

GARDÊNIA MÁRCIA SILVA CAMPOS MATA

**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp. E *Listeria*  
sp. E AVALIAÇÃO MICROBIANA E FÍSICO-QUÍMICA EM QUEIJO MINAS  
ARTESANAL**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2009

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

M425c  
2009

Mata, Gardênia Márcia Silva Campos, 1983-  
Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella* sp.  
e *Listeria* sp. e avaliação microbiana e físico-química em  
queijo Minas artesanal / Gardênia Márcia Silva Campos  
Mata. – Viçosa, MG, 2009.  
xix, 89f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Cristina Dantas Vanetti.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa  
Referências bibliográficas: f. 72-89.

1. Queijo-de-Minas - Microbiologia. 2. Queijo-de-Minas  
- Análise. 3. Derivados do leite - Processamento. 4. Ali-  
mentos - Medidas de segurança. 5. Alimentos - Micro-  
biologia. 6. Queijarias - Serro (MG). I. Universidade  
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 637.35

GARDÊNIA MÁRCIA SILVA CAMPOS MATA

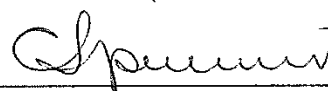
**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA PESQUISA DE *Salmonella* sp. E *Listeria* sp. E AVALIAÇÃO MICROBIANA E FÍSICO-QUÍMICA EM QUEIJO MINAS ARTESANAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título *Magister Scientiae*.

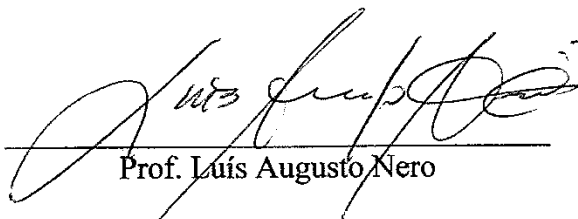
APROVADA: 16 de Janeiro de 2009



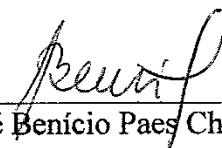
Prof. Antônio Fernandes de Carvalho  
(Co-orientador)



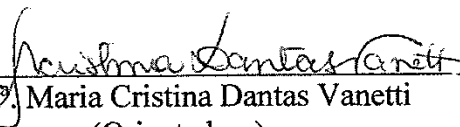
Dr.ª Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto  
(Co-orientadora)



Prof. Luís Augusto Nero



Prof. José Benício Paes Chaves



Prof.ª Maria Cristina Dantas Vanetti  
(Orientadora)

À minha família por todo apoio e incentivo.

**DEDICO**

“A vida é cheia de términos e novos começos.  
(...) O que para uns é uma montanha intransponível,  
para outros um desafio a vencer” (...).

(Autor desconhecido)

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por iluminar os meus caminhos;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela alta qualidade de ensino;

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de mestrado e apoio financeiro;

À Prof<sup>ª</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti pela orientação, respeito e ensinamentos transmitidos que muito contribuíram para minha formação profissional;

À Dr<sup>ª</sup>. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e ao Prof. Antônio Fernandes de Carvalho pela co-orientação, presteza e conhecimentos repassados;

Aos professores Luís Augusto Nero e José Benício Paes Chaves pela participação na defesa;

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho;

Ao amigo Evandro Martins pela participação efetiva na realização dos experimentos;

Ao Maximiliano Soares Pinto e ao Prof. Antônio Fernandes de Carvalho pela grande contribuição na viabilização de parte do experimento;

Ao Natan de Jesus Pimentel Filho pela amizade e grande ajuda durante a viagem à Região do Serro, Minas Gerais, para a coleta das amostras;

À Edna, funcionária da EMATER e sua filha Letícia, pela gentileza e disposição durante as visitas às propriedades produtoras de queijo na região do Serro, Minas Gerais;

Aos senhores Jorge, Beto, Adelmo e aos demais produtores de queijo Minas artesanal da região do Serro, Minas Gerais, pelo acolhimento nas suas propriedades;

À Solimar Gonçalves Machado pela grande ajuda na realização dos experimentos no final do trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Daise Aparecida Rossi da Universidade Federal de Uberlândia pela simpatia e gentileza na realização das análises de PCR;

Aos Professores Eduardo Mizubutti, Paulo Roberto Cecon, Sebastião Martins Filho e aos estudantes de mestrado Márcio Pupin e José Maria Rodrigues da Luz pela ajuda nas análises estatísticas;

À minha família, José Maria Campos Mata (pai), Maria Flaviana da Silva Mata (mãe), Jackson Flávio Silva Campos Mata (irmão), Letícia Maria Silva Campos Mata (irmã) e Ana Conceição Campos (avó) pelo amor, apoio e estímulo permanente;

Aos meus avós, primos e tios, em especial, ao meu padrinho Antônio Jesus de Campos Mata por ser um grande incentivador ao seguimento da carreira acadêmica;

Às minhas eternas amigas Hudsara A. de Almeida Paula, Monise Viana Abranches, Bianka Caliman Salvador, Kamila Araújo R. Fontes Moreira, Ceres Mattos Della Lucia e Juliana Maciel de Souza Araújo pelo ombro amigo e momentos de descontração que tornaram esse período da minha vida mais alegre e divertido;

Ao Thiago Monteiro dos Santos pela amizade, incentivo e grande auxílio durante a realização das disciplinas da pós-graduação;

Às minhas companheiras de laboratório Adriana dos Santos Leandro, Adriana dos Reis Ponce, Carolina dos Santos Fernandes da Silva, Wanessa Altimiras Costa, Simone Albino Paes, Maria Emilene Martino Campos, Cláudia Vieira Prudêncio e Jackline Freitas Brilhante de São José pela ajuda, troca de experiências e convívio harmonioso.

Aos demais amigos da graduação e pós-graduação;

À todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse trabalho.

Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

GARDÊNIA MÁRCIA SILVA CAMPOS MATA, filha de José Maria Campos Mata e Maria Flaviana da Silva Mata, nasceu na cidade de Viçosa-MG, em 25 de janeiro de 1983.

Em 2002 iniciou o curso de Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, na cidade de Viçosa, Minas Gerais, tornando-se bacharel em 17 de março de 2007.

Em 26 de março do mesmo ano, iniciou o curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, nível de mestrado, orientada pela Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti, na linha de pesquisa qualidade microbiológica de alimentos.

## SUMÁRIO

|   |       |
|---|-------|
| LISTA DE FIGURAS.....   | x     |
| LISTA DE TABELAS.....   | xii   |
| LISTA DE QUADROS.....   | xv    |
| RESUMO.....   | xvi   |
| ABSTRACT.....   | xviii |
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 1     |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....   | 3     |
| 2.1. Importância do queijo Minas artesanal.....   | 3     |
| 2.2. Segurança microbiológica de queijos produzidos a partir do leite cru.....  | 5     |
| 2.3. Método convencional <i>versus</i> métodos rápidos para pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em alimentos..... | 8     |
| 2.4. Parâmetros de avaliação de métodos microbiológicos de pesquisa de patógenos em alimentos.....                                    | 17    |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 21    |
| 3.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em queijo Minas artesanal.....   | 21    |
| 3.1.1. Matéria-prima.....   | 21    |
| 3.1.2. Detecção de <i>Salmonella</i> sp. e de <i>Listeria</i> sp. por técnicas convencionais de cultivo.....                          | 23    |
| 3.1.3. Detecção de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. por imunoanálise.....  | 25    |
| 3.1.4. Detecção de <i>L. innocua</i> por imunoanálise.....  | 25    |
| 3.1.5. Detecção de <i>Salmonella</i> sp. por PCR.....   | 26    |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1.6. Análise estatística.....   | 26        |
| <b>3.2. Características microbiológicas, físicas e físico-químicas do queijo Minas artesanal.....</b>   | <b>27</b> |
| 3.2.1. Matéria-prima.....   | 27        |
| 3.2.2. Contagem de bactérias lácticas.....  | 27        |
| 3.2.3. Enumeração de coliformes.....  | 28        |
| 3.2.4. Caracterização física do queijo Minas artesanal.....   | 28        |
| 3.2.5. Caracterização físico-química do queijo Minas artesanal.....   | 29        |
| <i>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</i> .....  | 29        |
| <i>Umidade e voláteis</i> .....   | 29        |
| <i>pH</i> .....   | 29        |
| <i>Acidez titulável</i> .....   | 30        |
| <i>Cloretos</i> .....   | 30        |
| 3.2.6. Análise estatística.....   | 31        |
| <b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>   | <b>33</b> |
| <b>4.1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em queijo Minas artesanal.....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1.1. Comparação de métodos de pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em queijo Minas artesanal.....  | 33        |
| 4.1.2. <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal proveniente de propriedades cadastradas no IMA.....                    | 40        |
| 4.1.3. <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades cadastradas e não cadastradas no IMA..... | 41        |
| 4.1.4. Sobrevivência de <i>L. innocua</i> em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas.....   | 43        |
| <b>4.2. Características microbiológicas, físicas e físico-químicas do queijo Minas artesanal.....</b>   | <b>44</b> |
| 4.2.1. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro.....   | 44        |
| 4.2.2. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA.....  | 48        |
| 4.2.3. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA.....  | 51        |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.4. Relação entre cadastramento das propriedades no IMA e<br>condição de maturação.....                      | 54 |
| 4.2.5. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente<br>contaminadas com <i>L. innocua</i> ..... | 63 |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 71 |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 72 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Mapa das quatro regiões produtoras de queijo artesanal, Minas Gerais, Brasil.....   | 4  |
| <b>Figura 2.</b> Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....           | 55 |
| <b>Figura 3.</b> Enumeração de coliformes totais (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....          | 56 |
| <b>Figura 4.</b> Enumeração de coliformes termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação..... | 57 |
| <b>Figura 5.</b> Valores de massa (g) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....                                 | 58 |
| <b>Figura 6.</b> Valores de volume (cm <sup>3</sup> ) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....                 | 58 |
| <b>Figura 7.</b> Valores de NaCl (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.....  | 59 |
| <b>Figura 8.</b> Valores de umidade e voláteis (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias   |    |

|  |    |
|--|----|
| (■) e após 60 dias (□) de maturação.....   | 60 |
| <b>Figura 9.</b> Valores de sólidos totais (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....  | 60 |
| <b>Figura 10.</b> Valores de atividade de água ( $A_w$ ) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....  | 61 |
| <b>Figura 11.</b> Valores de pH de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....   | 62 |
| <b>Figura 12.</b> Valores de acidez titulável (% AL = % de ácido láctico) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.....   | 63 |
| <b>Figura 13.</b> Evolução da contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G.....      | 64 |
| <b>Figura 14.</b> Evolução da umidade (%) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G.....                                     | 66 |
| <b>Figura 15.</b> Evolução dos sólidos totais (%) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G.....                             | 66 |
| <b>Figura 16.</b> Evolução de $A_w$ ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G.....   | 67 |
| <b>Figura 17.</b> Evolução da acidez titulável (% de AL = % de ácido láctico) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G..... | 68 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Características dos métodos de detecção de <i>Salmonella</i> sp. e <i>Listeria</i> sp.....  | 10 |
| <b>Tabela 2.</b> Resultados comparativos entre o método imunoenzimático VIDAS®-SLM e o método convencional oficial usados na pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal, produzidos na região do Serro, M.G.....                                | 34 |
| <b>Tabela 3.</b> Resultados comparativos entre o método imunoenzimático <i>Lateral Flow System</i> <sup>TM</sup> e o método convencional oficial usados na pesquisa de <i>Listeria</i> sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal, produzidos na região do Serro, M.G.....    | 38 |
| <b>Tabela 4.</b> Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> por métodos convencional e rápidos em unidades amostrais de queijo Minas artesanal proveniente de propriedades cadastradas e não cadastradas no IMA e avaliadas antes e após de 60 dias de maturação..... | 42 |
| <b>Tabela 5.</b> Sobrevivência de <i>L. innocua</i> em unidades amostrais de queijo Minas artesanal produzidas na região do Serro, M.G. durante 60 dias de maturação.....  | 43 |
| <b>Tabela 6.</b> Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G., analisadas com 37 e 69 dias de maturação.....          | 45 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 7.</b> Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G. analisadas com 37 e 69 dias de maturação.....   | 46 |
| <b>Tabela 8.</b> Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G.....  | 47 |
| <b>Tabela 9.</b> Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.....                           | 49 |
| <b>Tabela 10.</b> Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.....  | 50 |
| <b>Tabela 11.</b> Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA.....  | 51 |
| <b>Tabela 12.</b> Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.....                                | 52 |
| <b>Tabela 13.</b> Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.....  | 53 |
| <b>Tabela 14.</b> Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA.....  | 54 |
| <b>Tabela 15.</b> Enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log de NMP/g) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , produzidas na região do Serro, M.G.....                                | 65 |
| <b>Tabela 16.</b> Valores de contagem de bactérias lácticas e das análises físico-químicas com seus respectivos coeficientes de variação (CV em %) entre parêntesis ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com <i>L. innocua</i> , |    |

|  |    |
|--|----|
| produzidas na região do Serro, M.G.....  | 69 |
| <b>Tabela 17.</b> Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas..... | 70 |

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| <b>Quadro 1.</b> Ocorrência de <i>Salmonella</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> em queijos produzidos com leite cru em diversos países..... | 7  |
| <b>Quadro 2.</b> Relação entre o resultado de um teste diagnóstico e a presença do patógeno.....   | 17 |
| <b>Quadro 3.</b> Características e definições do teste diagnóstico.....  | 18 |
| <b>Quadro 4.</b> Conceitos relevantes na avaliação de métodos analíticos.....  | 19 |
| <b>Quadro 5.</b> Coeficiente <i>Kappa</i> .....  | 20 |
| <b>Quadro 6.</b> Características das unidades amostrais de queijo Minas artesanal analisadas no presente estudo.....                       | 22 |

## RESUMO

MATA, Gardênia Márcia Silva Campos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2009. **Comparação de métodos para pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. e avaliação microbiana e físico-química em queijo Minas artesanal.** Orientadora: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-orientadores: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e Antônio Fernandes de Carvalho.

