregião de Campo das Vertentes – MG**. 2014. Dissertação (Mestrado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

OLIVEIRA, L. G.; SILVA, G. O.; BARBOSA, C.D.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; FIGUEIREDO, N. C., NUNES, A. C.; LAGE, A. P. e SOUZA, M. R. Lactic acid bacteria isolated from Brazilian Minas artisanal cheeses and their in vitro antagonisms against *Mycobacterium bovis* BCG. **International Journal of Dairy Technology**, v. 70, p. 1-8, 2018. DOI: 10.1111/1471-0307.12540

ORNELAS, E. A.; CERQUEIRA, M. M. O. P; SILVA, M. C. C.; DIAS, R. S. Perfil enterotoxigênico de amostras de queijo minas artesanal produzidas na Serra da Canastra-MG. **Periódico Científico Núcleo de Biociências**. Belo Horizonte, MG, v.02, n.04, Dez de 2012. ISSN 2238-1945.

PEDROSA, F.R.V. **Pesquisa de *Salmonella* spp. em queijos Minas meia-cura obtidos em feiras livres da cidade de São Paulo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplica às Zoonoses). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PEREIRA, D.A. **Efeito de diferentes condições de maturação nas características de queijo Minas artesanal**. 2019. Dissertação (Doutorado em ciência dos alimentos). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.



PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

PINCHUK, I.V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins** (Basel), v. 2, n. 8, p. 2177-97, 2010. doi: 10.3390/toxins2082177

PINTO, M.S.; LEMPK, M.W.; CABRINI, C.C.; SARAIVA, L.K.V.; CANGUSSU, R.R.C.; CUNHA, A.L.F.S. Características físico-químicas e microbiológicas do queijo artesanal produzido na microrregião de Montes Claros – MG. . **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 1, p. 43-52, jan/mar, 2016.

RAMOS, G.L.P.A.; SILVA, G.M.M.; RIBEIRO, W.A.; NASCIMENTO, J.S. *Salmonella* spp. em produtos lácteos no Brasil e seu impacto na saúde do consumidor. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, p. 254-266, cap. 17, 2021. DOI 10.37885/210203163

RAY, B. Fundamental. **Food Microbiology**. 3 ed. New York: CRC Press, 2003. 608 p.

RESENDE, M.F.S.; COSTA, H.H.S.; ANDRADE, E.H.P.; ACÚRCIO, L.B.; DRUMMOND, A.F.; CUNHA, A.F.; NUNES, A.C.; MOREIRA, J.L.S.; PENNA, C.F.A.M.; SOUZA, M.R. Queijo de minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude das queijarias nas populações de bactérias acidolácticas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.6, p.1567-1573, 2011.

REZENDE, P.H.L.; MENDONÇA, E.P.; MELO, R.T.; COELHO, L.R.; MONTEIRO, G.P.; ROSSI, D.A. aspectos sanitários do queijo Minas artesanal comercializado em feiras livres. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Nov/Dez, v. 65, n 377, p. 36-42, 2010.

SALES, G. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano**. 2015. Dissertação (Mestrado em ciência animal.). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

SALGADO, M. M.; GONÇALVES, M. G.; HIGA, F. T.; FUKASAWA, L. O.; OLIVEIRA, P. L.; SILVA, C. N., et al. Avaliação de resultados discrepantes obtidos na execução de PCR em tempo real em amostras de pacientes com suspeita clínica de meningite bacteriana. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 161-4. 201.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.171-175, abr./jun., 2006.

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: Blucher, 2017. 560 p.

SOARES, D.B. **Caracterização físico-química e microbiológica do queijo Minas artesanal na região de Uberlândia – MG**. 2014. Dissertação (Mestrado em ciências veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SOBRAL, D.; TEODORO, V.A.M.; PAULA, J.C.J.; OLIVEIRA, M.B.; LANDIN, T.B.; COSTA, R.G.B. Qualidade microbiológica de queijo Minas artesanal da Canastra em estabelecimentos comerciais. In: 31º CONGRESSO NACIONAL. DE LATICÍNIOS, 2017, Juiz de Fora. Anais... Juiz de Fora: Instituto Cândido Tostes, 2017b. P. 1-5.

TRMČIĆ, A.; CHAUHAN, K.; KENT, D. J.; RALYEA, R. D.; MARTIN, N. H.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 8, p. 6105-6120, 2016. doi: 10.3168/jds.2016-11112.

VALENTE, G.L.C. **Caracterização microbiológica e físico-química de água, leite cru, soro-fermento, swabs de superfícies e queijo Minas artesanal na região de Campo das Vertentes ao longo da maturação nas estações de seca e chuva**. 2022. Dissertação (Doutorado em ciência animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

ZOCCAL., R. Queijos: produção e importação. Disponível em: <http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>. Agosto de 2016.

## 5. CAPÍTULO III: FATORES RELACIONADOS À MATURAÇÃO DE QUEIJOS ARTESANAIS QUE APRESENTAM EFEITOS DELETÉRIOS SOBRE MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS – UMA REVISÃO

Suzana Horta Fonseca, Marcelo Resende Souza, Bruna Maria Salotti de Souza, Marco Antônio Sloboda Cortez, Leorges Moraes da Fonseca

Artigo publicado no periódico “Revista do Instituto Cândido Tostes” (volume 77, número 04 (outubro - dezembro, 2022))

### **Factors related to ripening of artisanal cheeses which have depletive effects on pathogenic microorganisms – a review**

#### **Resumo**

A fabricação e comercialização de queijos artesanais de leite cru vem crescendo continuamente devido à sua variação e intensidade de sabor se comparado ao queijo de leite pasteurizado. O desenvolvimento do sabor e aroma no queijo de leite cru ocorre principalmente pela variada microbiota endógena existente e enzimas naturais do leite, que normalmente são eliminados durante o processo de pasteurização. A ausência do processo de pasteurização intensifica a necessidade de uma etapa de maturação bem controlada para se obter um produto final de qualidade. A maturação do queijo é um fenômeno complexo, que envolve reações bioquímicas decorrentes da interação de microrganismos com o queijo e transformações físico-químicas consequentes desta atividade microbiana e da ação climática sobre os queijos. Assim, a maturação tende a reduzir a umidade, a atividade de água e aumentar a acidez dos queijos. Desta forma, a maturação pode reduzir populações de microrganismos patogênicos e controlar o risco referente ao consumo deste tipo de alimento. Os fatores que controlam o crescimento de microrganismos no queijo incluem: atividade de água, concentração de sal, potencial de redução de oxidação, pH, a presença de NO<sub>3</sub>, temperatura de maturação e a produção de bacteriocinas. Nesta revisão, serão abordados os principais fatores relacionados à maturação de queijos que apresentam efeitos deletérios sobre os microrganismos patogênicos e sua importância na produção de queijos Minas artesanais.