Os objetivos desta pesquisa foram comparar o método convencional de detecção de *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Listeria* sp. com métodos rápidos para análise de queijo Minas artesanal e verificar a sobrevivência de *Listeria innocua* à maturação. Além disso, objetivou-se avaliar o produto quanto à contagem de bactérias lácticas, a contaminação por bactérias do grupo coliformes e determinar características físicas e físico-químicas. Foram coletadas 48 unidades amostrais de queijo Minas artesanal da região do Serro-M.G., dentre estas: 12 provenientes de seis produtores cujas propriedades eram cadastradas no Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA, que foram maturadas sob refrigeração na embalagem original à vácuo e avaliadas com 37 dias e 69 dias; 20 provenientes de duas propriedades não cadastradas no IMA e 16 provenientes de uma propriedade cadastrada, que foram maturadas à temperatura ambiente e analisadas antes e após 60 dias. Leite cru artificialmente contaminado com *L. innocua*, na concentração de 10 UFC/mL, foi utilizado para a fabricação de 15 unidades amostrais de queijo Minas artesanal. A sobrevivência dessa bactéria durante a maturação por 5, 15, 30, 45 e 60 dias foi verificada. As unidades amostrais artificialmente contaminadas ou não (n = 63) foram analisadas pelo método convencional, imunoanalítico VIDAS<sup>®</sup>-SLM e molecular PCR-BAX<sup>®</sup> quanto à presença de *Salmonella* sp. Unidades amostrais não contaminadas (n = 48) foram

avaliadas pelo método convencional e imunológico VIDAS<sup>®</sup>-LMO quanto à presença de *L. monocytogenes*, enquanto unidades amostrais artificialmente contaminadas (n = 15) foram analisadas pelo método convencional e imunológico *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> quanto à presença de *Listeria* sp. O desempenho dos métodos rápidos foi determinado com base no índice de concordância *kappa* e nos valores de sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). Os resultados da microbiota láctica, população de coliformes totais e termotolerantes e análises físicas e físico-químicas das 63 unidades amostrais foram submetidos à análise de variância ou regressão linear com 5 % de significância. *Salmonella* sp. não foi constatada pelo método convencional e pelo método de PCR-BAX<sup>®</sup>, mas foi verificada em 3,17 % das unidades amostrais avaliadas pelo VIDAS<sup>®</sup>-SLM. O coeficiente de concordância *kappa* e a sensibilidade não foram determinados, a especificidade e acurácia de 96,83 %, o VPP de 0 % e o VPN igual a 100 % ao comparar o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM com o método convencional. A presença de *L. monocytogenes* não foi detectada pelos métodos avaliados. *L. innocua* foi detectada em 13 das 15 unidades amostrais analisadas nos tempos de maturação avaliados. O método *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> apresentou *kappa* de 0,30, sensibilidade de 61,54 %, especificidade de 100 %, acurácia de 66,67 %, VPP de 100 % e VPN igual a 28,57 % comparado ao método convencional. Observou-se redução da população de coliformes totais e termotolerantes a valores aceitáveis pela legislação e redução média de 2 ciclos log na contagem de bactérias lácticas ao final de 60 dias de maturação sob temperatura ambiente. As características físicas e físico-químicas de queijos maturados em embalagens à vácuo e sob refrigeração, em geral, foram mantidas o que não foi observado nos queijos maturados fora da embalagem e à temperatura ambiente. O método de PCR-BAX<sup>®</sup> para a pesquisa de *Salmonella* sp. e VIDAS<sup>®</sup>-LMO para a pesquisa de *L. monocytogenes* apresentaram resultados semelhantes aos apresentados pela metodologia convencional. *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* não foram recuperados nas unidades amostrais avaliadas. O período de maturação mínimo de 60 dias para maturação do queijo Minas artesanal, exigido pela Lei Estadual 14.185, não foi suficiente para garantir segurança microbiológica quando queijos foram produzidos com leite cru artificialmente contaminado com *L. innocua*.

## ABSTRACT

MATA, Gardênia Márcia Silva Campos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, january 2009. **Comparison of methods for research of *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. and microbial and physical-chemistry evaluation in artisanal Minas cheese.** Adviser: Maria Cristina Dantas Vanetti. Co-advisers: Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto and Antônio Fernandes de Carvalho.

The objectives of this research had been to compare the conventional method of detention of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Listeria* sp. with fast methods for analysis of artisanal Minas cheese and to verify the survival of *Listeria innocua* to the maturation. Moreover, it was objectified to evaluate the product in relation to the counting of lactic bacteria, the contamination by bacterias from the coliform group and to determine physical and physical-chemistries characteristics. Forty eight sample units of artisanal Minas cheese had been collected of the region of Serro-MG, amongst these: 12 proceeding ones from six producers whose properties were registered in Instituto Mineiro de Agropecuária-IMA, that had been matured under refrigeration in the original packing to the vacuum and evaluated with 37 and 69 days; 20 proceeding from two properties not registered in IMA and 16 proceeding ones from a registered property, that had been matured at ambient temperature and analyzed before and after 60 days. Raw milk artificially contaminated with *L. innocua*, in the concentration of 10 UFC/mL, was used for the manufacture of 15 sample units of artisanal Minas cheese. The survival of this bacteria during the maturation for 5, 15, 30, 45 and 60 days was verified. The sample units artificially contaminated or not (n = 63) had been analyzed by the conventional method, immunoanalytical VIDAS<sup>®</sup>-SLM and molecular PCR-BAX<sup>®</sup> in relation to the presence of *Salmonella* sp. Sample units not contaminated (n = 48) had

been evaluated by the conventional method and immunoanalytical VIDAS<sup>®</sup>-LMO in relation to the presence of *L. monocytogenes*, while sample units artificially contaminated (n = 15) had been analyzed by the conventional method and immunoanalytical *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> in relation to the presence of *Listeria* sp. The performance of the fast methods was determined based on the *Kappa* agreement index and in the values of sensitivity, specificity, accuracy, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV). The results of lactic microbiota, total and thermotolerant coliform population and physical and physical-chemistries analyses of the 63 sample units had been submitted to the analysis of variance or linear regression with 5 % of significance. It was not evidenced *Salmonella* sp. by the conventional method and the method of PCR-BAX<sup>®</sup>, but it was verified in 3,17 % of the sample units evaluated by VIDAS<sup>®</sup>-SLM. The *Kappa* agreement index zero and the sensitivity were not determined, the specificity and accuracy of 96,83 %, the PPV of 0 % and NPV equal 100 % when comparing VIDAS<sup>®</sup>-SLM method with the conventional method. The presence of *L. monocytogenes* was not detected by the evaluated methods. *L. innocua* was detected in 13 of the 15 sample units analyzed in the evaluated times of maturation. The *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> method presented *Kappa* of 0,30, sensitivity of 61,54 %, specificity of 100 %, accuracy of 66,67 %, PPV of 100 % and NPV of 28.57 % compared with the conventional method. Reduction of the population of total and thermotolerant coliforms was observed at acceptable values for the legislation and average reduction of 2 cycles log in the counting of lactic bacteria to the end of 60 days of maturation under ambient temperature. The physical and physical-chemistries characteristics of matured cheeses in vacuum packages and under refrigeration, in general, had been kept what it was not observed in the matured cheeses out of the packages and to the ambient temperature. The PCR-BAX<sup>®</sup> method for the research of *Salmonella* sp. e VIDAS<sup>®</sup>-LMO for the research of *L. monocytogenes* had presented similar results to the presented ones for the conventional methodology. *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* had not been recovered in the sample units evaluated. The minimum period of maturation of 60 days for the artisanal Minas cheese, demanded for State Law 14,185, was not enough to guarantee microbiological security when cheeses had been produced with raw milk artificially contaminated with *L. innocua*.

## 1. INTRODUÇÃO

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de queijos do Brasil. Grande parte dessa produção é de queijo Minas artesanal, feito a partir do leite cru e produzido especialmente nas regiões do Serro, Canastra, Araxá e Cerrado. A partir da Lei Estadual 14.185 de 31 de janeiro de 2002, a produção do queijo artesanal foi regulamentada no estado de Minas Gerais.

Devido à grande heterogeneidade na produção do queijo Minas artesanal, além de ser realizada por uma parte significativa de pequenos produtores que não adotam as Boas Práticas de Fabricação (BPF), a segurança microbiológica desse produto é um motivo de preocupação. Alguns estudos já demonstraram que o período de maturação de 60 dias exigido para comercialização do queijo não é suficiente para inativar alguns patógenos como *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *Salmonella* sp. e *Listeria monocytogenes*.

Alterações físico-químicas que acontecem durante a maturação do queijo Minas, como redução da atividade de água e do pH, aumento do percentual de cloretos e a presença da microbiota competidora, como bactérias lácticas e coliformes, podem levar à injúria de patógenos eventualmente presentes no queijo e dificultar sua detecção pelos métodos microbiológicos convencionais.

Ainda que alguns estudos demonstrem a eficiência do método convencional de análise microbiológica para a detecção de patógenos e de procedimentos que melhoram a adequação da técnica, a busca por métodos rápidos, sensíveis e seguros para a detecção de patógenos em alimentos é uma área de pesquisa essencial para enfrentar a agilidade que o mercado atual exige. Dentre os novos métodos, se destaca a pesquisa de

*Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e de *Listeria* sp. por imunobioanálise e por Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Essas técnicas permitem a detecção de populações baixas dos contaminantes no alimento em um período de 24 a 48 horas, enquanto as técnicas convencionais de detecção em meios de cultura seletivos demandam de quatro a seis dias. Entretanto, algumas questões ainda impedem a adoção rotineira destas metodologias, entre elas, pouco conhecimento da eficácia da técnica em alimentos específicos, o alto custo do investimento e procedimentos padronizados de preparo da amostra.

A análise microbiológica do queijo Minas artesanal por métodos de triagem pode contribuir para acelerar e simplificar a detecção de patógenos, no intuito de rastrear as condições de higiene em que foi processado e os prováveis riscos à saúde do consumidor. A análise físico-química do queijo Minas artesanal também permite avaliar como as características intrínsecas desse alimento podem interferir na sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Os objetivos desta pesquisa foram os de:

- Comparar os métodos rápidos com métodos convencionais para a detecção de *Salmonella* sp. e de *Listeria* sp. e, com base nos resultados, indicar o método mais adequado para pesquisa destes patógenos;
- Avaliar a presença de *Salmonella* sp. e de *L. monocytogenes* e a sobrevivência de *Listeria innocua* durante a maturação do queijo Minas artesanal;
- Estabelecer características microbiológicas e físico-químicas do queijo Minas artesanal.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Importância do queijo Minas artesanal**

A indústria de queijos ocupa lugar de destaque na economia global sendo que a produção mundial anual prevista para 2008 foi de 14.501 milhões de toneladas. O maior produtor de queijo são os Estados Unidos, que contribuem com aproximadamente 26 % da produção mundial. O Brasil ocupa a sétima posição entre os principais países produtores de queijos com 460 mil toneladas anuais (EMBRAPA, 2008 a).

Queijos artesanais, feitos a partir do leite cru, são apreciados em todo o mundo e possuem elevado potencial econômico. Na França, 20 % da produção total de queijos no ano de 1997, foram representadas pelo produto artesanal (DE BUYESER, 2001).

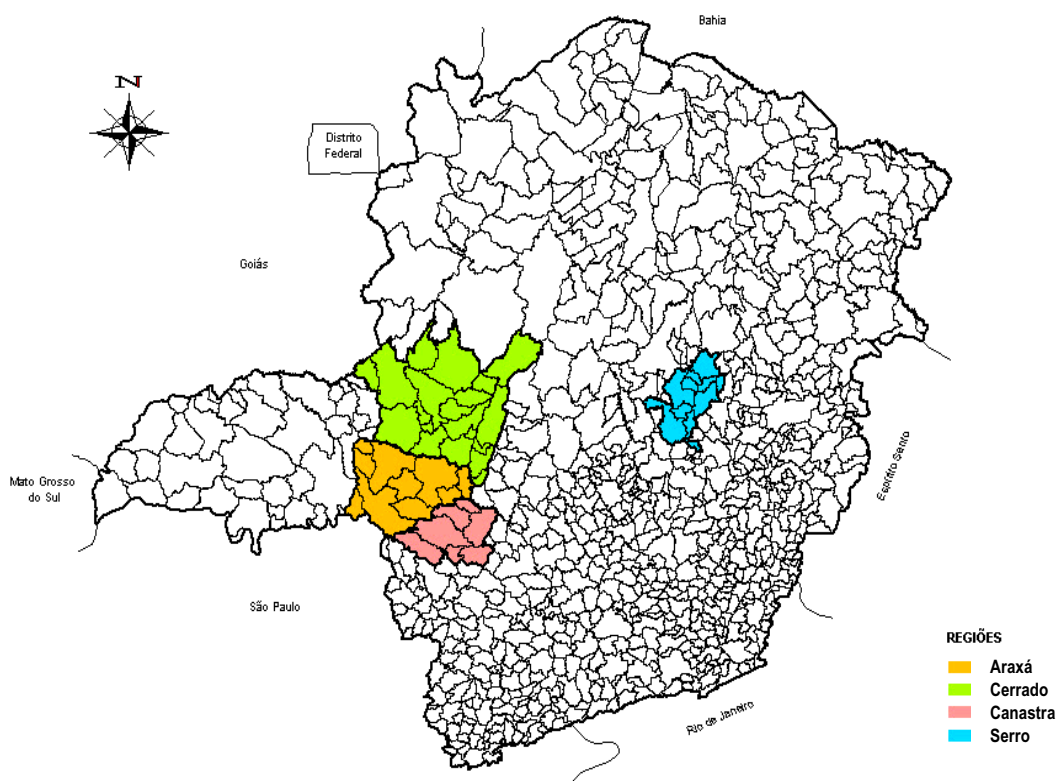
No Brasil, o estado de Minas Gerais coloca anualmente no mercado, 215 mil toneladas de queijos, o que representa quase metade de todo o queijo que o brasileiro consome (GLOBO RURAL, 2002 *apud* ARAÚJO, 2004). Segundo Rezende (2004), grande parte do leite produzido em Minas Gerais é destinado à produção de queijos artesanais, feitos a partir do leite cru.

A importância da produção artesanal de queijos está na função social, econômica e cultural que ela representa para o estado de Minas Gerais e para o Brasil. A produção de queijo Minas artesanal mantém no campo, cerca de 30 mil famílias de pequenos produtores como principal fonte de renda (ARAÚJO, 2004). De acordo com dados da Empresa de Associação Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais - EMATER-MG (2008) são 8.952 mil produtores de queijo Minas artesanal em, pelo

menos, 519 dos 823 municípios mineiros, com uma produção anual em torno de 26 mil toneladas.

Historicamente, a forma artesanal de produzir queijos é praticada no Brasil desde o século XVIII, sendo as técnicas trazidas e desenvolvidas na região pelos imigrantes europeus (IEPHA, 2008). O queijo Minas artesanal é fabricado a partir do leite cru de bovinos adicionados do coalho e do fermento natural ou “pingo”. O fermento natural é uma pequena porção do soro fermentado obtido do dessoramento de queijos produzidos no dia anterior (BRANT *et al.*, 2007). Especialistas consideram que o sabor característico do queijo Minas artesanal é específico da localidade em que foi produzido, sendo resultado da soma de fatores como clima, solo, temperatura, pastagens, genética do gado, origem do coalho e do fermento natural e técnicas específicas de produção (IEPHA, 2008).

Atualmente existem quatro regiões produtoras bem caracterizadas pela EMATER, abrangidas pela Lei Estadual 14.185, localizadas nas regiões montanhosas de Minas Gerais, conhecidas como Serro, Araxá, Canastra e Cerrado (EMATER, 2008).



**Figura 1.** Mapa das quatro regiões produtoras de queijo artesanal, Minas Gerais, Brasil.

**Fonte:** EMATER – MG (2003) *apud* Pinto (2004).

Esforços têm sido feitos para estimular a valorização de produtos tradicionais no intuito de ampliar a competitividade no mercado. Situação semelhante pode ser identificada em países da Europa onde existe forte tendência na certificação de produtos agroalimentares. Os termos Denominação de Origem Protegida (DOP), Indicação Geográfica Protegida (IGP) e Especialidade Tradicional Garantida (ETG) encontram-se em alta e foram criados por meio dos Regulamentos da Comunidade Européia (CE) nº 509/2006 e nº. 510/2006.

No Brasil, grande passo no sentido de capacitar e regulamentar a produção do queijo Minas artesanal foi dado em janeiro de 2002, pelo governador do estado, Itamar Franco, por meio da Lei Estadual nº 14.185. Outra ação importante foi o registro do processo de fabricação do queijo Minas artesanal como patrimônio cultural e imaterial brasileiro pelo Conselho Consultivo do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico do Estado de Minas Gerais – IPHAN em 15 de maio de 2008 (GLOBO.COM, 2008).

## **2.2. Segurança microbiológica de queijos produzidos a partir do leite cru**

Apesar da simplicidade do processo de fabricação, a produção de queijo artesanal não fica livre da globalização que exige critérios rigorosos de segurança alimentar (MACHADO, 2004).