Palavras-chave: interação microbiana; pH; redox; sal; atividade de água.

#### **Abstract**

The manufacture and sale of artisanal raw milk cheeses has been growing continuously due to its variation and flavor intensity compared to pasteurized milk cheeses. The development of flavor and aroma in raw milk cheese occurs mainly due to the diversified endogenous microbiota and natural milk enzymes, which are normally eliminated during the pasteurization process. The absence of the pasteurization process intensifies the need for a well-controlled maturation step to obtain a quality final product. Cheese maturation is a complex phenomenon that involves biochemical reactions resulting from the interaction of microorganisms with the cheese and physicochemical changes resulting from this microbial activity and the climatic action on cheese. Thus, maturation tends to reduce moisture, water activity and increase the acidity of the cheeses. Thereby maturation can reduce populations of pathogenic microorganisms, and control the risk related to the consumption of this type of

food. Factors that control the growth of microorganisms in cheese include: water activity, salt concentration, oxidation-reduction potential, pH, the presence of NO<sub>3</sub>, ripening temperature and the production of bacteriocins. In this review, the main factors related to cheese maturation that have deleterious effects on pathogenic microorganisms and their importance in the production of artisanal Minas cheeses will be addressed.

Keywords: microbial interaction; pH; redox; salt; water activity.

## 5.1. Introdução

A produção de queijos começou há cerca de 8.000 anos e hoje em dia existem mais de 1.000 variedades em todo o mundo. A fabricação da maioria das variedades de queijo envolve a combinação de quatro ingredientes: leite, coalho, microrganismos e sal, que são processados através de uma série de etapas comuns, como coagulação, acidificação, expulsão do soro de leite, enformagem e adição de sal, seguido, ou não, por um período de maturação. Variações na origem do leite, nas técnicas de processamento, nas misturas de ingredientes, na microbiota e no tempo de maturação levaram à evolução de todas essas variedades (Perry, 2004; Paula *et al.*, 2009).

Na fabricação do queijo, pode-se utilizar leite cru ou leite pasteurizado. Até a década de 1940 os queijos eram tradicionalmente feitos com o leite cru. A pasteurização do leite tornou-se cada vez mais popular a partir do início do século XX, principalmente por razões de saúde pública, mas também para fornecer leite de qualidade bacteriológica mais uniforme e manter sua qualidade, pois a pasteurização destrói não somente os microrganismos patógenos, mas também microrganismos deteriorantes. No entanto, esse tratamento térmico pode prejudicar a aptidão do leite para a coagulação, uma vez que insolubiliza parte do cálcio solúvel, resultando em uma coalhada mais fraca, o que pode aumentar as perdas de sólidos do leite no soro. O queijo, quando fabricado com leite pasteurizado, apresenta sabor e aroma menos intensos e matura mais lentamente do que aqueles fabricados com leite cru, dadas as várias modificações que são provocadas pelo calor como: inativação de enzimas naturais do leite (lipases e proteases), inativação de grande parte da microbiota endógena, desnaturação de proteínas, dentre outras (Paula *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2017; Penna *et al.*, 2021).

O objetivo primário da produção de queijo é estender o prazo de validade e conservar os componentes nutritivos do leite. Isso é alcançado pela produção de ácido e pela desidratação. A produção de ácido láctico pela microbiota inicial durante a fabricação do queijo resulta na diminuição do pH do leite e, isso em combinação com cozimento e mexedura, promovem a

sinérese da coalhada e expulsão do soro de leite. Enquanto todos os queijos coagulados com ácido são consumidos frescos, a maioria dos queijos coagulados com coalho passa por um período de maturação que pode variar de cerca de três semanas a dois anos ou mais como para o parmesão e Cheddar extra-maduro (Beresford *et al.*, 2001; Paula *et al.*, 2009).

O queijo é um ecossistema complexo que está em fluxo contínuo em termos tanto dos fatores externos, como técnicas de fabricação e condições de maturação, quanto fatores intrínsecos, como composição físico-química e interações entre as diferentes comunidades microbianas. A ampla gama de reações bioquímicas e interações microbianas que ocorrem durante a maturação do queijo é a base das características desejáveis do produto, como sabor e aroma, prevenção de deterioração, inibição de patógenos e modulação da saúde (Pelaez; Requena, 2005). Dentre essas reações bioquímicas as três principais são: metabolismo da lactose residual, lactato e citrato, proteólise e lipólise (Khattab *et al.*, 2019).

A presente revisão de literatura teve como objetivo apresentar os principais fatores relacionados à maturação de queijos que apresentam efeitos deletérios sobre os microrganismos patogênicos e sua importância na produção de queijos Minas artesanais.

## **5.2. Referencial teórico**

### *5.2.1. Fatores que controlam a multiplicação de microrganismos*

A contaminação microbiológica na indústria de alimentos representa um sério perigo para a saúde do consumidor e acarreta grandes prejuízos econômicos. Os produtos lácteos, pela própria matéria-prima que utilizam e alto teor de umidade nos locais de produção, são particularmente suscetíveis a essa contaminação (Perry, 2004). Dentre esses alimentos, merecem destaque os queijos, elaborados com leite cru e até mesmo com leite pasteurizado, pelo fato de serem produtos muito manipulados e também ricos em nutrientes, o que facilita a multiplicação microbiana, podendo levar à transmissão de microrganismos patogênicos.

A viabilidade de microrganismos no queijo é determinada por parâmetros extrínsecos e intrínsecos. Os últimos incluem teor de umidade, concentração de sal e atividade de água; pH e acidez; teor de nutrientes; potencial de redução de oxidação; presença de compostos antimicrobianos, sejam eles naturais ou adicionados como conservantes de alimentos, por exemplo, NO<sub>3</sub>; e a presença da microbiota competitiva. Os parâmetros extrínsecos incluem

fatores como tipo de embalagem e sua atmosfera, tempo e temperatura de armazenamento, etapas de processamento, histórico do produto e uso tradicional. A interação desses fatores determina o potencial de viabilidade e multiplicação microbiana em queijos (Amico e Donnelly, 2017).

### 5.2.2. Interação microbiana

As culturas iniciadoras podem ser definidas como isolados que produzem ácido suficiente para reduzir o pH do leite para próximo de 5,0 em um espaço de tempo entre 5 e 20 horas, dependendo da variedade do queijo a ser fabricado. Essas bactérias são adicionadas no início da fabricação como culturas puras ou no formato de soro-fermento ou ainda podem ser contaminantes naturais do leite, como é o caso de muitas variedades de queijos artesanais de leite cru. Elas crescem durante a fabricação e normalmente atingem densidades de  $10^8$  UFC/g dentro das primeiras horas da fabricação. As culturas iniciadoras podem ser mesofílicas ou termofílicas, dependendo do queijo a ser fabricado; culturas mesófilas são usadas na produção de Cheddar, Gouda, Edam, Blue e Camembert, enquanto culturas termofílicas são usados na produção de queijos duros preparados em alta temperatura (50 – 55 °C), como Emmental, Gruyere, Parmesão e Grana. Bactérias iniciadoras encontradas mais frequentemente são membros dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Enterococcus* (Perry, 2004; Paula *et al.*, 2009).