Diante disso, Lei Estadual 14.185 prevê a obrigatoriedade da certificação do rebanho de acordo com as normas do Programa Mineiro de Incentivo à Certificação de Origem e/ou Qualidade dos Produtos da Bovinocultura (CERTIBOV) e certificação das condições de higiene das queijarias de acordo com recomendações do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) no intuito de se estimular a adoção das BPF em todo o processo de fabricação, desde a ordenha do leite até a embalagem dos queijos. Os produtores de queijo Minas artesanal das regiões caracterizadas pela EMATER e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) contam com a assistência do Programa Queijo Minas Artesanal, apoiado pelo IMA e EMATER, destinado à melhoria da qualidade do produto. Até outubro de 2008, 87 produtores estavam cadastrados no IMA e a meta era de alcançar 100 produtores de queijo Minas artesanal certificados ou cadastrados até o final do mesmo ano (CORDEIRO, 2008). Apesar dos esforços, um motivo de preocupação ainda é a adequação da infra-estrutura das agroindústrias de

produção artesanal dos produtores familiares associado à falta de capital para investimento (ARAÚJO, 2004; MASCARENHAS, 2008).

Um dos grandes problemas enfrentados para garantir a qualidade do queijo Minas artesanal é a fabricação a partir do leite cru. Tal fato é altamente compreensível, quando se estima que 30 % da produção de leite *in natura* no Brasil ainda são comercializadas informalmente (EMBRAPA, 2008 b). Para os produtores, a matéria-prima crua é a principal responsável pelo sabor e manutenção das características que garantem a aceitação do produto (BRANT *et al.*, 2007). Para estudiosos, o queijo produzido artesanalmente pode funcionar como veículo de agentes patogênicos, principalmente quando as técnicas produtivas não se adequam às BPF (COLAK *et al.*, 2007).

Outro ponto de atenção é a maturação do queijo, considerada a etapa final no processo de fabricação do queijo Minas artesanal, a qual confere as características sensoriais apresentadas pelo produto, muitas vezes é utilizada como forma de assegurar boa aceitação do produto do ponto de vista microbiológico, de acordo com limites estabelecidos pela legislação vigente. A Lei Estadual estabelece o prazo de 60 dias de maturação para comercialização do queijo artesanal no estado de Minas Gerais e a legislação federal, representada pela Portaria nº. 146/1996 e Resolução nº. 7/2000 estabelece o mesmo período de maturação de queijos produzidos com leite cru para comercialização entre diferentes estados brasileiros.

Queijos fabricados a partir de leite que não é submetido a tratamento térmico apresentam maior risco de veicular microrganismos patogênicos e constituem questão importante de saúde pública (BRANT *et al.*, 2007). Um exemplo que ilustra a preocupação da fabricação de queijos com o leite cru é demonstrado nos resultados de Loncarevic *et al.* (1995) que verificaram que a ocorrência de *L. monocytogenes* em queijos feitos a partir do leite cru foi de 42 % enquanto essa ocorrência foi de 2 % em queijos feitos com leite pasteurizado. Leite cru também pode carrear agentes zoonóticos preocupantes que não são pesquisados freqüentemente como espécies de *Toxoplasma* (GARCIA *et al.*, 1999), *Micobacterium* (ABRAHÃO *et al.*, 2005) e *Brucella* (RAMOS *et al.*, 2008), entre outros.

Por serem alimentos ricos nutricionalmente, derivados de leite, particularmente os queijos, constituem ambiente propício para a multiplicação microbiana inclusive de patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* que estão envolvidos em diversos casos de infecção humana associados ao consumo de alimentos. Na França, do total de

surtos de doenças de origem alimentar, *Salmonella* sp. foi responsável por 49,2 % deles, sendo que 1,8 % relacionaram-se ao consumo de leite e derivados, no período de 1988 a 1997 (DE BUYESER *et al.*, 2001). No Brasil, segundo dados da Secretaria de Vigilância à Saúde, do total de surtos notificados ocorridos entre os anos de 1999 a 2007, 276 casos relacionaram-se ao consumo de leite e derivados e do total de surtos bacterianos, 42,2 % dos casos estavam associados à presença de *Salmonella* sp. (CARMO, 2007).

Alguns estudos apontam *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* como agentes patogênicos encontrados em queijos artesanais, produzidos a partir do leite cru (Quadro 1).

**Quadro 1.** Ocorrência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em queijos produzidos com leite cru em diversos países.

| <b>Tipo de Queijo</b>       | <b>Nº de amostras</b> | <b>Microrganismo</b>    | <b>Ocorrência</b> | <b>País</b> | <b>Referência</b>               |
|-----------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------|-------------|---------------------------------|
| <i>Artesanal</i>            | 142                   | <i>L. monocytogenes</i> | 13 (9,2 %)        | Turquia     | Arslan & Özdemir (2008)         |
| <i>Tulum</i>                | 250                   | <i>Salmonella</i> sp.   | 6 (2,4 %)         | Turquia     | Colak <i>et al.</i> (2007)      |
|                             |                       | <i>L. monocytogenes</i> | 12 (4,8 %)        |             |                                 |
| <i>Minas artesanal</i>      | 37                    | <i>Salmonella</i> sp.   | 7 (18,9 %)        | Brasil      | Araújo (2004)                   |
| <i>Tetilla</i>              | 24                    | <i>L. monocytogenes</i> | 2 (8,3 %)         | Espanha     | Menéndez <i>et al.</i> (2001)   |
| <i>White moulds + Smear</i> | 30                    | <i>Salmonella</i> sp.   | 13 (43,3 %)       | França      | Loncarevic <i>et al.</i> (1995) |

Em alimentos, a multiplicação desses patógenos está relacionada às condições de fabricação, maturação e estocagem. Apesar de fatores como natureza e atividade de culturas acidofílicas, produção de compostos antagonistas e alterações físico-químicas como pH, atividade de água e concentração de sais, que ocorrem ao longo da maturação de queijos, influenciarem a multiplicação de muitos microrganismos, patógenos podem sobreviver (SÁLVIO, 1993; PINTO, 2008).

Sálvio (1993) constatou que *E. coli* enteropatogenicidade clássica-EPEC foi capaz de sobreviver após 60 dias de maturação de queijo Minas nas temperaturas de refrigeração e à 12 °C. A sobrevivência de *L. monocytogenes* foi confirmada aos 42 dias de maturação de queijos feitos com leite cru de caprinos, um queijo tradicional francês, e inoculados com 10<sup>2</sup> UFC/mL do referido patógeno (MORGAN *et al.*, 2001). Em queijo tradicional de Portugal, feito a partir do leite cru de ovelhas, foi verificado aumento significativo na contagem de *L. monocytogenes* durante 42 dias de maturação (GAMEIRO *et al.*, 2007). *L. monocytogenes* também aumentou em número durante a fabricação e maturação do queijo tipo Camembert, feito a partir de leite cru de bovinos (LINTON *et al.*, 2008).

Em razão do grande risco para os consumidores, a elaboração de queijos a partir de leite cru vem sendo abandonada em alguns países da Europa e substituída pela forma semi-artesanal, envolvendo a pasteurização do leite, adoção de outros processos de conservação e a adequação às boas práticas de fabricação a partir da substituição de equipamentos tradicionais por outros modernos (MANOLOPOULOU *et al.*, 2003; LINTON *et al.*, 2008).

### **2.3. Método convencional versus métodos rápidos para pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em alimentos**

Em função da grande preocupação com as doenças de origem alimentar, métodos de pesquisa de microrganismos patogênicos são constantemente desenvolvidos e avaliados. No Brasil, assim como em alguns outros países, como os Estados Unidos, patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* devem estar ausentes em 25 g de alimento analisado (BRASIL, 2001). Isso significa que baixo número de patógeno deve ser detectado de forma rápida e segura para evitar prejuízos e repercussões legais gerados por episódios de alimentos contaminados.

A adoção de determinado método de análise depende de vários fatores que devem ser considerados, como o tempo gasto para obtenção dos resultados, a praticidade da técnica, o custo dos reagentes, o limite de detecção, a precisão, a sensibilidade, a especificidade, a acurácia da técnica, dentre outros. A pesquisa de microrganismos em alimentos é constituída basicamente das seguintes etapas: coleta e manutenção das amostras de acordo com um plano de amostragem, realização das

análises e interpretação dos resultados, de acordo com os padrões de identidade e qualidade de cada produto previsto em legislações vigentes e emissão do laudo.

Existem vários órgãos internacionais que recomendam os procedimentos convencionais oficiais para análise microbiológica em alimentos como a ISO (Organização Internacional de Padronização), BAM/FDA (Administração de Medicamentos dos Estados Unidos) e MLG/FSIS/USDA (Laboratório Microbiológico do Serviço de Inspeção e Proteção de Alimentos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). No Brasil, as técnicas oficiais para análise microbiológica de alimentos de origem animal, incluindo a pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* são ditadas pela Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003.

A análise microbiológica convencional para pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em alimentos se baseia em etapas de enriquecimento seguidas de seleção de colônias típicas em meios de cultura seletivos. De posse das colônias com as características típicas do microrganismo em questão, realizam-se provas morfológicas, bioquímicas e sorológicas (ANDREWS *et al.*, 2001; DONNELLY e RYSER, 2001; BRASIL, 2003; SILVA *et al.*, 2007).

Embora confiáveis e considerados oficiais, os métodos convencionais de detecção de microrganismos em alimentos demandam muito tempo para obtenção dos resultados. Além disso, devido a fatores ambientais, variações na expressão gênica dos microrganismos podem ocorrer e afetar o poder discriminatório dos testes bioquímicos. Outro problema são as células viáveis não-cultiváveis, que não são detectadas na metodologia convencional (FARBER *et al.*, 2001; MALORNY *et al.*, 2003; MARIN *et al.*, 2006).

A busca por metodologias rápidas ou alternativas para a detecção de patógenos em alimentos é uma área de pesquisa crescente e essencial para enfrentar a agilidade que o mercado atual exige. Técnicas modernas de análise economizam tempo além de serem reprodutíveis e confiáveis. Dentro de uma economia globalizada, essas técnicas constituem uma ferramenta importante que agiliza a obtenção de resultados e possibilita que lotes de alimentos sejam fornecidos ao consumo em um tempo menor, representando assim, diminuição das perdas e gastos no armazenamento de produtos alimentícios (MALORNY *et al.*, 2003).

Dentre os novos métodos rápidos, se destaca a análise de patógenos, em especial, *Salmonella* sp. e *Listeria* sp., por meio da imunoenálise e da Reação da

Polimerase em Cadeia-PCR (FRANCO, 2000). Na Tabela 1 estão ilustradas algumas características dos métodos de detecção de patógenos em alimentos.

**Tabela 1.** Características dos métodos de detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp.

| <b>Método</b> | <b>Limite de detecção<br/>(UFC/ mL ou g)</b> | <b>Tempo para<br/>resultado</b> | <b>Especificidade</b> |
|---------------|--|---------------------------------|-----------------------|
| Convencional  | 1 UFC em 25 g                                | 4-6 dias                        | Boa                   |
| Imunológico   | 10 <sup>5</sup>                              | 1-2 horas*                      | Moderada/Boa          |
| PCR           | 10 <sup>3</sup>                              | 6-12 horas*                     | Excelente             |

\*Após procedimento de enriquecimento.

**Fonte:** Adaptado de Boer e Beumer (1999).

O processo de validação de um método rápido é muito trabalhoso e, de forma geral, baseia-se nas seguintes etapas (MALORNY *et al.*, 2003):

1 - Pesquisa de dados epidemiológicos dos principais microrganismos envolvidos em doenças de origem alimentar;

2 - Levantamento e avaliação de técnicas de preparação de amostra de acordo com a matriz usada;

3 - Comparação experimental da eficiência dos protocolos estabelecidos com respeito a desempenho para uso diagnóstico;

4 - Validação do melhor protocolo por meio da comparação estatística com a metodologia convencional oficial, e avaliação por estudos colaborativos envolvendo vários laboratórios. Nesses estudos, a preferência é dada para amostras de alimentos naturalmente contaminados. Resultados obtidos com amostras contendo baixa contaminação são utilizados desde que haja uma forte evidência de que números elevados de células são necessários para produzir resultados positivos.

5 - Preparação de padrões de acordo com formatos aceitos por organizações internacionais de padronização e validação como a Organização Europeia de Validação de Certificação (MICROVAL), Compilação Eletrônica de Métodos Analíticos da AOAC (e-CAM), Associação Francesa de Normalização (AFNOR).

Embora os métodos rápidos sejam comprovadamente eficientes, muitos com protocolos verificados e validados ainda são utilizados como testes presuntivos no início das análises, no intuito de agilizar a liberação de lotes na indústria quando os resultados

são indicativos de ausência de patógenos. Em caso de presença de patógeno, o método convencional deve ser utilizado para confirmação.

Observam-se na literatura vários estudos em que meios de culturas são desenvolvidos e avaliados no intuito de melhorar a eficácia das metodologias utilizadas na pesquisa de patógenos em alimentos, além de estudos de comparação entre métodos convencionais e rápidos. Gunasinghe *et al.* (1994) avaliaram a detecção de *L. monocytogenes* em 52 produtos cárneos usando os meios de cultura Oxford e Palcam e consideraram o ágar Palcam mais efetivo para o isolamento de colônias típicas do patógeno alvo. A avaliação do Ágar *Listeria* Ottavani & Agosti (ALOA), desenvolvido para o isolamento seletivo e diferencial de *L. monocytogenes*, resultou em 13,9 % de resultados falso-negativos quando comparado aos 38,9 % apresentados pelos meios ágar Palcam e Oxford (VLAEMYNCK *et al.*, 2000). Leclercq (2004) concluiu que nenhum dos meios seletivos Oxford, Palcam, Rapid'L.mono e ALOA recuperou todas as 176 estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de humanos e de amostras de alimentos avaliadas. Aragon-Alegro *et al.* (2008) avaliaram 120 amostras de alimentos sendo que, das 151 colônias típicas de *L. monocytogenes* em CHROMagar™, apenas 95 (62,9 %) foram confirmadas.

O métodos rápido VIDAS®-ICS e o ágar semi-sólido Rappaport-Vassiliadis modificado (MSRV) foram avaliados para a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e renderam resultados idênticos ao método convencional (DE MÉDICI *et al.*, 1998). Quando os três métodos foram avaliados em amostras artificialmente contaminadas inoculadas com cultura mista de *Salmonella* sp. e microrganismos competidores, o método MSRV apresentou resultados melhores do que a metodologia convencional.

Schönenbrücher *et al.* (2008) compararam os métodos ISO 6579:2002 com o método oficial europeu ESTRONDO EN 12824:1998 para a pesquisa de *Salmonella* sp. Três meios de cultura cromogênicos novos ASAP (AES *Salmonella* Ágar Plate), OSCM (Oxoid *Salmonella* Chromogem Media) e MM (Miller-Mallinson) foram comparados com os meios de cultura tradicionais BGA (Ágar Verde Brilhante), XLD (Ágar Xilose Lisina Desoxicolato) e XLT4 (Ágar Xilose Lisina Tergitol 4) na recuperação de 36 isolados de *Salmonella*. Os resultados indicaram que apenas no ágar MM foi possível visualizar colônias típicas de *Salmonella* de todos os isolados, entretanto não se observou diferença significativa entre os métodos avaliados.

Silva *et al.* (2008) ao compararem três caldos de enriquecimento seletivos diferentes: Rappaport-Vassiliadis (RV), Selenito Cistina (SC) e Tetracionato de Muller-Kauffmann (MKT) para isolamento de *Salmonella* Dublin de material fecal de bezerro experimentalmente infectado encontraram que o caldo SC foi, significativamente ( $p < 0,05$ ), mais eficiente no isolamento desse sorotipo de *Salmonella*.

O princípio de detecção de microrganismos por meio de imun análise baseia-se na interação entre antígenos e anticorpos (THOMASON, 1971; DUFFEY *et al.*, 1992) e, entre as técnicas imunológicas, as imunoenzimáticas se destacam. Elas utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais marcados com enzima cromogênica (REIS *et al.*, 2001). Os anticorpos policlonais são uma mistura complexa de anticorpos distintos produzidos em função do contato com um agente patogênico. O imunossoro obtido é sempre constituído por uma mistura de anticorpos dirigidos contra os diferentes epítomos do antígeno, produzidos por diferentes linhagens de linfócitos B. Já os anticorpos monoclonais surgem de um único linfócito B que é clonado, produzindo sempre os mesmos anticorpos, em resposta a um agente patogênico. Estes anticorpos apresentam-se iguais entre si em estrutura, especificidade e afinidade ligando-se ao mesmo epítomo no antígeno. As enzimas cromogênicas mais utilizadas nesses testes são a fosfatase alcalina, a peroxidase e a  $\beta$ -galactosidase. A interação entre o substrato e a enzima cromogênica resulta no desenvolvimento de cor. Substratos fluorogênicos também podem ser empregados e mensurados diretamente pela quantidade de fluorescência (BOER e BEUMER, 1999).

Os imunossaios podem ser classificados como homogêneos ou heterogêneos. No ensaio homogêneo os anticorpos não ligados não são separados dos ligados e o complexo antígeno-anticorpo formado é diretamente visualizado ou mensurado. Já no imunossai heterogêneo, os anticorpos marcados são imobilizados em suporte sólido, geralmente poliestireno e, após a adição da amostra e incubação, os anticorpos ligados são separados dos anticorpos não ligados por sucessivas lavagens (BOER e BEUMER, 1999).

A maior especificidade da imun análise é dada em função do tipo de reação realizada que pode ser do tipo sanduíche direto, sanduíche indireto, competição e imunocaptura, dependendo da pesquisa efetuada (MANUAL DO KIT VIDAS<sup>®</sup> BIOLAB-MÉRIEUX, 2007). Os antígenos pesquisados são os somáticos (O), capsulares (Vi) e flagelares (H) no caso de *Salmonella* sp. e somáticos e flagelares no caso de *L. monocytogenes* (ROBIN *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007).

O sistema qualitativo de reações imunoenzimáticas VIDAS<sup>®</sup> (Viteck Imumuno Diagnostic Assay System, Biolab-Mérieux, França) utiliza uma mistura de anticorpos monoclonais de captura de grande afinidade e permite a detecção de antígenos pela técnica ELFA (Ensaio com enzima ligada a composto fluorescente). A presença do microrganismo é confirmada pela formação da reação tipo sanduíche entre o anticorpo ligado ao antígeno, que por sua vez é ligado ao anticorpo marcado com a enzima fosfatase alcalina. A enzima fosfatase alcalina hidrolisa o substrato 4-metil umbeliferil fosfato presente no meio que se transforma em umbeliferona emitindo fluorescência a 450 nm quando excitado a 370 nm. Os testes são, portanto, mais sensíveis visto que a mínima formação do hidrolisado produz sinais de fluorescência detectáveis (MANUAL DO KIT VIDAS<sup>®</sup> Biolab-Mérieux, 2007).

Vaz-Velho *et al.* (2000) avaliaram, comparativamente, a metodologia mini-VIDAS<sup>®</sup>-LMO e a convencional na pesquisa de *L. monocytogenes* num total de 295 amostras ambientais e de peixe e encontraram 96 % de especificidade e 73 % de sensibilidade para o método rápido.

Walker *et al.* (2001) analisaram comparativamente, o método convencional e o imunológico para a detecção de *Salmonella* sp. em tanques na linha de processamento de leite utilizando-se *swabs* para coleta de amostras e encontraram uma concordância de 97,5 %, sem diferença estatisticamente significativa entre os resultados das duas técnicas e concluíram que a técnica imunológica possui algumas vantagens em relação à técnica convencional como maior rapidez e com especificidade e sensibilidade comparáveis.

O sistema de imunoanálise Mini-VIDAS<sup>®</sup> foi usado para a triagem da presença de *L. monocytogenes* em amostras de ambiente e de diferentes alimentos comercializados em Portugal. As amostras com resultados positivos foram analisadas nos meios de cultura LMBA, Palcam e Oxford para avaliação de desempenho. Do total de 445 amostras avaliadas, 29 (6,5 %) estavam contaminadas com *L. monocytogenes*, segundo o método Mini-VIDAS<sup>®</sup>. O ágar Palcam e o Oxford confirmaram 41,38 % das amostras positivas no Mini-VIDAS<sup>®</sup> enquanto o ágar LMBA demonstrou melhor desempenho na recuperação de *L. monocytogenes* ao confirmar 96,55 % dos resultados positivos no método imunoanalítico (PINTO *et al.*, 2001).

Yeh *et al.* (2002) avaliaram 257 esponjas de amostras de carcaças de porco quanto à presença de *Salmonella* sp. pelo método VIDAS<sup>®</sup>-SLM e pelo método convencional de isolamento. Por ambos os métodos foram detectados 18 resultados

positivos sendo que apenas pelo método VIDAS<sup>®</sup>-SLM foram detectadas quatro amostras positivas adicionais. Desde que nenhum resultado falso-negativo ocorreu a especificidade do método VIDAS<sup>®</sup>-SLM foi de 98 % e a sensibilidade foi de 100 %.

No estudo de Von Rückert (2006) em que se avaliou a contaminação de frangos durante o abate por *Salmonella* sp., observou-se diferença estatística com um qui-quadrado de 8,72 ( $p \leq 0,01$ ) entre os resultados obtidos pelo método imunanalítico e pelo método microbiológico convencional. A *odds ratio* encontrada foi de 3,34, ou seja, a chance de uma amostra contaminada por *Salmonella* sp. ser detectada pelo método imunanalítico foi 3,34 vezes superior do que pelo método convencional.

Vieira-Pinto *et al.* (2007) avaliaram comparativamente o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM com o método cultural ISO 6579 na detecção de *Salmonella* sp. em carcaças de suínos e encontraram 58,97 % de sensibilidade e 100 % de especificidade para o método rápido.

A amplificação do DNA pela PCR, idealizada por Mullis na década de 80, se baseia na produção de milhares de cópias de um segmento de DNA em curto período de tempo. A PCR permite a amplificação de seqüências definidas de DNA *in vitro* por meio da ação da enzima Taq DNA polimerase, não sendo necessário, para isto, conhecer a estrutura completa do DNA alvo, mas apenas aquelas que flanqueiam a região a ser amplificada, definida por oligonucleotídeos iniciadores, que hibridizam com estas regiões (MULLIS *et al.*, 1987). A reação é realizada em equipamento automatizado denominado termociclador, que promove a alternância de temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese do DNA. A interpretação dos resultados é feita pela análise da amostra amplificada em eletroforese em gel de agarose. Geralmente, genes que codificam para rRNA, toxinas (*hlyA* – Listeriolisina O em *L. monocytogenes*) ou outros fatores de virulência (*iap* – gene que codifica a proteína associada a invasão; *inla*, *inlb* – genes que codificam a proteína internalina A e B em *L. monocytogenes*; *invA*, *sefA* – genes que codificam fimbrias em *Salmonella* sp.) ou genes envolvidos no metabolismo celular são utilizados para identificação do microrganismo alvo (GLYNN *et al.*, 2006; ROBIN, *et al.*, 2006).

A técnica de PCR tem sido aprimorada com o advento do PCR automatizado e do PCR em tempo real que se diferencia da PCR convencional pela utilização de processos químicos automatizados e computadorizados de monitoramento do acúmulo de produtos de reação, em tempo real, utilizando sondas químicas fluorescentes. O número de amplicons produzidos é diretamente proporcional à intensidade de

fluorescência produzida, gerando uma curva padrão (GLYNN *et al.*, 2006). O sistema é composto de um termociclador com câmaras para detecção de luz fluorescente acoplado a um *software* que realiza a separação, quantificação e interpretação do espectro gerado, realizando assim, a distinção e quantificação de mais de um fluoróforo, que por sua vez, permite a detecção de mais de um DNA alvo e substitui a utilização da eletroforese para interpretação dos resultados (GANDRA, 2008).

A técnica de PCR vem sendo explorada na área industrial na detecção presuntiva de patógenos em alimentos (NIEDERHIAUSER *et al.*, 1992; BAROCCI *et al.*, 2008). De acordo com Malorny *et al.* (2003), características como limite de detecção, especificidade, sensibilidade e potencial para automatização estão entre as vantagens mais importantes da PCR. Entretanto, a sua utilização em diagnósticos laboratoriais ainda é muito sutil devido a fatores como novidade tecnológica do método, o investimento alto e a escassez de métodos oficialmente validados.

A maior especificidade da PCR comparada com os métodos microbiológicos convencionais é conferida pelo fato de se detectar uma região única de um genoma bacteriano. A ocorrência de resultados falso-positivos é pequena, considerando que a probabilidade da ligação dos oligonucleotídeos em regiões não específicas é um evento raro (SAROJ *et al.*, 2008).

Uma limitação da adoção da PCR na detecção de microrganismos é a presença de substratos inibitórios em matrizes de alimentos, como cálcio, gordura, proteína, componentes fenólicos, glicogênio. Além disso, a técnica não permite a diferenciação de células vivas e mortas. No entanto, a preparação da amostra, com etapas de pré-enriquecimento, pode resolver esses problemas e melhorar a sensibilidade do método (GRANT *et al.*, 2000; LIU, 2008; BAROCCI *et al.*, 2008). Jasson *et al.* (2009) afirmam que o pré-enriquecimento por cerca de 12 horas é necessário para recuperação de células injuriadas de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos para posterior detecção por métodos rápidos.

Ferretti *et al.* (2001) propuseram um método de PCR mais sensível para a detecção de *Salmonella* sp. em salame com tempo total de 12 horas, que utiliza apenas seis horas de enriquecimento, o qual exibiu boa correlação com métodos convencionais em amostras natural e artificialmente contaminadas.

Piknová *et al.* (2002) desenvolveram um método de PCR baseado em três etapas de enriquecimento, equivalente a ISO 6579 quanto ao limite de detecção (1 UFC / 25 g) para a pesquisa de *Salmonella* sp. em alimentos que produz resultados definitivos no

terceiro dia de análise. Em amostras de alimentos naturalmente contaminadas o método de PCR obteve resultados idênticos ao método de referência.

De um total de 27 amostras de alimentos analisadas, entre elas amostras de queijo, por Gouws e Liedemann (2005), 74 % foram presuntivamente positivas para *L. monocytogenes* em ágar Oxford (Oxoid), e 44 % em ágar Rapid'L.mono. Tanto o kit API *Listeria* sp. quanto o método PCR confirmaram 37 % dos resultados presuntivos e segundo os autores o método PCR poderia ser usado para eliminar resultados falso-positivos encontrados pelos métodos tradicionais.

Von Rückert (2006) encontrou diferença estatística com um qui-quadrado de 18,37 ( $p \leq 0,01$ ) entre os resultados positivos da metodologia convencional e da técnica de PCR na detecção de *Salmonella* sp. em carcaças de frango. A *odds ratio* obtida foi de 4,83, o que significa que a chance de uma amostra contaminada ser detectada pela técnica de PCR é 4,83 vezes maior do que pelo método convencional. No entanto, não se observou diferença estatística quando foram comparados os resultados positivos totais do método imunológico e os da técnica de PCR. Entretanto, Kanki *et al.* (2009) encontraram que o método convencional foi capaz de detectar *Salmonella enterica* em 58 das 106 amostras de carne de frango e miúdos naturalmente contaminados. Das 58 amostras positivas no método cultural, somente 50 % foram confirmadas pelo método de PCR.

Barocci *et al.* (2008) verificaram que o método molecular rápido de PCR para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de alimentos e superfícies a partir do pré-enriquecimento apresentou a mesma sensibilidade quando comparada com o método convencional e concluíram que um protocolo de extração mais simples e o pequeno volume de material gasto para amplificação permitem a economia de material e tempo na obtenção de resultados. Vanegas *et al.* (2009) avaliaram a detecção de *L. monocytogenes* por PCR em tempo real em leite cru de cinco municípios de Boyacá-Colômbia. Nesse estudo, de um número total de 81 amostras, 21 deram resultados positivos pelo método de PCR e 13 amostras foram positivas pelo método convencional.

A avaliação comparativa de métodos microbiológicos rápidos de pesquisa de patógenos em alimentos com o método convencional é uma ferramenta útil para se indicar os que possuem melhor concordância entre si e os que melhor se adequam à matriz alimentar avaliada.

## 2.4. Parâmetros de avaliação de métodos microbiológicos de pesquisa de patógenos em alimentos

A avaliação de testes diagnósticos é comum na prática clínica. Um teste diagnóstico ou um método analítico geralmente é concebido como um exame realizado em laboratório e alguns princípios básicos são necessários para a sua interpretação. Fazendo uma transposição à microbiologia de alimentos, o teste diagnóstico é considerado positivo ou negativo e o microrganismo presente ou ausente. Dessa forma, há quatro interpretações possíveis para o resultado do teste, duas em que o teste está correto e duas em que está incorreto (Quadro 2). O teste está correto quando ele é positivo na presença do patógeno ou negativo na ausência do patógeno. Por outro lado, o teste está incorreto quando ele é positivo na ausência do patógeno (falso-positivo), ou negativo na presença do patógeno (falso-negativo) (FLETCHER *et al.*, 1996; FREITAS *et al.*, 2006).

**Quadro 2.** Relação entre o resultado de um teste diagnóstico e a presença do patógeno.

|       |          | PATÓGENO                |                         |
|-------|----------|-------------------------|-------------------------|
|       |          | PRESENTE                | AUSENTE                 |
| TESTE | POSITIVO | Verdadeiro positivo (a) | Falso positivo (b)      |
|       | NEGATIVO | Falso negativo (c)      | Verdadeiro negativo (d) |

**Fonte:** Adaptado de Fletcher *et al.*, 1996.

A acurácia ou exatidão de um novo teste diagnóstico é avaliada por meio de um “padrão-ouro” que geralmente é um teste simples e barato, mas representa o indicador mais fidedigno da verdade por ter maior uso ou por ser julgado superior por um consenso entre estudiosos sendo uma forma de saber se o patógeno está ou não realmente presente. Para avaliar testes em uso deve-se saber quão bem se relacionam ao “padrão ouro”. Por exemplo, na pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, o método convencional é adotado como padrão ouro ou método de referência e os métodos rápidos são avaliados quando comparados ao método convencional.

Entende-se por acurácia de um método analítico, a proximidade dos resultados por ele obtida comparado ao valor verdadeiro (FLETCHER *et al.*, 1996; VALENTINI *et al.*, 2007). De acordo com Auriant *et al.* (1998) *apud* Silva e Souza (2004) uma boa acurácia está próxima de 75 %. Silva e Sousa (2002) *apud* Silva e Souza (2004)

consideraram que valores maiores que 90 % representam uma acurácia elevada e 70 % a 89 % representam acurácia moderada. Algumas relações entre o teste diagnóstico e a presença real do patógeno podem ser visualizadas no Quadro 3.