As culturas mesofílicas e termofílicas podem ser subdivididas em culturas mistas (indefinidas) nas quais o número de cepas é desconhecido, e culturas definidas, que são compostas por um número conhecido de cepas. Culturas mesófilas indefinidas ou de cepas mistas são principalmente compostas por *L. lactis* ssp. *cremoris* e *L. lactis* ssp. *lactis*, que pode incluir cepas de metabolização de citrato, para produção de sabor (Beresford *et al.*, 2001; Perry, 2004; Paula *et al.*, 2009).

Os iniciadores termofílicos são compostos por cepas únicas ou múltiplas de *S. thermophilus* e lactobacilos termofílicos, como *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* ou *Lb. helveticus*. Culturas termofílicas indefinidas ou mistas são usadas em pequena escala de produção de queijos Gruyere, Emmental e Grana da França, Suíça e Itália. Essas culturas são geralmente produzidas a partir da incubação a 40 – 45 °C do soro da produção do dia anterior (Beresford *et al.*, 2001; Paula *et al.*, 2009).

Durante a maturação ocorre uma série de reações bioquímicas, incluindo o metabolismo residual da lactose por bactérias do ácido lático (BAL) presentes na massa do queijo. As BAL são essenciais para a segurança do queijo, sintetizando muitos compostos antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, como o ácido lático, que podem inibir o crescimento de bactérias patogênicas, levando à morte e lise celular, contribuindo para a obtenção da estabilidade microbiológica no queijo e desenvolvendo as características típicas do queijo curado (De Jesus *et al.*, 2020).

Além da produção de ácido no queijo, a cultura primária desempenha diferentes funções, principalmente com relação ao abaixamento do potencial redox que passa de +250 mV no leite, para -150 mV no queijo. Essa modificação é essencial para o desenvolvimento bioquímico da maturação (Paula *et al.*, 2009). As BAL também contribuem para a maturação do queijo, quando suas enzimas são envolvidas na proteólise e conversão de aminoácidos em compostos de sabor (Perry, 2004).

Durante a maturação, os organismos iniciadores dominam a microbiota do queijo, mas a maioria morre e sofre a lise de forma relativamente rápida. Em alguns tipos de queijos, quando a adição de sal é baixa durante as primeiras semanas de maturação, a lise das BAL é mais lenta (Fox *et al.*, 2017).

A lise de bactérias é definida como um fenômeno de ruptura celular espontâneo, devido à hidrólise da cadeia de peptidoglicano por enzimas localizadas na parede celular, chamadas autolisinas ou devido à atividade hidrolítica de enzima codificada por um profago denominada endolisina, encontrada em bactérias lisogênicas. Em geral, esse fenômeno ocorre espontaneamente após a fase estacionária e já foi observado em várias espécies. As células perdem a sua integridade e liberam o seu conteúdo citoplasmático, como enzimas metabólicas, enzimas proteolíticas, como as peptidases (Saboya, 2002).

Como a autólise é uma reação enzimática, sua taxa e extensão dependem de parâmetros físicos e bioquímicos, tais como pH, temperatura e força iônica. Por ser um fenômeno celular intrínseco, outros dois fatores podem influenciar a taxa e extensão da autólise: (1) a característica genética da linhagem e (2) o estado fisiológico da célula. Queijo fabricado com cultura *starter* de lise rápida irá maturar mais rapidamente e, geralmente possuem melhor sabor do que o fabricado com uma cepa de lise lenta (Fox *et al.*, 2017).

Várias espécies de BAL são capazes de produzir bacteriocinas que controlam o crescimento de outras bactérias contaminantes e com isso exercem uma proteção muito eficiente durante e após a fabricação dos queijos. Ao longo dos anos, uma maior atenção foi dada ao efeito antagonista frente a patógenos de compostos antimicrobianos produzidos pela microbiota natural presente no leite e seus derivados. As bacteriocinas nisina e lacticina 481 produzidas por cepas de *Lactococcus* são as mais abundantes entre isolados selvagens de BAL (Pelaez; Requena, 2005; Paula *et al.*, 2009).

A nisina é produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, é um lantibiótico (contém aminoácidos, meso-lantionina e 3-metilantionina). O composto é eficaz contra bactérias Gram-positivas, principalmente formadora de esporos, e ineficaz contra fungos e bactérias Gram-negativas. O alvo da célula para esses agentes é a membrana citoplasmática, onde eles despolarizam membranas bacterianas energizadas e formam poros multiestados dependente de voltagem. O resultado da formação de um poro é a perda de aminoácidos acumulados e a inibição do transporte de aminoácidos. Ao contrário dos antibióticos, as bacteriocinas geralmente inibem apenas espécies intimamente relacionadas, que consistem em pequenas proteínas, e a maioria é mediada por plasmídeo (Preetha; Narayanan, 2020).

Um estudo, utilizando diferentes cepas de BAL (*Weissella paramesenteroides* GIR16L4 ou *Lactobacillus rhamnosus* D1 ou ambas) como culturas iniciadoras, verificou a inibição de *S. aureus* em queijos produzidos experimentalmente e avaliou a viabilidade das cepas de *S. aureus* e a expressão de suas enterotoxinas. Ao longo de sete dias, observou-se que a presença de BAL não prejudicou a multiplicação de *S. aureus*, no entanto, foi observado, via qPCR, uma mudança na expressão gênica de enterotoxinas estafilocócicas, sugerindo que existe comunicação molecular entre *S. aureus* e bactérias do ácido láctico no queijo (Silva *et al.*, 2020).

Outro estudo mostrou atividade inibitória de BAL contra *Mycobacterium bovis*, o agente causador da tuberculose e que pode estar presente em leite cru e seus derivados. Avaliou-se a atividade antagonista *in vitro* das BAL, isoladas de queijo Minas artesanal contra *M. bovis bacillus* Calmette-Guerin (BCG). Nove cepas de BAL foram testadas contra *M. bovis* BCG em cinco ensaios antagonistas *in vitro* e quatro lactobacilos foram capazes de inibir ou suprimir completamente a multiplicação de *M. bovis* BCG em todos os experimentos. Embora



o principal mecanismo de inibição não tenha sido elucidado, o pH desempenhou um papel importante, mas a presença de bacteriocinas também pode ser considerada, especialmente nos ensaios onde o valor de pH permaneceu próximo ao neutro (Oliveira *et al.*, 2018).