**Quadro 3.** Características e definições do teste diagnóstico.

|                                    |          | PATÓGENO                              |         | TOTAL         |
|------------------------------------|----------|---------------------------------------|---------|---------------|
|                                    |          | PRESENTE                              | AUSENTE |               |
| TESTE                              | POSITIVO | A                                     | b       | a + b         |
|                                    | NEGATIVO | C                                     | d       | c + d         |
| TOTAL                              |          | a + c                                 | b + d   | a + b + c + d |
| Sensibilidade = $a / b + c$        |          | Especificidade = $d / b + d$          |         |               |
| VPP = $a / a + b$                  |          | VPN = $d / c + d$                     |         |               |
| Acurácia = $a + b / a + b + c + d$ |          | Prevalência = $a + c / a + b + c + d$ |         |               |

**Fonte:** Adaptado de Fletcher *et al.*, 1996.

A sensibilidade e a especificidade são propriedades de um teste relevantes ao tomar uma decisão sobre usar ou não um teste diagnóstico. Frequentemente, tais medidas são usadas para comparar um novo método ao método padrão ouro. Por definição, sensibilidade é a proporção de amostras contaminadas com o patógeno (verdadeiro positivo), que tem um teste positivo para o patógeno; e especificidade é a proporção de amostras não contaminadas (verdadeiro negativo), que tem um teste negativo (Quadro 3) (CORRY *et al.*, 2007). Testes sensíveis são raramente negativos na presença da doença, ou seja, a probabilidade de falso-negativos é baixa. Testes específicos são raramente positivos na ausência da doença, ou seja, a probabilidade de falso-positivos é baixa (FLETCHER *et al.*, 1996).

Diante dos resultados de um teste diagnóstico, seja ele positivo ou negativo, a sensibilidade e a especificidade têm pouca relevância, pois o importante agora será determinar se a amostra tem realmente ou não o patógeno que é dado pelos valores preditivos (Quadro 3). O valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade das amostras positivas identificadas pelo teste e que realmente estão contaminadas com o patógeno. O valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade das amostras negativas identificadas pelo teste e que realmente não estão contaminadas com o patógeno (GOULART, 2000).

Ressalta-se que o valor preditivo é determinado pela sensibilidade e especificidade e também pela prevalência do patógeno nas amostras em estudo. O termo

prevalência (Quadro 3) é definido como a proporção de amostras contaminadas no total de uma amostra definida, em um determinado ponto no tempo. Quanto mais sensível for um teste, melhor será o seu valor preditivo negativo (assegura que as amostras com resultado negativo não possui o patógeno). Por outro lado, quanto mais específico for o teste melhor será o seu valor preditivo positivo (assegura que as amostras com resultado positivo realmente possui o patógeno). Resultados positivos, mesmo de um teste muito específico, quando se refere à baixa prevalência do patógeno, serão, em grande parte, falso-positivos. De maneira semelhante, resultados negativos, mesmo de um teste muito sensível, quando se refere à elevada prevalência do patógeno, são prováveis de serem falso-negativos (FLETCHER *et al.*, 1996).

Em função disso, amostras verdadeiramente positivas ou negativas tornam-se difíceis de serem detectadas com confiabilidade ao usar amostras naturalmente contaminadas sendo freqüentemente observado na literatura trabalhos de avaliação de métodos onde a matriz alimentar é contaminada artificialmente com o patógeno pesquisado no intuito de ampliar a prevalência e também o limite de detecção – LOD – (Quadro 4) do método avaliado (CORRY *et al.*, 2007). Alguns outros atributos do teste diagnóstico normalmente avaliados tem seus conceitos sumarizados no Quadro 4 de acordo com (FREITAS *et al.*, 2006; VALENTINI *et al.* 2007; CORRY *et al.*, 2007).

#### **Quadro 4.** Conceitos relevantes na avaliação de métodos analíticos.

**Precisão:** É o grau de correspondência dos resultados de um método sob avaliação quando aplicado repetidamente a várias amostragens de uma mesma amostra.

**Reprodutibilidade:** Refere-se ao grau de correspondência dos resultados quando procedimentos analíticos são aplicados numa mesma amostra em diferentes laboratórios, utilizando diferentes analistas e equipamentos.

**Repetibilidade:** Refere-se ao grau de correspondência dos resultados quando procedimentos analíticos são aplicados repetidamente a múltiplas análises da mesma amostra homogênea num curto espaço de tempo utilizando os mesmos analistas e os mesmos equipamentos.

**Limite de detecção:** Representa o número mais baixo de microrganismos em exame que pode ser detectado com certo limite de confiabilidade, utilizando um determinado procedimento experimental, porém sem ser quantificado.

**Limite de determinação:** Representa o número mais baixo de microrganismos, que pode ser quantificado sob condições experimentais pelo método analisado.

O coeficiente *Kappa* também pode ser utilizado na comparação de testes diagnósticos. Ele estabelece o grau de confiabilidade, comparando a concordância observada com a concordância que seria esperada por mero acaso (GOULART, 2000). Os valores do coeficiente de concordância *Kappa* variam de +1 a -1 sendo que tanto o cálculo (considerando informações presentes no Quadro 3) quanto a interpretação dos resultados podem ser visualizado no Quadro 5.

**Quadro 5.** Coeficiente *Kappa*.

$$Kappa = (\text{concordância observada} - \text{concordância esperada}) / (1 - \text{concordância esperada})$$

$$\text{Concordância observada} = a + d / a + b + c + d$$

$$\text{Concordância esperada} = [(a + b)(a + c)] + [(b + d)(c + d)] / (a + b + c + d)^2$$

Interpretação do *Kappa*:

- maior que 0,75 = concordância perfeita;
- entre 0,40 e 0,75 concordância de razoável a boa;
- abaixo de 0,40 = concordância fraca.

Valor de p de *Kappa*:

- $p > 0,05$  = Aceita-se a hipótese  $H_0$  (não existe concordância).
- $p \leq 0,05$  = Rejeita-se a hipótese  $H_0$  (existe concordância).

A validade de um teste diagnóstico relaciona-se com a sua capacidade de atender o que se propôs a medir. O teste diagnóstico ideal seria aquele que possuísse apenas respostas corretas, porém, não existe um teste diagnóstico perfeito. Portanto, é mais indicado que o teste tenha equilíbrio entre os valores de sensibilidade e especificidade, ou seja, valores altos e próximos entre si, no intuito de equilibrar os resultados falso-positivos e falso-negativos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

O presente trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia pertencente à Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, M.G. e no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em Uberlândia, M.G.

#### **3.1. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em queijo Minas artesanal**

##### **3.1.1. Matéria-prima**

Doze unidades amostrais (Experimento 1) de queijo Minas artesanal de seis produtores diferentes cadastrados no IMA, sendo duas unidades amostrais do mesmo lote de cada produtor, foram obtidas na Cooperativa dos Produtores Rurais (Serro, M.G.), responsável pelo recebimento, comercialização e distribuição de queijos de diferentes fornecedores. As unidades amostrais foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, em embalagens à vácuo e devidamente acondicionadas em caixas de isopor. Seis unidades amostrais foram analisadas aos 37 dias de maturação e as outras seis foram armazenadas na embalagem original sob refrigeração e analisadas com 69 dias de maturação (Quadro 6).

Vinte unidades amostrais (Experimento 2) de queijo Minas artesanal foram adquiridas de duas queijarias também localizadas na região do Serro, Minas Gerais, mas que não eram cadastradas no IMA. Os queijos foram encaminhados ao Laboratório de

Microbiologia de Alimentos da UFV, acondicionados em caixas de isopor, para a realização das análises. As unidades amostrais foram maturadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos em estufa tipo BOD, à temperatura ambiente. Dez unidades amostrais, cinco de cada propriedade, foram analisadas com tempo de maturação inferior a 60 dias (cinco e 12 dias) e as outras dez com tempo de maturação superior 60 dias (66 e 75 dias).

**Quadro 6.** Características das unidades amostrais de queijo Minas artesanal analisadas no presente estudo.

| <b>Características das unidades amostrais</b>                    | <b>Experimento 1</b>                            | <b>Experimento 2</b>                   | <b>Experimento 3</b>          | <b>Experimento 4</b>                      |
|--|---|--|-------------------------------|---|
| <b>Cadastro no IMA</b>   | Sim   | Não                                    | Sim                           | *N.A.                                     |
| <b>Embaladas à vácuo</b>   | Sim   | Não                                    | Não                           | Não                                       |
| <b>Temperatura de maturação</b>                                  | Refrigeração                                    | Ambiente                               | Ambiente                      | Ambiente                                  |
| <b>Período de maturação avaliado</b>                             | 37 e 69 dias                                    | Inferior e igual ou superior a 60 dias | Inferior e superior a 60 dias | 5, 15, 30, 45 e 60 dias                   |
| <b>Unidades amostrais avaliadas em cada período de maturação</b> | 6   | 10                                     | 8                             | 3   |
| <b>Número total de unidades amostrais</b>                        | 12  | 20                                     | 16                            | 15  |
| <b>Análises microbiológicas</b>                                  | <i>Salmonella</i> sp. e <i>L. monocytogenes</i> |  |                               | <i>Salmonella</i> sp. e <i>L. innocua</i> |

\*N.A. = não se aplica, pois os queijos foram produzidos experimentalmente na região do Serro, M.G.

Dezesseis unidades amostrais (Experimento 3) de queijo Minas artesanal foram adquiridas diretamente de uma queijaria da região do Serro, Minas Gerais, cadastrada no IMA. As unidades amostrais foram maturadas na propriedade de origem, na sala de maturação, sob temperatura ambiente e enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, acondicionados em caixas de isopor, na ocasião das análises. Oito unidades amostrais foram analisadas com tempo de maturação inferior a 60 dias (7, 14 e 21 dias) e oito com tempo de maturação igual ou superior a 60 dias (60 e 67 dias).

A partir de leite cru adquiridos de dois fornecedores da região do Serro, Minas Gerais foram produzidas quinze unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com 10 UFC/mL de *L. innocua*. As unidades amostrais inoculadas foram produzidas por Pinto (2008). Foram também fabricadas unidades amostrais de queijo não inoculado com *L. innocua* que foram usados como controles negativos. Essas unidades amostrais foram maturadas no Instituto de Laticínios Cândido Tostes, em Juiz de Fora, MG, simulando as condições de maturação das unidades produtoras do Serro. Três unidades amostrais foram analisadas nos tempos de 5, 15, 30, 45 e 60 dias de maturação. Todas as unidades amostrais foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, devidamente acondicionadas em caixas de isopor, na ocasião das análises (Experimento 4).

### **3.1.2. Detecção de *Salmonella* sp. e de *Listeria* sp. por técnicas convencionais de cultivo**

As amostras de queijo Minas artesanal foram analisadas quanto a presença de *Salmonella* sp. e de *L. monocytogenes* empregando-se os métodos microbiológicos analíticos oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA (BRASIL, 2003). O experimento foi acompanhado de controles positivos de culturas de referência de *Salmonella* sp., *L. monocytogenes* e *L. innocua*.

Para a determinação de *Salmonella* sp., 25 g da amostra foram maceradas em homogeneizador tipo *stomacher* (Laboratory blender 400, BA7021, Seward, Inglaterra) em 225 mL de solução salina peptonada tamponada 1 %. Após incubação em BOD (FANEM, 347CD, São Paulo, Brasil), por 16 a 20 horas, a  $36 \pm 1$  °C. Aliquotas de 0,1 e 1 mL, respectivamente, foram transferidas para caldo Rappaport-Vassiliardis (Difco, Sparks, EUA) e Selenito-Cistina (Acumedia, Lansing, EUA) para o enriquecimento

seletivo, com incubação, em banho-maria (B. Braum Biotech International 18BUIO), a  $41 \pm 0,5$  °C, por 24 a 30 horas. O plaqueamento seletivo foi feito na superfície de ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato-XLD (Acumedia) e ágar Verde Brilhante Vermelho-Fenol Lactose e Sacarose-BPLS (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), seguindo-se incubação a  $36 \pm 1$  °C, por 24 horas. Colônias típicas de *Salmonella* sp. em cada meio de cultura foram selecionadas, transferidas para ágar padrão para contagem-PCA (Difco) para purificação e subseqüente etapas de identificação bioquímica e sorológica.

Os testes bioquímicos de produção de urease (Difco), reações em ágar Triplo Açúcar Ferro-TSI (Difco), ágar Ferro Lisina-LIA (Difco) e ágar Tiosulfato Indol Motilidade-SIM (Acumedia) foram realizados nas culturas isoladas dos meios seletivos. Quando necessário, os testes sorológicos foram feitos com soro anti-*Salmonella* polivalente “O” (Difco).

Para da determinação de *L. monocytogenes* e *L. innocua*, o enriquecimento seletivo foi feito em porções de 25 g da amostra de queijo. A amostra foi homogeneizada em 225 mL de caldo de enriquecimento de *Listeria*-LEB (Acumedia) e após incubação em BOD (Nova Ética, 411D, São Paulo, Brasil) por 20 a 24 horas a  $30 \pm 1$  °C, alíquotas de 0,1 mL foram transferidas para o caldo Fraser (Oxoid, Cambridge, Reino Unido) suplementado com SRO 156E (Oxoid). Após incubação nas mesmas condições citadas anteriormente, foi feito o plaqueamento seletivo em ágar Oxford (Difco) e ágar Palcam (Merk, Alemanha), adicionados dos agentes seletivos SRO 140E (Oxoid) e SRO 150E (Oxoid), respectivamente. Colônias típicas de *Listeria* sp. foram selecionadas em ágar TSA (Oxoid) contendo 6 % de extrato de levedura (MicroMed, Rio de Janeiro, Brasil) e submetidas a testes de caracterização bioquímica.

Os testes bioquímicos incluíram: catalase, Gram, motilidade, redução de nitrato, vermelho de metila, Voges Proskauer, fermentação de carboidratos em caldo vermelho de fenol adicionados de xilose (Vetec), ramnose (Merck,) e manitol (Merck) e alfa-hemólise em ágar Colúmbia (Oxoid), adicionado de 5 % de sangue desfibrinado de carneiro. As colônias com sorologia positiva foram enviadas à Fundação Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, R.J. para realização da sorotipagem. Os resultados finais foram expressos em presença / ausência em 25 g de unidade amostral para *Salmonella* sp. e *Listeria* sp.

### 3.1.3. Detecção de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. por imunoenálise

As pesquisas de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. foram realizadas também por meio da técnica ELFA em imunoenalizador Mini-VIDAS<sup>®</sup> (MANUAL DO KIT VIDAS<sup>®</sup> BIOLAB-MÉRIEUX, 2007).

Alíquotas de 1 mL dos caldos Rappaport-Vassiliadis e Selenito-Cistina foram transferidos, após incubação por 6 a 8 horas a  $41 \pm 0,5$  °C, separadamente, para 10 mL de caldo M (SPERBER e DEIBEL, 1969), seguindo-se de incubação, por 18 a 24 horas, a  $41$  °C  $\pm$  1 °C. Alíquotas de 1 mL de caldo M proveniente do meio Rappaport-Vassiliadis e 1 mL do Selenito-Cistina foram misturadas e fervidas por 15 minutos e 500 µL dessa suspensão foi analisada no imunoenalizador Mini-VIDAS<sup>®</sup> pelo kit VIDAS<sup>®</sup>-SLM quanto à presença de *Salmonella* sp. Os resultados foram obtidos após 45 minutos de análise (AOAC, 2005).

Para análise da presença de *L. monocytogenes* em amostras de queijo, 25 g da amostra de queijo Minas artesanal foi homogeneizadas em 225 mL de caldo Fraser adicionado do suplemento. Após incubação, por  $25 \pm 1$  hora, a  $30 \pm 1$  °C, alíquotas de 1 mL foram transferidas para o caldo Fraser desprovido de suplemento. Após incubação nas mesmas condições, alíquotas de 1 mL do caldo de enriquecimento secundário foram fervidas, por 15 minutos e um volume de 500 µL dessa suspensão foi analisada no imunoenalizador Mini-VIDAS<sup>®</sup> pelo kit VIDAS<sup>®</sup>-LMO quanto à presença de *L. monocytogenes*. Os resultados foram obtidos após 70 minutos de análise. Eventualmente, as alíquotas fervidas para análise eram congeladas à -20 °C até o momento das análises (AOAC, 2006 a).