Aplicações menos conhecidas de bacteriocinas são o controle de microrganismos deteriorantes acidentais e seu uso como agentes indutores de lise celular para aumentar a proteólise e a formação do sabor no queijo. O uso de bacteriocinas para induzir a lise de BAL é uma diferente abordagem para acelerar a maturação do queijo e controle do desenvolvimento do sabor (Pelaez; Requena, 2005).

Durante a maturação ocorre o crescimento de uma microbiota adventícia (“Bactérias de ácido láctico não iniciadoras”, principalmente lactobacilos heterofermentativos) e, em muitas variedades de queijo, uma cultura ou fermento secundário é adicionado, com o objetivo de obtenção de alguma característica particular desejável para a categoria do queijo a ser produzido. O desenvolvimento de uma microbiota secundária, por exemplo *Propionibacterium freudenreichii* no queijo suíço produz gás provocando o aparecimento de olhaduras características, fungos em variedades de queijos como Gorgonzola, Camembert e Brie e uma complexa microbiota bacteriana Gram-positiva em queijos maturados (Paula *et al.*, 2009). Essas culturas bacterianas são as principais contribuintes para o desenvolvimento do sabor do queijo durante o processo de maturação (Khattab *et al.* 2019).

### 5.2.3. pH e ácidos orgânicos

O pH ideal para a multiplicação da maioria das bactérias é quase neutro e o desenvolvimento é frequentemente baixo em valores de  $\text{pH} < 5,0$ . Devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, a massa de queijo após a fabricação apresenta valores baixos de pH que varia entre 4,5 e 5,3, os quais não permitem a sobrevivência de espécies sensíveis ao ácido. Portanto, o pH é um fator significativo no controle da viabilidade e multiplicação bacteriana no queijo (Hayaloglu, 2016). A proteólise também causa a redução do pH e aumento da acidez do queijo, pela formação de grupos iônicos (De Jesus *et al.*, 2020).

A eficácia dos ácidos orgânicos como inibidores do crescimento microbiano depende da quantidade de ácido não dissociado presente e, portanto, da constante de dissociação ( $\text{pK}_a$ ) e do pH. Os principais ácidos encontrados no queijo são propiônico, acético e láctico, e estes têm valores de  $\text{pK}_a$  de 4,87, 4,75 e 3,08, respectivamente, de modo que na mesma concentração o

ácido láctico é o menos inibidor e o propiônico o mais eficaz. No entanto, a concentração do ácido também é importante e, no queijo, o lactato está invariavelmente presente na coalhada em concentrações muito maiores do que as dos outros dois ácidos. O pH de muitos queijos macios aumenta caracteristicamente durante a maturação, particularmente na superfície, e isso reduzirá as propriedades inibitórias da superfície. O ácido propiônico é muito eficaz na inibição do crescimento de fungos (Hayaloglu, 2016).

Em geral, os patógenos não se multiplicam ou se desenvolvem lentamente, em valores de pH abaixo de 4,6; mas são poucas exceções. Muitos patógenos podem sobreviver em alimentos em valores de pH abaixo de seu crescimento mínimo. Normalmente, pH pode interagir com outros parâmetros no alimento, tais como  $a_w$ , sal, temperatura, potencial redox e conservantes, para inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e outros organismos (Preetha; Narayanan, 2020).

#### 5.2.4. Potencial Redox

O potencial redox ou oxidação - redução (Eh) é uma medida da capacidade de um sistema químico / bioquímico para oxidar (perder elétrons) ou reduzir (ganhar elétrons). O Eh é geralmente medido com o auxílio de um eletrodo de platina acoplado a um eletrodo de referência de calomelano e é expresso em mV. Também pode ser estimado usando indicadores corantes que mudam de cor em diferentes potenciais redox. Um valor positivo indica um estado oxidado enquanto um valor negativo indica um estado reduzido (Preetha; Narayanan, 2020).

O Eh do leite é cerca de +150 mV, enquanto o do queijo é de cerca de -250 mV. A redução no Eh do queijo está diretamente relacionada à fermentação da lactose para ácido láctico pelas culturas iniciadoras e a redução de pequenas quantidades de oxigênio no leite para água. O mecanismo exato pelo qual o Eh é reduzido não é claro, mas provavelmente está ligado à redução da pequena quantidade de  $O_2$  no leite para  $H_2O$  (ou  $H_2O_2$  e depois para  $H_2O$ ) e a redução de  $NAD^+$  para NADH (Beresford *et al.*, 2001; Hayaloglu, 2016).

A multiplicação de microrganismos aeróbicos leva à redução do valor Eh dos alimentos porque eles consomem oxigênio e produzem produtos de redução metabólica, como o sulfeto de hidrogênio e dióxido de carbono. Quando o Eh do alimento atinge valores negativos devido à multiplicação de microrganismos aeróbicos, inicia-se então o crescimento de

anaeróbios presentes. A taxa em que o valor Eh de um alimento muda devido ao crescimento microbiano depende de sua capacidade de tamponamento redox, ou seja, sua resistência a mudança no potencial redox. A capacidade de tampão, por sua vez, é determinada pela concentração e a proporção em que os compostos oxidantes e redutores estão presentes no alimento (Preetha; Narayanan, 2020).

Como consequência destas reações, o interior do queijo é essencialmente um sistema anaeróbio, que só pode suportar o crescimento de microrganismos anaeróbicos facultativos ou obrigatórios. Com a multiplicação de diferentes culturas bacterianas, o Eh pode variar de cerca de +300 mV para aeróbios a -400 mV para anaeróbios. O Eh é um dos principais fatores na determinação dos tipos de microrganismos que se multiplicam no queijo, e as bactérias que se desenvolvem na superfície do queijo são predominantemente aeróbias obrigatórias (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2017).

#### 5.2.5. Atividade de água

Todos os microrganismos requerem água para o crescimento e uma das maneiras mais eficazes de controlar seu crescimento é reduzir a água disponível através da desidratação ou adição de algum componente solúvel em água, como açúcar ou sal. Um aumento no teor de umidade do queijo aumenta a suscetibilidade à deterioração (Beresford *et al.*, 2001).

O conceito de atividade de água ( $a_w$ ), desenvolvido por Scott em 1957, forneceu uma base para uma compreensão crescente de relações microrganismo / água nos alimentos. A  $a_w$  é diretamente proporcional ao teor de umidade do queijo e inversamente à concentração de NaCl e outros compostos de baixo peso molecular. A  $a_w$  é um conceito termodinâmico definido como a razão entre a pressão de vapor da água presente em um sistema ( $p$ ) e aquele de água pura ( $p_0$ ) na mesma temperatura (Preetha; Narayanan, 2020).

$$a_w = p/p_0$$

Durante os primeiros estágios da fabricação de queijo,  $a_w$  é de cerca de 0,99, ideal para o crescimento e a atividade da cultura iniciante. Após a drenagem do soro de leite, salga e durante a maturação, os níveis de  $a_w$  (0,917 - 0,988) são significativamente menores (Beresford *et al.*, 2001).

A maioria das bactérias, incluindo as patogênicas, requer uma  $a_w$  mínima de 0,92 para multiplicação. As leveduras se multiplicam em valores mais baixos de  $a_w$  do que bactérias e os fungos filamentosos em um valor ainda mais baixo. O limite para a maioria das leveduras é  $\sim 0,83$ , mas levedura osmofílica cresce a valores  $a_w < 0,60$ , enquanto os bolores têm um menor limite de  $a_w$  de  $\sim 0,75$ . O crescimento de microrganismos em baixa  $a_w$  é caracterizado por um longo período da fase lag, uma taxa lenta de crescimento (ou seja, longo tempo de geração) e uma redução no número máximo de células produzidas (Hayaloglu, 2016; Preetha; Narayanan, 2020).

A redução da umidade ocorre durante o processo de fabricação de todos os queijos; quanto menor a umidade, mais duro é o queijo, e maior o tempo de conservação da sua qualidade. O queijo, a menos que seja embalado a vácuo, perde umidade por evaporação durante a maturação. As proteínas no queijo são hidratadas e esta água "ligada" é não disponível para crescimento bacteriano. A hidrólise de cada peptídeo ou ligação éster requer uma molécula de água. Uma vez que ocorre proteólise significativa em queijo, o nível de água livre diminuirá durante a maturação. Quaisquer componentes dissolvidos na umidade do queijo, por exemplo, aminoácidos, peptídeos, ácidos graxos de cadeia curta, sal e ácidos orgânicos (lactato, acetato e propionato) reduzem sua pressão de vapor e, portanto, sua  $a_w$ . Destes, os mais importantes na prática são o sal e o lactato (Hayaloglu, 2016).

O controle da perda de umidade do queijo é realizado pelo aumento da umidade relativa na sala de maturação ou embalando-se o queijo em cera ou plástico. Pode haver variação nos valores de  $a_w$  em diferentes locais no queijo; para queijos duro e semiduro maturados em salmoura os valores de  $a_w$  são geralmente mais altos no centro; nos casos de queijo cheddar, que é salgado a seco na massa e embalado a vácuo, nenhuma perda de umidade e nenhuma mudança na  $a_w$  ocorre, uma vez que o sal é uniformemente distribuído no queijo (Beresford *et al.*, 2001).

#### 5.2.6. Concentração de sal

Além da influência direta no sabor do queijo, a salga desempenha outros papéis importantes durante os processos de fabricação e maturação. Para a maioria dos queijos, a adição de sal promove a expulsão do soro e auxilia na formação de crosta superficial permitindo o surgimento das características desejadas. O teor de sal no queijo também é crítico do ponto de vista microbiológico, pois a adição de sal restringe a multiplicação de bactérias indesejadas na

cura da coalhada, além de contribuir para o controle da sobrevivência e o metabolismo de bactérias desejáveis, como as BAL, bem como organismos secundários que possam crescer e criar sabores alterados durante o armazenamento prolongado (McMahon *et al.*, 2014).

Os métodos mais comuns de salga no queijo são: no leite, na massa, em salmoura e a seco. Nos queijos salgados em salmoura, a concentração de sal é influenciada diretamente pelo tamanho do queijo, pela concentração de sal e temperatura da salmoura, além do período de tempo em que são imersos. A salmoura normalmente usada contém ~ 20 % NaCl, pH de ~ 5,2 (ajustado com ácido láctico) e um conteúdo de  $\text{Ca}^{+2}$  de 0,2 % (ajustado com  $\text{CaCl}_2$ ). O pH e a concentração de  $\text{Ca}^{+2}$  na salmoura simulam os níveis no queijo, prevenindo, dessa maneira, o efluxo de lactato e  $\text{Ca}^{+2}$  (Perry, 2004; Paula *et al.*, 2009; Fox *et al.*, 2017).

Na salga a seco, quando o sal é distribuído nas superfícies dos pedaços da coalhada, parte do sal se dissolve na umidade da superfície, criando uma salmoura altamente concentrada. O sal (NaCl) dessa camada de salmoura concentrada se difunde nos pedaços da coalhada, iniciando um contra fluxo de umidade (soro) da coalhada para a superfície. Conforme a umidade atinge a superfície, ela aumenta o volume de salmoura, mas simultaneamente a dilui. À medida que a quantidade de salmoura aumenta, parte dela é drenada ou permanece na superfície da coalhada até ser fisicamente expelida durante a prensagem subsequente (Guinee, 2004; Fox *et al.*, 2017).

O uso de NaCl para prevenir a deterioração microbiana dos alimentos é provavelmente tão antigo quanto a produção dos alimentos. A concentração necessária depende da natureza do alimento, seu pH e teor de umidade, mas, geralmente, menos de 10 % é suficiente. O sal e  $a_w$  estão muito inter-relacionados e a inibição de bactérias ocorre principalmente pelo efeito do sal na redução de  $a_w$ . Um valor de  $a_w < 0,92$ , necessário para prevenir o crescimento bacteriano, é equivalente a uma concentração de sal de ~ 12 %. No queijo, a concentração de sal varia de 0,7 a 7 %. O tipo de íon também é importante, por exemplo,  $\text{Na}^+$  é um inibidor muito mais eficaz do que  $\text{K}^+$ . A concentração de sal dissolvido é que determina o efeito inibitório do sal, e não a concentração real de sal adicionado por salga a seco ou na salmoura do queijo (Beresford *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 2017).

O sal é um dos principais determinantes da atividade da água e, portanto, exerce controle sobre o crescimento microbiano, limitando a fermentação do ácido láctico após um pico ideal

alcançado e suprimindo o crescimento de microrganismos deteriorantes. O NaCl também cria mudanças físicas nas proteínas que influenciam na atividade enzimática e consequente alterações bioquímicas durante a maturação do queijo e o desenvolvimento simultâneo do sabor e aroma desejados. O sal, juntamente com o pH e o nível de cálcio, tem um grande efeito na extensão da hidratação da para-caseína, ou agregação, que por sua vez afeta a capacidade de ligação de água da matriz de caseína, sua tendência à sinérese, suas características reológicas, que influenciam na textura do queijo (Guinee, 2004; Paula *et al.*, 2009; Amico e Donnelly, 2017).