### 3.1.4. Detecção de *L. innocua* por imunoenálise

A detecção de *L. innocua*, nas unidades amostrais artificialmente contaminadas, foi realizada pelo método imunológico, seguindo-se o mesmo protocolo descrito anteriormente. Alíquotas do caldo de enriquecimento secundário foram fervidas em banho-maria por 15 minutos e, então, transferidas para tubo tipo *Eppendorf* contendo a fita teste de *Listeria* Test Kit PN 18220002 DuPont<sup>TM</sup> Lateral Flow System<sup>TM</sup> a temperatura ambiente e, após 10 minutos, procedeu-se a leitura do resultado.

A fita reativa contém anticorpos específicos para *Listeria* sp. imobilizados na linha teste. Um segundo anticorpo ligado a ouro coloidal está presente na membrana

localizada antes da linha teste. A amostra enriquecida difunde por capilaridade na tira até atingir a área de reação. Se houver antígenos de *Listeria* sp., estes se ligarão no anticorpo ligado ao ouro coloidal que por sua vez se ligará ao anticorpo imobilizado na linha teste. Portanto, aparecerá uma linha horizontal de cor avermelhada indicativa da reação antígeno-anticorpo. A mistura de reação flui até atingir uma nova área na qual existem reagentes específicos que capturam o excesso de ouro determinam se o funcionamento correto do sistema; neste caso aparecerá uma segunda linha vermelha.

### **3.1.5. Detecção de *Salmonella* sp. por PCR**

A detecção de *Salmonella* sp. foi feita pela técnica de PCR automatizada (AOAC, 2006 b), usando-se o sistema BAX<sup>®</sup> (DuPont Qualicon, Wilmington, EUA).

Foi coletada alíquota de 1,5 mL da etapa de pré-enriquecimento do método convencional, transferida para tubos *Eppendorfs* e armazenadas a -20 °C até momento das análises. Os tubos *Eppendorfs* foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada (LABIO) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) em Uberlândia, M.G. para continuidade das análises.

Para a extração do DNA, 5µL de amostra pré-enriquecida foi transferida para o tubo *Eppendorf* contendo 200 µL do tampão de lise e incubadas, por 20 minutos, a 37 °C e por 10 minutos, a 95 °C. Para detecção de *Salmonella* sp. por PCR 50 µL da amostra lisada foram adicionados a tubos contendo o liofilizado da reação de PCR e após sua completa dissolução analisados pelo termociclador/detector BAX Q7 de acordo com instruções do fabricante.

### **3.1.6. Análise estatística**

Os método imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup> foi comparado ao método convencional considerando o total de 63 unidades amostrais (48 unidades amostrais não inoculadas e 15 unidades amostrais artificialmente contaminadas com *L. innocua*) para pesquisa de *Salmonella* sp. (VIDAS<sup>®</sup>-SLM), 48 unidades amostrais não inoculadas para pesquisa de *L. monocytogenes* (VIDAS<sup>®</sup>-LMO) e 15 unidades amostrais artificialmente contaminadas para pesquisa *L. innocua* (*Lateral Flow System*<sup>TM</sup>). Comparou-se o

método PCR-BAX<sup>®</sup> ao convencional somente para pesquisa de *Salmonella* sp considerando também o total de 63 unidades amostrais.

Os dados foram agrupados em tabelas 2 x 2 a fim se avaliar atributos como sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), com seus respectivos limites de confiança, além da concordância dos métodos rápidos com o método convencional de análise microbiológica por meio dos valores do coeficiente *Kappa*. As análises foram feitas empregando-se o programa Epi Info, versão 6.04 do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos – CDC. A classificação do coeficiente de concordância *Kappa* se deu de acordo com o Quadro 5.

Procedeu-se também uma análise descritiva de presença e ausência e sobrevivência dos microrganismos pesquisados de acordo com os experimentos 1, 2, 3 e 4 descritos no item 3.1.1. (Quadro 6).

## **3.2. Características microbiológicas, físicas e físico-químicas do queijo Minas artesanal**

### **3.2.1. Matéria-prima**

Procedimentos de contagem de bactérias láticas, enumeração de coliformes e caracterização física e físico-química também foram realizados nas mesmas unidades amostrais já caracterizadas no item 3.1.1. (Quadro 6).

### **3.2.2. Contagem de bactérias láticas**

A contagem de bactérias láticas foi realizada de acordo com Hall *et al.* (2001) e Silva *et al.* (2007) com modificações: foram pesadas 25 g da unidade analítica, adicionadas a 225 mL de salina peptonada 0,1 % e homogeneizadas em *stomacher* durante 1 minuto (diluição 10<sup>-1</sup>). Foram realizadas diluições decimais e, as mais adequadas, foram inoculadas em ágar MRS (Acumedia) adicionadas do indicador de pH púrpura de bromocresol (Merck) para avaliar produção de compostos ácidos. As placas

foram acondicionadas em jarras de anaerobiose (Oxoid) em ambiente de microaerofilia e incubadas a 30 °C por 72 ± 3 horas. As regras para contagem estiveram em conformidade com Brasil (2003), sendo os resultados foram expressos em log UFC/g.

Testes adicionais como coloração de Gram e catalase foram realizados a fim de confirmar a contagem de bactérias lácticas nas amostras.

### **3.2.3. Enumeração de coliformes**

A enumeração de coliformes totais e termotolerantes foi realizada por meio da técnica do Número mais Provável (NMP) de acordo com Brasil (2003). Foram pesadas 25 g da unidade analítica, adicionadas a 225 mL salina peptonada 0,1 % e homogeneizadas em *stomacher* durante 1 minuto (diluição 10<sup>-1</sup>). Foram realizadas diluições decimais e as mais adequadas transferidas para série de três tubos para os meios com incubação à 36 ± 1 °C: Caldo Lauril Sulfato Triptose-LST (Merck), para prova presuntiva de coliformes; Caldo Verde Brilhante (Merck), para prova confirmativa de coliformes totais; e Caldo EC (Acumedia), com incubação em banho-maria (B. Braum Biotech International 18BUIO), à 45 °C, para prova confirmativa de coliformes termotolerantes. Os resultados foram expressos em log NMP/g de acordo com regras de enumeração da Instrução Normativa (BRASIL, 2003).

### **3.2.4. Caracterização física do queijo Minas artesanal**

A massa de todas as unidades amostrais de queijo Minas artesanal foi mensurada por meio de uma balança digital (Homis, DJ-600B) e as dimensões (altura e diâmetro) com o auxílio de uma régua graduada (Analítica). Para cálculo do volume em cm<sup>3</sup>, utilizou-se a fórmula:

$v = \pi.r^2.h$ , Sendo:

v = volume (cm<sup>3</sup>);

$\pi = 3,14$ ;

r = raio (cm);

h = altura (cm).

### 3.2.5. Caracterização físico-química do queijo Minas artesanal

#### *Atividade de água ( $A_w$ )*

A  $A_w$  foi medida em Decagon AquaLab (CX-2) de acordo com procedimentos preconizados pelo manual do equipamento.

#### *Umidade e voláteis*

A umidade foi determinada de acordo com Brasil (2006), pesando-se alíquotas de 5 g em recipientes previamente secos e armazenando-os em estufa (Fanem 315SE, São Paulo, Brasil) a  $102 \pm 2$  °C, durante 3 horas. Os recipientes foram esfriados em dessecador e pesados em intervalos de 1 hora até peso constante. Os percentuais de umidade e sólidos totais foram calculados de acordo com as seguintes equações:

$$\% \text{ umidade e voláteis} = \frac{100 \times m}{m'}$$

sendo:

m = perda de massa em gramas

m' = massa da amostra em gramas

% sólidos totais = 100 - % umidade e voláteis.

#### *pH*

A determinação de pH foi realizada de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Alíquotas de 10 g foram pesadas em Erlenmeyer de 250 mL seco e, posteriormente, adicionadas de 100 mL de água a 25 °C, recentemente fervida. A amostra foi mantida sob agitação, por 30 minutos e em repouso, por 10 minutos. Imediatamente após, o pH foi determinado com o pHmetro (Tecnopon MPA-210P, São Paulo, Brasil).

### ***Acidez titulável***

A acidez titulável foi determinada seguindo-se a metodologia proposta por Pereira (2001) com modificações: Alíquotas de 10 g foram pesadas em um béquer de 250 mL e acrescentou-se 100 mL de água destilada sob agitação por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi mantida em repouso por mais 15 minutos e filtrada em algodão hidrófilo, para um Erlenmeyer de 250 mL. Foram adicionadas três gotas de fenolftaleína 1 % (m/v) alcoólica neutralizada S.I. a 50 mL do filtrado que, por sua vez, foi titulado com uma solução de NaOH 0,1 mol/L (Vetec) até viragem detectável e permanente do indicador. A acidez, expressa em percentual de ácido láctico (% AL), foi calculada pela seguinte equação:

$$A = \frac{C_i \times f_c \times 9 \times v}{g},$$

sendo:

A = acidez expressa em percentual de ácido láctico (m/m);

C<sub>i</sub> = concentração da solução de NaOH (mol/L);

F<sub>c</sub> = fator de correção da solução de NaOH;

v = volume da solução de NaOH gasto na titulação da amostra;

g = massa da amostra.

### ***Cloretos***

Para a determinação de cloretos aplicou-se a metodologia recomendada por Richardson (1985). Pesou-se, aproximadamente, alíquota de 10 g em um béquer de 250 mL com a adição de 15 mL de água destilada aquecida entre 50 e 55 °C. A mistura foi agitada em agitador magnético até a obtenção de uma pasta fina. Adicionou-se 25 mL de água destilada sob agitação até a dispersão da amostra. A solução foi transferida para um balão de 100 mL completando-se o volume com água destilada. O conteúdo do balão foi filtrado em algodão hidrófilo até a coleta de 50 mL do filtrado. Com uma pipeta transferiu-se 25 mL do purificado para um frasco limpo onde se adicionou 1 mL do indicador cromato de potássio (Quimibrás, Rio de Janeiro, Brasil) e titulou-se com nitrato de prata 0,1 N (Sigma, Steinheim, Alemanha) até o aparecimento de uma pálida coloração vermelha-marrom.

Os percentuais de cloretos e NaCl foram calculados pelas seguintes fórmulas:

$$\% \text{ cloreto} = \frac{\text{mL de AgNO}_3 \times \text{N AgNO}_3 \times 0,0355 \times 100}{\text{Peso da amostra ou alíquota}}$$

$$\% \text{ NaCl} = \frac{\text{mL de AgNO}_3 \times \text{N AgNO}_3 \times 0,0585 \times 100}{\text{Peso da amostra ou alíquota}}$$

Sendo:

mL de AgNO<sub>3</sub> = volume de nitrato de prata gasto na titulação;

N AgNO<sub>3</sub> = normalidade da solução de nitrato de prata

### 3.2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas considerando os resultados obtidos da contagem de bactérias lácticas, da enumeração de coliformes totais e de termotolerantes e da caracterização física e físico-química das unidades amostrais de queijo Minas artesanal, de acordo com os experimentos caracterizados no item 3.1.1. (Quadro 6).

Os resultados estimados da enumeração de coliformes totais e de termotolerantes foram aproximados para fins de análise estatística. Por exemplo, naqueles resultados em que o log NMP/g foi < 0,48 adotou-se o valor 0,48.

Os resultados dos experimentos 1, 2 e 3, foram analisados de forma separada fazendo-se análises descritivas expressas em termos de média e coeficiente de variação (CV em %). O coeficiente de variação (CV), expresso em porcentagem, foi avaliado utilizando-se a classificação de Pimentel Gomes (2000) *apud* Ledo *et al.* (2008): valores menores que 10 %, o coeficiente de variação é baixo, ou seja, o experimento tem alta precisão; 10 % a 20 % são considerados médios e de boa precisão; 20 % a 30 %, alto e de baixa precisão; e maior que 30 %, muito alto e baixíssima precisão. Utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) a 5 % de significância para avaliar diferenças dos resultados de contagem de bactérias lácticas, enumeração de coliformes totais e termotolerantes, caracterização física e físico-química entre os tempos de maturação. A correlação de Pearson com 5 % de significância foi empregada para avaliar correlações entre algumas das variáveis estudadas.

Aos resultados dos experimentos 1, 2 e 3 foi aplicada a ANOVA com interação, seguido do teste de Tukey a 5 % de significância para avaliar o efeito do cadastramento das propriedades no IMA, do tempo e da temperatura e da forma de maturação, fora ou no interior de embalagens, nos resultados da contagem de bactérias lácticas, enumeração de coliformes totais e termotolerantes e da caracterização física e físico-química.

Aos resultados do experimento 4 também foram aplicadas análises descritivas expressas em termos de média e coeficiente de variação. Aos resultados da contagem de bactérias lácticas, de coliformes totais e termotolerantes e da caracterização física e físico-química foi aplicada a análise de regressão, com o ajuste do modelo mais adequado. A correlação de Pearson com 5 % de significância foi empregada para avaliar correlações entre algumas das variáveis estudadas.

O conjunto de dados foi avaliado utilizando-se o SAEG, versão 9.1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em queijo Minas artesanal

#### 4.1.1. Comparação de métodos de pesquisa de *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em queijo Minas artesanal

*Salmonella* sp. não foi detectada pelo método convencional no total de 63 unidades amostrais de queijos Minas artesanal, provenientes da região do Serro, M.G. Entretanto, nas mesmas unidades amostrais avaliadas, o método imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup>-SLM detectou *Salmonella* sp. em 3,17 % dos queijos (Tabela 2).

A contaminação de queijos artesanais, fabricados com leite cru, por *Salmonella* sp. é relatada em outros trabalhos e a ocorrência é variada. Esse patógeno não foi encontrado em 48 amostras de queijo Minas artesanal da Canastra (PEREIRA *et al.*, 1999) e em 30 amostras de queijo Minas artesanal do Serro (PINTO, 2004). Entretanto, foi detectada em 18,9 % das 37 amostras de queijo Minas artesanal de Araxá por Araújo (2004). Martins (2006) detectou a presença de *Salmonella* sp. em dois do total de 256 amostras de queijos Minas artesanal do Serro, o que corresponde a um valor de 0,78 % de contaminação. Aygun *et al.* (2005) também não detectaram *Salmonella* sp. em 50 amostras de queijos tradicionais da Turquia feito com leite cru de caprinos ou de bovinos. Mas a presença desse patógeno foi constatada em seis de 250 amostras de queijos feitos a partir do leite cru provenientes da Turquia e analisados no período de março de 2004 à março de 2005 (COLAK *et al.*, 2007).

**Tabela 2.** Resultados comparativos entre o método imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup>-SLM e o método convencional oficial usados na pesquisa de *Salmonella* sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal, produzidos na região do Serro, M.G.

| VIDAS <sup>®</sup> -SLM              | Método Convencional                  |                                      | Total de amostras |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
|                                      | N <sup>o</sup> de amostras positivas | N <sup>o</sup> de amostras negativas |                   |
| N <sup>o</sup> de amostras positivas | 0                                    | 2                                    | 2                 |
| N <sup>o</sup> de amostras negativas | 0                                    | 61                                   | 61                |
| <b>Total de amostras</b>             | 0                                    | 63                                   | 63                |

| Parâmetro                   | Valor           | Intervalo de Confiança |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|
| Sensibilidade <sup>a</sup>  | Nd <sup>*</sup> | Nd                     |
| Especificidade <sup>b</sup> | 96,83 %         | 89,14 - 99,13 %        |
| Acurácia <sup>c</sup>       | 96,83 %         | 89,14 - 99,13 %        |
| VPP <sup>d</sup>            | 0,00 %          | 0,00 - 65,76 %         |
| VPN <sup>e</sup>            | 100,00 %        | 94,08 - 100 %          |

\*Nd = Não determinado.