#### 5.2.7. Adição de nitrato

Nitrato ( $\text{NO}_3$ ) é adicionado ao leite, como salitre nitrato de potássio ( $\text{KNO}_3$ ) ou nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_3$ ), para a produção de alguns queijos especialmente nas variedades de tipo holandês, como Edam e Gouda, para impedir a produção de gás tardio devido a multiplicação de *Clostridium tyrobutyricum*. Este microrganismo fermenta o lactato em butirato,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ . O  $\text{H}_2$  e o  $\text{CO}_2$  são responsáveis pelas olhaduras presentes no queijo, enquanto o butirato é responsável pela formação de sabor desagradável. Nestes queijos, a taxa de migração de NaCl é relativamente lenta e a equalização da concentração do sal em todo o queijo pode levar várias semanas. Além disso, o teor de umidade é alto. Portanto, a inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes como *C. tyrobutyricum* é necessário antes de alcançar o equilíbrio de sal, e o nitrato cumpre essa função (Beresford *et al.*, 2001, Perry, 2004; Hayaloglu, 2016; Fox *et al.*, 2017).

Durante a precipitação, o nitrato é reduzido a nitrito ( $\text{NO}_2$ ), o verdadeiro inibidor, pela xantina oxidase presente no leite ou na massa coagulada. O nitrito não afeta o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico, mas inibem bactérias propiônicas essenciais para a formação de olhaduras em queijo Emmental e, portanto, não é adequado para o controle de *C. tyrobutyricum* em queijo onde o crescimento dessas bactérias é necessário. Como  $\text{NO}_2$  atua na prevenção do crescimento microbiano não está claro. O nitrito pode reagir com aminoácidos aromáticos no queijo e produzir nitrosaminas, muitas dos quais são cancerígenas. A reação é dependente do pH, ocorrendo de preferência inicialmente na faixa de 2 - 4,5. Os queijos têm um pH mais alto e isso retarda essa reação. No momento em que o queijo está pronto para o consumo, os níveis de nitrito são geralmente bem abaixo do permitido (Beresford *et al.*, 2001; Hayaloglu, 2016; Fox *et al.*, 2017).

#### 5.2.8. Temperatura de fabricação e maturação

Geralmente, a temperatura ótima para a multiplicação de bactérias é de ~ 35 °C para mesófilas e ~ 55 °C para termófilas. No entanto, os iniciadores termofílicos têm uma temperatura ótima de ~ 42 °C e em temperaturas abaixo do ideal, a multiplicação é retardada (Fox *et al.*, 2017).

A temperatura de cozimento varia para diferentes tipos de queijos e o tempo em que a temperatura é mantida em valores mais altos afetará a sobrevivência de diferentes microrganismos. A massa do queijo Emmental é aquecida a 54 °C durante a fabricação e a temperatura é mantida acima de 40 °C por um tempo considerável, enquanto que a massa do Cheddar é cozida a 39 °C e queijos de pasta mole são mantidos a ~ 35 °C. Outros queijos cozidos em altas temperaturas incluem Comte, Parmigiano, Reggiano e Grana. Pouca produção de ácido ocorre em temperatura máxima de cozimento a 54 °C mas os iniciadores termofílicos resistem à temperatura e começam a produzir ácido quando a temperatura cai abaixo de 48 °C. O queijo Emmental tradicional é feito de leite cru e por causa da temperatura relativamente alta de maturação deste queijo (18–24 °C por várias semanas para promover a multiplicação de bactérias de ácido propiônico), deve ser dada atenção à qualidade microbiana do leite utilizado (Fox *et al.*, 2017).

A temperatura de maturação do queijo também é importante e é influenciada por duas forças opostas. Por um lado, a necessidade de controlar a multiplicação de bactérias com potencial de deterioração e bactérias patogênicas e, por outro lado, a necessidade de promover as reações de maturação e a multiplicação da microbiota secundária. O aumento da temperatura de maturação é provavelmente a forma mais simples e econômica de acelerar este processo em queijos. Temperaturas mais altas promovem uma maturação mais rápida pelos microrganismos iniciadores e não iniciadores, mas também permitem a proliferação de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Hayaloglu, 2016; Fox *et al.*, 2017).

Estudos mostram que o processo de maturação de queijos é mais eficiente com emprego de temperatura ambiente do que em temperatura de refrigeração (Dores *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014). Quanto maior a temperatura de maturação, maior a perda de umidade no queijo levando a uma diminuição de *a<sub>w</sub>* e aumento da concentração de sólidos, o que aumenta o conteúdo de cloreto (Dores *et al.*, 2013).

### 5.3. Produção de queijos Minas artesanais

Desde maio de 2008, o “modo de fazer” do queijo Minas artesanal foi considerado patrimônio cultural pelo Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional – IPHAN (IPHAN, 2014). Entende-se por queijo Minas artesanal, o queijo que apresente consistência firme, cor e sabor próprios, massa uniforme, isenta de corantes e conservantes, com ou sem olhaduras mecânicas, confeccionado a partir do leite integral de vaca fresco e cru, retirado e beneficiado na propriedade de origem (Minas Gerais, 2011).

O queijo Minas artesanal é um produto tipicamente mineiro que vem ganhando importância crescente no Brasil. Sua principal característica está relacionada aos atributos sensoriais do produto que são conferidos pelos microrganismos originais que fazem parte da microbiota natural do leite e promovem diferentes características de sabor, textura e aroma no queijo. A microbiota presente nos queijos varia de acordo com o clima, a alimentação do rebanho e a forma de processamento do produto e, conseqüentemente, a peculiaridade de cada um dos queijos artesanais de Minas (Monteiro *et al.*, 2018; Penna *et al.*, 2021).

Embora a qualidade microbiológica dos queijos artesanais não dependa exclusivamente da pasteurização do leite, esta é, sem dúvida, a principal controvérsia em torno da segurança desses produtos. A pasteurização garante a segurança dos queijos porque elimina (ou reduz significativamente) todas as bactérias potencialmente patogênicas que possam estar presentes no leite cru. Por outro lado, reduz significativamente a presença de microrganismos naturais presentes no leite (microbiota benéfica), que estão associados às características e sabor típicos dos queijos artesanais elaborados com leite cru, o qual também pode ser considerado uma fonte de microrganismos benéficos (Penna *et al.*, 2021).

A adição de culturas lácticas naturais, como o pingo ou soro-fermento é obrigatório para elaboração do queijo Minas artesanal de propriedades cadastradas pelo IMA (Minas Gerais, 2012). O pingo é oriundo da dessora do queijo produzido no lote do dia anterior, assim, se constitui no produto resultante da ação de microbiotas diversificadas em interação com constituintes do soro lácteo. Alguns produtores incrementam o pingo com sal para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis, evitando, por exemplo, o estufamento precoce dos queijos. A utilização do pingo é voltada para promover a maturação do queijo de forma a



leite garantir melhor qualidade sensorial e, até mesmo, microbiológica, pois tem-se no pingote a expectativa de inocular bactérias desejáveis e que forneçam uma microbiota desejável (Figueiredo, 2018).