<sup>a</sup> Sensibilidade = Amostras positivas em ambos os métodos / Total de amostras positivas no método convencional x 100 = Nd.

<sup>b</sup> Especificidade = Amostras negativas em ambos os métodos / Total de amostras negativas no método convencional x 100 = 61 / 63 x 100 = 96,83 %.

<sup>c</sup> Acurácia = Resultados corretos / Total de amostras x 100 = (0 + 61) / 63 x 100 = 96,83 %.

<sup>d</sup> VPP (Valor Preditivo Positivo) = Amostras positivas em ambos os métodos / Total de amostras positivas no VIDAS<sup>®</sup> x 100 = 0 / 2 x 100 = 0,00 %.

<sup>e</sup> VPN (Valor Preditivo Negativo) = Amostras negativas em ambos os métodos / Total de amostras negativas no VIDAS<sup>®</sup> x 100 = 61 / 61 x 100 = 100,00 %.

Não foi possível fazer o cálculo do coeficiente de concordância *Kappa* entre o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM e o convencional na pesquisa de *Salmonella* sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal devido a existência de coluna nula na tabela 2 x 2 (Tabela 2). Resultados diferentes foram apresentados por Silva (2008), que encontrou concordância considerada perfeita (*Kappa* = 1) entre os métodos VIDAS<sup>®</sup>-SLM e o convencional ao analisar amostras de leite em pó contaminado com baixo número de células de *Salmonella* Enteritidis.

Foram observados 3,17 % de resultados falso-positivos pelo método VIDAS<sup>®</sup>-SLM. Os resultados falso-positivos podem ocorrer em função da especificidade do

anticorpo utilizado que pode apresentar reações cruzadas com outros antígenos correlacionados. Loguercio (2002) encontrou 1,82 % de resultados falso-positivos para *Salmonella* sp. pelo método de imunoensaio ELISA, com anticorpos monoclonais, nas 110 amostras de linguiça suína frescal analisadas. Já resultados falso-negativos podem advir do limite de detecção do método ou pelo fato do anticorpo utilizado não reagir com alguns dos sorotipos de *Salmonella* sp., o que não foi observado no presente estudo, mas pôde ser constatado no estudo de Vieira-Pinto *et al.* (2007) com 6,80 % de resultados falso-negativos para o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM em 235 amostras de carcaças de porco avaliadas.

O presente estudo mostrou que o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM apresentou elevado valor de especificidade e acurácia, mas baixo valor de sensibilidade, o que indicou que este método seria mais recomendado para a detecção de resultados negativos, já que o conceito de especificidade está relacionado à proporção dos resultados negativos corretos em relação ao total de amostras não contaminadas pelo microrganismo. Apenas o valor preditivo negativo mostrou-se alto o que indicou elevada probabilidade de um resultado negativo obtido pelo método VIDAS<sup>®</sup>-SLM ser de fato negativo (Tabela 2).

Estes resultados contrastam com os valores encontrados no estudo interlaboratorial que avaliou a detecção de *Salmonella* sp. pelo método VIDAS<sup>®</sup>-SLM em diferentes matrizes de alimentos com baixa e alta contaminação. Os valores de sensibilidade e especificidade, respectivamente, considerando baixa contaminação por *Salmonella* sp. em leite em pó desnatado e carne de porco crua foram ambos iguais a 100 %; em leite achocolatado foram de 97 % e 100 % e em amostras de caseína foram de 93 % e 100 % (AOAC, 2005). Von Rückert *et al.* (2008) encontraram valores de sensibilidade e especificidade para o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM de 85,7 % e 84,1 %, respectivamente em 70 amostras de carcaça de frango. Silva (2008) encontrou sensibilidade, especificidade, VPP, e VPN iguais a 100 % ao comparar o método VIDAS<sup>®</sup>-SLM e o convencional em 76 amostras de leite em pó contaminadas com *S. Enteritidis*.

Outros métodos imunoanalíticos avaliados também resultaram em achados distintos dos encontrados no presente estudo. Tapchaisri *et al.* (1999) compararam a detecção de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos pelo método imunoenzimático dot-ELISA, utilizando-se anticorpos monoclonais, com a metodologia convencional e constataram sensibilidade de 93,33 %, especificidade de 91,76 %, VPP de 66,66 % e VPN igual a 98,73 %. Loguercio (2002) encontrou sensibilidade de 100 %, VPN igual a 98,73 %.

especificidade de 98 %, VPP de 87 % e VPN igual a 100 % ao avaliar o método ELISA indireto, baseado em anticorpos monoclonais específicos para *Salmonella* sp., com relação ao método convencional.

Assim como o método convencional, não se detectou *Salmonella* sp. nas 63 unidades amostrais de queijos Minas artesanal do Serro pelo método PCR-BAX<sup>®</sup>. Em estudos onde se utiliza amostras artificialmente contaminadas com o referido patógeno resultados diferenciados são observados. Silva (2008) encontrou concordância considerada razoável a boa ( $Kappa = 0,64$ ) entre os métodos PCR-BAX<sup>®</sup> e o convencional em 72 amostras de leite em pó contaminado com baixo número de células de *S. Enteritidis* além de sensibilidade igual a 94 %, especificidade e VPP iguais a 100 % e VPN igual a 50 %. Em queijos com baixa contaminação por *Salmonella* sp. (AOAC, 2006 b) foi encontrada sensibilidade de 76 % com 24 % de falsos negativos para o método PCR-BAX<sup>®</sup>. Nesse mesmo estudo, as análises de amostras de suco de laranja e peixe com baixa contaminação por *Salmonella* sp. resultou em sensibilidade de 95 % e 98 %, respectivamente.

Em outros estudos também foram observados resultados contrastantes quanto à comparação de métodos fundamentados na amplificação de DNA com o método convencional de análise de *Salmonella* sp. em alimentos. Tapchaisri *et al.* (1999) encontraram sensibilidade de 100 %, especificidade de 91,58 %, VPP de 65,21 % e VPN de 100 % na detecção de *Salmonella* sp. em amostras de alimentos por PCR. Von Rückert *et al.* (2008) encontraram sensibilidade de 62,5 % e especificidade de 73,2 % quando avaliaram o método PCR na detecção de *Salmonella* sp. em 90 unidades amostrais de carcaças de frango e concluíram que o método de PCR e VIDAS<sup>®</sup> foram mais eficientes do que o método convencional para a detecção de *Salmonella* sp. em carcaças de frango e adequados para o monitoramento no sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

No presente estudo, *L. monocytogenes* não foi detectada em 48 unidades amostrais de queijo Minas artesanal analisadas tanto pelo método convencional quanto pelo método VIDAS<sup>®</sup>-LMO. A contaminação de queijo Minas artesanal da Canastra por *L. monocytogenes* foi relatada por Ornelas (2005) embora em outros trabalhos não tenham encontrado a contaminação desse tipo de queijo por este patógeno (PINTO, 2004; ARAÚJO, 2004; MARTINS, 2006). Arslan e Özdemir (2008) também detectaram *L. monocytogenes* em 13 queijos brancos da Turquia, feitos com leite cru de origem bovina no universo de 142 queijos avaliados. Já Nero (2005) não encontrou

*Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* em amostras de leite cru de quatro regiões produtoras de leite do Brasil.

Apesar da não detecção de *L. monocytogenes* neste trabalho pelo método VIDAS<sup>®</sup> a sua eficiência já foi relatada por Gangar *et al.* (2000) que avaliaram comparativamente o método VIDAS<sup>®</sup>-LIS e o método de cultura tradicional para detecção de *Listeria* sp. em alimentos e encontram 86 % de concordância. De 1558 amostras testadas, 935 foram positivas: 839 pelo método VIDAS<sup>®</sup>-LIS e 809 pelo método de cultura de padrão. Silbernagel *et al.* (2004) avaliaram o método VIDAS<sup>®</sup>-LMO em amostras de sorvete, queijo, rosbife cozido, vagens congeladas e tilápia congelada. Do total de 1152 amostras avaliadas, 448 foram positivas pelo VIDAS<sup>®</sup>-LMO e 457 pelo método tradicional sendo que não houve diferença estatística entre ambos os métodos ( $\chi^2 = 0,36$ ,  $p < 0,05$ ).

O método imunoenzimático, fundamentado na reação antígeno-anticorpo do tipo sanduíche, *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> também foi avaliado para detectar *L. innocua* em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas (Tabela 3). Ressalta-se que a contaminação das unidades amostrais analisadas com *L. innocua* permitiu uma melhor avaliação do desempenho do método rápido *Lateral Flow System*<sup>TM</sup>, pois aumentou a ocorrência do patógeno.

A concordância entre o método *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> e o método convencional foi baixa pelo valor de *Kappa*. Além disso, constatou-se um elevado percentual de falso-negativos (33,33 %) pelo método *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> (Tabela 3). A sensibilidade, a especificidade, a acurácia e os valores preditivos positivos e negativos obtidos pelo método imunoenzimático *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> estão apresentados na Tabela 3. Observa-se baixo valor de sensibilidade do método, ou seja, a probabilidade do método *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> registrar resultados positivos na presença do microrganismo foi baixa, enquanto a especificidade foi considerada elevada.

Destaca-se que os valores preditivos são influenciados pela sensibilidade e especificidade do método e condicionados pela prevalência do patógeno em amostras de queijo artesanal. Assim, a elevada especificidade do método *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> gerou um elevado valor preditivo positivo que indica maior segurança de que uma unidade amostral de queijo com resultado positivo para *Listeria* sp. esteja de fato contaminado. Entretanto, Murtiningsih e Cox (1997) ao avaliarem a eficiência do *Serobact*<sup>TM</sup>, um reagente de aglutinação usado para detecção de *Listeria* sp., em relação

ao método ISO 11290-1 em 63 amostras de alimentos apresentaram sensibilidade de 86,60 %, especificidade de 87,8 %, VPP de 65 % e VPN de 96 %.

**Tabela 3.** Resultados comparativos entre o método imunoenzimático *Lateral Flow System*<sup>TM</sup> e o método convencional oficial usados na pesquisa de *Listeria* sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal, produzidos na região do Serro, M.G.

| <i>Lateral Flow System</i> <sup>TM</sup> | Método Convencional      |                          | Total de amostras |
|--|--------------------------|--------------------------|-------------------|
|  | Nº de amostras positivas | Nº de amostras negativas |                   |
| Nº de amostras positivas                 | 8                        | 0                        | 8                 |
| Nº de amostras negativas                 | 5                        | 2                        | 7                 |
| <b>Total de amostras</b>                 | 13                       | 2                        | 15                |

| Parâmetro                   | Valor    | Intervalo de Confiança |
|-----------------------------|----------|------------------------|
| <i>Kappa</i>                | 0,299    | -0,06 - 0,66           |
| p <i>Kappa</i>              | 0,052    | -                      |
| Sensibilidade <sup>a</sup>  | 61,54 %  | 35,52 - 82,29 %        |
| Especificidade <sup>b</sup> | 100,00 % | 34,29 – 100,00 %       |
| Acurácia <sup>c</sup>       | 66,67 %  | 41,71 - 84,22 %        |
| VPP <sup>d</sup>            | 100,00 % | 67,52 – 100,00 %       |
| VPN <sup>e</sup>            | 28,57 %  | 8,22 - 64,11 %         |

<sup>a</sup> Sensibilidade = Amostras positivas em ambos os métodos / Total de amostras positivas no método convencional x 100 = 8 / 13 x 100 = 61,54 %.

<sup>b</sup> Especificidade = Amostras negativas em ambos os métodos / Total de amostras negativas método convencional x 100 = 2 / 2 x 100 = 100,00 %.

<sup>c</sup> Acurácia = Resultados corretos / Total de amostras x 100 = (8 + 2) / 15 x 100 = 66,67 %.

<sup>d</sup> VPP (Valor Preditivo Positivo) = Amostras positivas em ambos os métodos / Total de amostras positivas no VIDAS<sup>®</sup> x 100 = 8 / 8 x 100 = 100,00 %.

<sup>e</sup> VPN (Valor Preditivo Negativo) = Amostras negativas em ambos os métodos / Total de amostras negativas no VIDAS<sup>®</sup> x 100 = 2 / 7 x 100 = 28,57 %.

Baseado nos resultados obtidos, pode-se sugerir que a detecção de microrganismos como *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. depende da matriz alimentar avaliada. A presença de microbiota heterogênea em queijos elaborados com leite cru, em virtude da presença de coliformes e bactérias lácticas, entre outros microrganismos (ARAÚJO, 2004; PINTO, 2004), pode prejudicar a recuperação de *Salmonella* sp. e *L.*

*monocytogenes* e comprometer o resultado principalmente quando estudos demonstram efeito inibidor dessa microbiota contra patógenos.

A confirmação de que a microbiota endógena do leite cru pode interferir na multiplicação e sobrevivência de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* foi relatada no estudo de Nero (2005) que encontrou que de 360 colônias de bactérias isoladas de leite cru, 9,2 % e 25,3 % exerciam atividade inibitória contra *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, respectivamente. Nero *et al.* (2007) no seu estudo sobre a influência da microbiota endógena do leite cru contra *S. Enteritidis* e *L. monocytogenes* por metodologia convencional encontraram que a recuperação *S. Enteritidis* foi possível quando a contagem do patógeno estava acima de 3,7 log UFC/mL independente da concentração da microbiota endógena. Nos tratamentos com 2,5 a 3,0 log UFC/mL de *S. Enteritidis* a recuperação do patógeno só foi possível quando a concentração da microbiota endógena estava abaixo de 5,5 log UFC/mL. *L. monocytogenes* em número abaixo de 2 log UFC/mL só foi possível de ser recuperado quando a microbiota endógena estava abaixo de 4 log UFC/mL.

Em adição, De Médici *et al.* (1998) observaram que a presença de microbiota competidora constituída por  $6,0 \times 10^6$  UFC/mL de *Citrobacter freundii* e números baixos de 1 a 2 UFC/mL de *Salmonella* sp. gerou resultados falso-negativos pelo método VIDAS<sup>®</sup>-ICS. Pinto (2008) constatou a redução de um ciclo logarítmico na população de *L. innocua* aos 60 dias de maturação do queijo Minas artesanal, independente do número inicial de *L. innocua* inoculada no leite, entretanto a microbiota endógena não foi capaz de eliminar *L. innocua*. O autor sugeriu então que a ausência de *L. monocytogenes* em queijos do Serro, relatados em diversos trabalhos científicos, pode estar relacionada à ausência deste microrganismo no leite.

Os resultados negativos apresentados pelos métodos rápidos na pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* no presente estudo podem ser decorrentes do número de unidades amostrais analisadas que influencia diretamente a possibilidade de ocorrência de amostras contaminadas. Outro fator que deve ser levado em consideração são os números baixos dos patógenos presentes nas unidades amostrais aliado aos elevados limites de detecção requeridos pelos métodos rápidos sendo que a etapa de pré-enriquecimento de 16 a 20 horas requerido para o método de PCR-BAX<sup>®</sup> pode não ter permitido a recuperação de células de *Salmonella* sp. no homogenato na presença de elevado número de células competidoras. A degradação da seqüência de DNA alvo e a presença de interferentes do alimento (GLYNN *et al.*, 2006) incluindo gordura, cálcio,

entre outros pode também comprometer o desempenho da reação da PCR e assim, influenciar os valores de concordância, especificidade e sensibilidade.

Os resultados negativos observados pelo método convencional podem estar relacionados às variações na expressão gênica dos microrganismos devido a fatores ambientais que pode alterar características fenotípicas e afetar o poder discriminatório dos testes bioquímicos. Outro problema são as células viáveis não-cultiváveis, que não são detectadas pelas técnicas convencionais de cultivo (MALORNY *et al.*, 2003).