Pelo uso de leite cru para a preparação do queijo, a legislação estadual, assim como a legislação federal, exige a obrigatoriedade da utilização da etapa de maturação, que tem seu tempo definido após pesquisas técnico-científicas comprovarem a eficácia num período inferior a 60 (sessenta) dias, sem prejuízo da qualidade e inocuidade dos produtos (IMA, 2013; BRASIL, 2017).

A legislação sobre o tempo de maturação do queijo Minas artesanal já foi bastante controversa. Em 1952, no antigo RIISPOA (Decreto 30.691, de 29/03/1952), a legislação federal previa o uso do leite cru para a produção de queijo Minas (Art. 928), com a exigência inicial de no mínimo oito dias de maturação, que foi alterada para um mínimo de dez dias, em 1962, pelo Decreto nº 1.255 (Brasil, 1962). Mas, em 1996, a Portaria 146 (MAPA, 1996), que regulamenta a identidade e qualidade dos produtos lácteos, indicou maturação de queijo produzido com leite cru a uma temperatura superior aos 5 °C, durante um tempo não inferior a 60 dias. Esse regulamento foi confirmado pela Resolução 07, de 28 de novembro de 2000 (MAPA, 2000), que estabeleceu os requisitos específicos de instalações e de funcionamento das Queijarias, da higiene de produção do queijo Minas do Serro (média umidade), Queijo Minas Araxá, e do Queijo Minas Canastra (baixa umidade). Somente em 2011, que o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa 57 (MAPA, 2011), permitindo que os queijos artesanais tradicionalmente elaborados a partir de leite cru sejam maturados por um período inferior a 60 (sessenta) dias, quando estudos técnico-científicos comprovarem que a redução do período de maturação não compromete a qualidade e a inocuidade do produto (Ferreira, 2013).

Após essa determinação, diversos estudos foram realizados para observar o tempo mínimo de maturação nas diferentes regiões de Minas. Martins *et al.* (2014), em estudo com queijo Minas de oito produtores da região do Serro em Minas Gerais, Brasil, concluíram que os efeitos da maturação à temperatura ambiente em relação aos parâmetros físico-químicos do queijo influenciaram diretamente o comportamento microbiano, causando uma redução na contagem de contaminantes. Assim, em temperatura ambiente, 17 dias foi o tempo mínimo de maturação para que os queijos cheguem aos padrões microbiológicos exigidos por lei. Por sua

vez, os queijos maturados sob refrigeração só atingiram tais padrões em 33 dias para queijos produzidos na estação seca e 63 dias para os produzidos na estação chuvosa.

O queijo Canastra é tradicionalmente consumido após diferentes períodos de maturação, sendo priorizados pelos consumidores os queijos com menos de oito dias de fabricação. Um estudo do tempo de maturação do queijo em temperatura ambiente e sob refrigeração em dois períodos do ano (chuvoso e seco), avaliando-se a modulação de variáveis físico-químicas e microbiológicas, com ênfase na microbiota patogênica regulamentada por lei, foi realizado. A maturação em temperatura ambiente foi decisiva para redução da microbiota patogênica para níveis permitidos em 22 dias, nos dois períodos analisados, ao passo que, sob refrigeração, os níveis de *Staphylococcus aureus* (espécie limitante) permitidos somente seriam atingidos após 64 dias. E nenhuma mudança nos valores de aw em queijos mantidos sob refrigeração durante a maturação foi verificada (Dores *et al.*, 2013).

Em queijo Minas artesanal da região de Araxá, produzido e maturado por até 57 dias, durante a época chuvosa e seca, foi concluído que a maturação por pelo menos 14 dias foi eficiente para reduzir a contagem de todos os microrganismos estudados. A maturação influenciou ( $p < 0,05$ ) os teores percentuais de umidade, proteína, gordura, gordura no extrato seco e extrato seco total, bem como pH e acidez titulável, independentemente da época de produção. Além disso, foi observado que o uso de matérias-primas, o controle sanitário dos rebanhos e a adoção de boas práticas de produção são extremamente importantes para a obtenção de um queijo adequado ao consumo (Sales, 2015).

A maturação do queijo Minas artesanal é um fenômeno complexo, que envolve reações bioquímicas decorrentes da interação dos microrganismos presentes e transformações físico-químicas consequentes desta atividade microbiana e da ação climática sobre os queijos. Assim, a maturação tende a reduzir a umidade, a atividade de água e aumentar a acidez dos queijos. Este fenômeno resulta ainda na liberação de aminoácidos, aminas, ácidos graxos e demais produtos decorrentes da proteólise e da lipólise, além de contribuir para a redução de grupos microbianos patogênicos, controlando assim, riscos referentes ao consumo deste tipo de alimento, e enriquecendo o sabor deste queijo. No entanto, a maturação não pode ser colocada como etapa para garantir eliminação de patógenos, unicamente, devendo ser precedida por controle de zoonoses do rebanho leiteiro, boas práticas agropecuárias, ordenha higiênica e boas práticas de fabricação dos queijos (Figueiredo, 2018).

#### 5.4. Considerações finais

O processo de maturação do queijo é uma etapa importante para o controle de microrganismos patogênicos e prevenção de crescimento de microrganismos deteriorantes, além de gerar sabor e aromas característicos.

A maturação é um fenômeno complexo, que envolve reações bioquímicas decorrentes da interação de microrganismos com o queijo e transformações físico-químicas consequentes desta atividade microbiana e da ação climática sobre os queijos. No caso do queijo Minas artesanal, estudos identificam que a maturação em temperatura ambiente é mais eficiente para inibir microrganismos indesejáveis do que a maturação sob refrigeração.

A estabilidade microbiana do queijo é alcançada pela utilização de uma combinação de barreiras que são importantes nas diferentes etapas do processo de maturação, levando a um produto final adequado ao consumo. Os fatores que controlam o crescimento de microrganismos no queijo incluem: concentração de sal, potencial de redução de oxidação, pH, a presença de NO<sub>3</sub>, temperatura de maturação e a produção de bacteriocinas por algumas cepas iniciais e, finalmente, a redução da umidade e da atividade de água.

#### 5.5. Referências

AMICO, D.J. D.; DONNELLY, C. W. **Growth and Survival of Microbial Pathogens in Cheese.** In: **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology.** New York: Elsevier. 2017. Cap. 22, p. 573-594.

BERESFORD, T.P.; FITZSIMONS N.A.; BRENNAN, N.L., COGAN, T.M. **Recent advances in cheese microbiology.** *International Dairy Journal*, v. 11, n. 4/7, p. 259-274, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00056-5).

BRASIL. Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962. Altera o Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, que aprovou o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. **Diário Oficial da União:** Brasília, DF, 04 jul. 1962.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União:** seção 1, Brasília, DF, ed. 62, p. 3, 30 mai. 2017.

DE JESUS, J.C.; SILVA, G.J.; GONÇALVES, B.R.F.; SOUZA, M.R., SANTOS, L.S.; FERRÃO, S.P.B. **Quick Identification of the Time of Maturation of Artisanal Minas Cheese by FTIR-ATR Spectroscopy and Multivariate Techniques.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 31, n. 10, p. 2000-2011, 2020.

DORES, M. T.; NOBREGA, J.E.; FERREIRA, C.L.L.F. **Room temperature aging to guarantee microbiological safety of brazilian artisan Canastra cheese.** *Food Science and Technology*, v. 33, n. 1, p. 180-185, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612013005000003>

FERREIRA, R.G.P. **As leis do queijo.** Piracema/MG, set. 2013. Artigos. Disponível em: <https://cienciadoleite.com.br/noticia/3147/as-leis-do-queijo#>. Acesso em: 17 fev. 2022.

FIGUEIREDO, R. C. **Perfil socioeconômico de agricultores familiares e caracterização de queijo Minas artesanal de Serra do Salitre (MG) em diferentes períodos de maturação e épocas do ano.** Orientador: Mônica Maria Oliveira Pinho Cerqueira. 2018. 119 p. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P.L. H. **Fundamentals of Cheese Science.** Second edition. New York: Springer, 2017. 803 p.

GUINEE, T.P. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*. v. 57, n. 2/3, 2004. <https://doi-org.ez27.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1471-0307.2004.00145.x>

HAYALOGLU, A. A. **Cheese: Microbiology of Cheese.** Reference Module in Food Science.2016. Doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00675-2

IMA. Instituto Mineiro de Agropecuária. **Portaria nº 1305, de 30 de abril de 2013.** Estabelece diretrizes para produção do Queijo Minas Artesanal. Belo Horizonte, 2013.

IPHAN. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. **Modo artesanal de fazer queijo de Minas: Serro, Serra da Canastra e Serra do Salitre (Alto Paranaíba).** Brasília, DF: 2014. 140p.

KHATTAB, A.R.; GUIRGUIS, H.A.; TAWFIK, S.M.; FARAG, M.A. **Cheese ripening: A review on modern technologies towards flavor enhancement, process acceleration and improved quality assessment.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 88, p. 343–360, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.009>

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 146, de 7 de março de 1996.** Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos em anexo. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1996.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Resolução nº 7, de 28 de novembro de 2000.** Oficializa os Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias, para seu Relacionamento junto ao Serviço de Inspeção Federal, conforme consta dos Anexos desta Resolução. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2000.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 57, de 15 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre o período de maturação dos queijos artesanais

tradicionalmente elaborados a partir de leite cru. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2011.

MARTINS, J.M. et al. **Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese.** *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 46, n.1, p. 219-230, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131003>

MCMAHON, D. J.; OBERG, C. J.; DRAKE, M. A.; FARKYE, N.; MOYES, L. V.; ARNOLD, M. R., et al. **Effect of sodium, potassium, magnesium, and calcium salt cations on pH, proteolysis, organic acids, and microbial populations during storage of full-fat Cheddar cheese.** *Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 4780-4798, 2014. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-8071>

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Lei n° 19.492, de 13 de janeiro de 2011.** Altera dispositivos da Lei n° 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do Queijo Minas Artesanal e dá outras providências. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2011.

MINAS GERAIS. Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais. **Lei n° 23.157, de 18 de dezembro de 2012.** Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos artesanais de Minas Gerais. Belo Horizonte: Assembleia Legislativa do Estado de Minas Gerais, 2012.

MONTEIRO, R. P; DA MATTA, V. M. (Ed.) **Queijo Minas Artesanal: Valorizando a Agroindústria Familiar.** Brasília, DF: Embrapa; Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018. 102 p.

OLIVEIRA, L. G.; SILVA, G. O.; BARBOSA, C.D.; SANT'ANNA, F. M.; CASTRO, R. D.; FIGUEIREDO, N. C., NUNES, A. C.; LAGE, A. P. e SOUZA, M. R. **Lactic acid bacteria isolated from Brazilian Minas artisanal cheeses and their in vitro antagonisms against *Mycobacterium bovis* BCG.** *International Journal of Dairy Technology*, v. 70, p. 1-8, 2018. DOI: 10.1111/1471-0307.12540

PAULA, J.C.J; CARVALHO, A.F.; FURTADO, M.M. **Princípios básicos de fabricação de queijo: do histórico à salga.** *Revista Instituto Laticínios “Cândido Tostes”*, v. 64, n. 367/368, p. 19-25, 2009.

PREETHA, S.S.; NARAYANAN, R. **Factors Influencing the Development of Microbes in Food.** *Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities*, v. 7, n. 3, p. 57-77, 2020. <https://doi.org/10.34293/sijash.v7i3.473>

PELAEZ, C.; REQUENA, T. **Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem.** *International Dairy Journal*, v. 15, p. 831-844, 2005. DOI:10.1016/j.idairyj.2004.12.001

PENNA, A.L.B.; GIGANTE, M.L.; TODOROV, S.D. **Artisanal Brazilian Cheeses—History, Marketing, Technological and Microbiological Aspects.** *Foods*, v. 10, 1562, 2021. <https://doi.org/10.3390/foods10071562>

PERRY, K.S.P. **Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos.** *Quimica Nova*, v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.

SABOYA, L.V. **Lise de *Lactococcus* sp. e proteólise em queijos fabricados com ultrafiltração e microfiltração.** Orientador: Luiz Eduardo Gutierrez. 2002. 218 f. Dissertação (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.SALES, G. **Caracterização microbiológica e físico-química de queijo Minas artesanal da microrregião de Araxá - MG durante a maturação em diferentes épocas do ano.** Orientador: Marcelo Resende de Souza. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015

SILVA, G. O.; CASTRO, R. D.; OLIVEIRA, L. G.; SANT'ANNA, F. M.; BARBOSA, C. D.; SANDES, S. H. C.; SILVA, R. S.; RESENDE, M. F. S.; LANA, A. M. Q.; NUNES, A. C.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; SOUZA, M. R. **Viability of *Staphylococcus aureus* and expression of its toxins (SEC and TSST-1) in cheeses using *Lactobacillus rhamnosus* D1 or *Weissella paramesenteroides* GIR16L4 or both as starter cultures.** *Journal of Dairy Science*, v.103, p. 4100–4108, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16037>