Considerando os achados do presente estudo, os melhores resultados foram observados pelos métodos convencional e de PCR-BAX<sup>®</sup> na detecção de *Salmonella sp.*, pelos métodos convencional e VIDAS<sup>®</sup>-LMO na detecção de *L. monocytogenes* e pelo método convencional para detecção de *L. innocua*.

#### **4.1.2. *Salmonella sp.* e *Listeria sp.* em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades cadastradas no IMA**

Nenhuma das 12 unidades amostrais de queijo Minas artesanal embaladas à vácuo, provenientes da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G. e avaliadas com 37 e 69 dias de maturação, apresentou contaminação por *Salmonella sp.* e por *L. monocytogenes* quando analisadas pelo método convencional e pelo método imunoenzimático VIDAS<sup>®</sup>. Resultado semelhante foi encontrado na pesquisa de *Salmonella sp.* nas mesmas unidades amostrais pelo método PCR.

A contaminação de queijo Minas artesanal com patógenos como *Salmonella sp.* e *L. monocytogenes* é citada na literatura (PAK *et al.*, 2002; VITAS *et al.*, 2003; ARAÚJO, 2004) e, embora as condições que se instalam no produto durante a maturação, como redução do pH e da atividade de água e a atividade antagonista de bactérias lácticas, possam inibir a multiplicação de muitos patógenos, a sobrevivência pode ocorrer. Sálvio (1993) verificou sobrevivência de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) quando a maturação dos queijos Minas ocorreu sob refrigeração (5 a 10 °C) ou à 12 °C aos 60 dias de maturação. Martins (2006) também verificou sobrevivência de *Salmonella sp.* em amostras de queijo Minas artesanal do Serro maturadas sob temperatura de refrigeração com oito e 15 dias, entretanto a partir do 22º dia de maturação *Salmonella sp.* não foi mais detectada.

A ausência desses patógenos nas unidades amostrais analisadas no presente estudo pode indicar ações que minimizam a contaminação como a obrigatoriedade da adoção de BPF por produtores que repassam queijos para serem comercializados pela Cooperativa dos Produtores Rurais. Outro fator que pode contribuir para a ausência dos patógenos nas unidades amostrais analisadas é a microbiota diversificada e competitiva presente nos queijos artesanais. Apesar de não se utilizar culturas bacterianas iniciadoras industriais no processo de fabricação do queijo Minas artesanal, bactérias lácticas naturalmente presentes no leite cru (BERESFORD *et al.*, 2001) já foram evidenciadas no fermento natural ou “pingo”. A atividade antimicrobiana *in vitro* de bactérias lácticas isoladas de queijo Minas do Serro sobre *L. monocytogenes*, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus* foi relatada por Alexandre *et al.* (2001). Ácidos orgânicos, água oxigenada e bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas possuem efeitos comprovadamente inibitórios sobre a microbiota deterioradora e patógenos como *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes*, sendo amplamente utilizada na indústria de alimentos fermentados (HUGAS, 1998; CARNIO *et al.*, 1999; BALDUINO *et al.*, 1999). Em adição, há relatos na literatura da ação inibitória de alguns componentes no leite como ácidos graxos e lactoferrina sobre *S. Enteritidis* (FACON e SKURA, 1996; SPRONG *et al.*, 2001).

O Regulamento da Lei Estadual 14.185 estabelece ausência de *Salmonella* sp. e de *L. monocytogenes* em 25 g de unidade amostral de queijo Minas artesanal e, dessa forma, os resultados encontrados no presente estudo indicam que as unidades amostrais analisadas atendem ao previsto pela legislação vigente.

#### **4.1.3. *Salmonella* sp. e *Listeria* sp. em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades cadastradas e não cadastradas no IMA**

*Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* não foram detectados nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes tanto de propriedades não cadastradas quanto de propriedade cadastrada no IMA situadas na região do Serro, M.G. por metodologia convencional e rápida nos dois tempos de maturação avaliados (Tabela 4).

Ressalta-se que as unidades amostrais de propriedades não cadastradas no IMA avaliadas antes de 60 dias de maturação possuíam cinco e 12 dias de maturação e as unidades amostrais avaliadas após 60 dias possuíam 66 e 75 dias de maturação. Em

adição, as unidades amostrais de propriedade cadastrada no IMA avaliadas antes de 60 dias de maturação possuíam um tempo de maturação entre sete e 21 dias e as avaliadas após 60 dias de maturação possuíam um tempo de maturação entre 60 e 67 dias.

**Tabela 4.** Pesquisa de *Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* por métodos convencional e rápidos em unidades amostrais de queijo Minas artesanal proveniente de propriedades cadastradas e não cadastradas no IMA e avaliadas antes e após de 60 dias de maturação.

| Teste               | Propriedade não cadastrada no IMA |                   |                 |      | Propriedade cadastrada no IMA |      |                 |      |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------|------|-------------------------------|------|-----------------|------|
|                     | <i>Salmonella</i>                 |                   | <i>Listeria</i> |      | <i>Salmonella</i>             |      | <i>Listeria</i> |      |
|                     | < 60 <sup>a</sup>                 | > 60 <sup>b</sup> | < 60            | > 60 | < 60                          | > 60 | < 60            | > 60 |
| <b>Convencional</b> | 0/10 <sup>c</sup>                 | 0/10              | 0/10            | 0/10 | 0/8                           | 0/8  | 0/8             | 0/8  |
| <b>Imunológico</b>  | 0/10                              | 0/10              | 0/10            | 0/10 | 0/8                           | 0/8  | 0/8             | 0/8  |
| <b>PCR</b>          | 0/10                              | 0/10              | Nd <sup>c</sup> | Nd   | 0/8                           | 0/8  | Nd              | Nd   |

<sup>a</sup> < 60: menor que 60 dias de maturação; <sup>b</sup> > 60: maior que 60 dias de maturação; <sup>c</sup> amostras positivas / número total de amostras; <sup>d</sup> Nd: não determinado.

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicam que, todas as unidades amostrais de queijo Minas artesanal do Serro atenderam ao previsto no Regulamento da Lei Estadual 14.185, que estabelece ausência de *Salmonella* em 25 g. A ausência de *Salmonella* sp. nas unidades amostrais avaliadas aos 60 dias indica que a maturação garantiu segurança microbiológica do queijo.

Sabe-se que a contaminação do queijo com patógenos frequentemente é atribuída às condições de obtenção do leite, como saúde do rebanho, saúde do ordenhador, condições higiênicas adotadas na ordenha e de fabricação que podem acarretar na contaminação durante o processamento, armazenamento e transporte. Entretanto, a ausência destes patógenos nestas amostras pode estar relacionada com a maior contagem de bactérias lácticas e maior número de coliformes totais e termotolerantes que representam maior população de microrganismos competidores nos queijos produzidos em propriedades que não adotam as BPF. A interferência da microbiota competidora na recuperação de *Salmonella* sp. já foi demonstrada por De Médici *et al.* (1998) e Nero *et al.* (2007).

#### 4.1.4. Sobrevivência de *L. innocua* em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas

Na Tabela 5 está apresentada a evolução da detecção de *L. innocua* em queijo Minas artesanal feito com leite cru artificialmente contaminado, com aproximadamente 10 UFC/mL, produzidos na região do Serro M.G. Nota-se que apenas pelo método convencional foi possível detectar *L. innocua* nas unidades amostrais em todos os tempos de maturação avaliados.

**Tabela 5.** Sobrevivência de *L. innocua* em unidades amostrais de queijo Minas artesanal produzidas na região do Serro, M.G. durante 60 dias de maturação.

| Resultado do Teste  | Tempo de Maturação (dias) |     |     |     |     |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
|                     | 5                         | 15  | 30  | 45  | 60  |
| <b>Convencional</b> | 3/3 <sup>a</sup>          | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 |
| <b>Imunológico</b>  | 1/3                       | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 0/3 |

<sup>a</sup> Amostras positivas / número total de amostras.

Por outro lado, estudos apontam para uma inativação segura de *L. monocytogenes* em queijo Suíço aos 60 dias de maturação (BUAZZY *et al.*, 1992) e durante a maturação de queijo Parmesão por 21 a 112 dias (YOUSEF & MARTH, 1990). Sálvio (1993) não detectou *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em amostras de queijo Minas artificialmente contaminados com 10<sup>6</sup> UFC/mL aos 60 dias de maturação à temperatura ambiente (22,6 a 26,6 °C).

Entretanto, Leuschner e Boughtflower (2002) detectaram *Salmonella* sp., *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em queijos elaborados com leite intencionalmente contaminados com 1 a 10 UFC/mL dos referidos patógenos. No produto final, os microrganismos pesquisados estavam numa concentração entre 1 a 50 UFC/g mesmo após os queijos passarem por todas as etapas de fabricação e maturação. Rogga *et al.* (2005) observaram que o tipo de queijo, industrial ou artesanal, e a temperatura de armazenamento não interferiram de forma significativa ( $p < 0,05$ ) na sobrevivência de *L. monocytogenes* em amostras inoculadas com 10<sup>3</sup> UFC/mL. A contaminação inicial de 10<sup>3</sup> UFC/mL ou de 10<sup>7</sup> UFC/mL de *L. monocytogenes* não afetou de forma significativa ( $p < 0,05$ ) o número de sobreviventes do patógeno em queijo Galotyri industrial maturado por 28 dias à temperatura de estocagem de 4 °C.

Gameiro *et al.* (2007), ao estudarem a evolução de *L. monocytogenes* em queijos produzidos tradicionalmente em Portugal, a partir de leite cru de ovelhas, observou queda na contagem do referido patógeno entre o 42º e o 60º dia e também para o 120º dia, entretanto as condições microbiológicas do queijo ainda estavam em desacordo com o regulamento vigente no país que recomenda valores menores de 100 UFC/g de *L. monocytogenes*.

No presente estudo, a presença de *L. innocua* em uma das amostras avaliadas demonstrou que o prazo de 60 dias para a comercialização de queijo Minas artesanal proposto pela legislação vigente não garante qualidade microbiológica. *L. innocua* não é patogênica para o homem e apresenta comportamento semelhante ao de *L. monocytogenes* quando submetida a tratamentos físicos e químicos. Esta característica permite que *L. innocua* seja usada como indicador biológico do comportamento de *L. monocytogenes* (KAMAT e NAIR, 1996).

## **4.2. Características microbiológicas, físicas e físico-químicas de queijo Minas artesanal**

### **4.2.1. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro**

A população média de bactérias lácticas detectadas nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro variou significativamente ( $p < 0,05$ ) de 7,2 log UFC/g aos 37 dias de maturação para 7,0 log UFC/g aos 69 dias de maturação, com o coeficiente de variação considerado baixo de 8,99 % (Tabela 6).

A contaminação do queijo Minas artesanal por coliformes totais variou de 1,38 aos 37 dias de maturação para 0,89 log NMP/g aos 69 dias de maturação e a contaminação por coliformes termotolerantes variou de 1,38 para 0,80 log NMP/g no mesmo período avaliado ambos sem diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 6).

**Tabela 6.** Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G., analisadas com 37 e 69 dias de maturação.

| Amostra | Maturação (dias) | Bactérias lácticas | Coliformes |                 |
|---------|------------------|--------------------|------------|-----------------|
|         |                  |                    | Totais     | Termotolerantes |
| 16-1    | 37               | 6,69               | < 0,48     | < 0,48          |
| 19-1    |                  | 7,20               | 1,36       | 1,36            |
| 24-1    |                  | 6,64               | 0,56       | 0,56            |
| 25-1    |                  | 7,04               | 2,38       | 2,38            |
| 44-1    |                  | 8,62               | 0,48       | 0,48            |
| 89-1    |                  | 6,98               | > 3,04     | > 3,04          |
| 16-2    | 69               | 7,00               | 0,50       | < 0,48          |
| 19-2    |                  | 7,00               | 0,50       | 0,48            |
| 24-2    |                  | 6,28               | 1,04       | 0,50            |
| 25-2    |                  | 7,90               | < 0,48     | < 0,48          |
| 44-2    |                  | 6,75               | < 0,48     | < 0,48          |
| 89-2    |                  | 7,18               | 2,38       | 2,38            |

Os resultados obtidos encontram-se de acordo o Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002 que estabelece um limite máximo de coliformes totais de 4 log e de coliformes termotolerantes de 3,7 log. A baixa contaminação dos queijos analisados por coliformes pode indicar a eficiência da adoção de BPF na ordenha e na fabricação dos queijos, além da ação inibitória de bactérias lácticas, frente a alguns microrganismos do grupo coliforme relatada por Guedes-Neto *et al.* (2005).

Em geral, com 32 dias de maturação, as características físicas e físico-químicas de queijos maturados em embalagens à vácuo e sob temperatura de refrigeração foram mantidas (Tabela 7).

Não foi observada variação significativa ( $p > 0,05$ ) para massa e dimensões (diâmetro, altura e volume) das unidades amostrais de queijo Minas artesanal nos dois tempos de maturação avaliados. Resultados médios de diâmetro e altura de queijos Minas artesanal do Serro semelhantes aos do presente estudo foram encontrados por Machado *et al.* (2004), embora esses autores tenham registrado valores médios de massa e de cloretos de 927,3 g e 4,39 g/100 g, respectivamente. A variação encontrada

nas dimensões dos queijos relaciona-se à diferença no tamanho das fôrmas utilizadas na produção do queijo e a falta de padronização da salga durante a manufatura dos queijos, sendo que ambas podem explicar as diferenças nos teores de cloretos e NaCl entre os estudos e também justificam os valores elevados do coeficiente de variação (Tabela 7).

**Tabela 7.** Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G., analisadas com 37 e 69 dias de maturação.

| Análises                                  | Maturação (dias) |          | CV (%) |
|---|------------------|----------|--------|
|   | 37               | 69       |        |
| <b>Massa (g)</b>                          | 843,56 a         | 844,44 a | 6,343  |
| <b>Diâmetro (cm)</b>                      | 13,37 a          | 13,05 a  | 3,881  |
| <b>Altura (cm)</b>                        | 5,35 a           | 5,32 a   | 5,573  |
| <b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>            | 750,61 a         | 711,81 a | 8,916  |
| <b>Cloretos (%)</b>                       | 0,313 a          | 0,309 a  | 24,821 |
| <b>NaCl (%)</b>                           | 0,516 a          | 0,508 a  | 24,757 |
| <b>Umidade e voláteis (%)</b>             | 49,10 a          | 50,04 a  | 6,261  |
| <b>Sólidos totais (%)</b>                 | 50,89 a          | 49,96 a  | 6,155  |
| <b>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</b>  | 0,913 b          | 0,924 a  | 0,577  |
| <b>pH</b>                                 | 5,24 b           | 5,66 a   | 5,675  |
| <b>Acidez titulável (% ácido láctico)</b> | 1,081 a          | 0,958 a  | 26,141 |

As médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade por ANOVA.

De acordo com o Regulamento da Lei 14.185, o queijo Minas artesanal pode conter umidade expressa em base seca de até 54 %, portanto todas as amostras analisadas estavam dentro do limite preconizado.

Beresford *et al.* (2001) apontam que a manutenção dos valores da A<sub>w</sub> pode ser realizada com o controle da perda de umidade dos queijos pelo incremento da umidade relativa dentro da sala de maturação ou pela utilização de embalagens. Isto provavelmente explica a variação de A<sub>w</sub> nos dois períodos avaliados.

Durante a maturação foi detectado aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal. Os valores de pH aos 69 dias de maturação variaram em torno de 5,66 % e foram valores superiores aos encontrados

por Machado *et al.* (2004). Esse fato pode ser explicado uma vez que Machado *et al.* (2004) analisaram amostras com tempo médio de maturação de seis dias enquanto que, no presente estudo, analisou-se amostras com tempo médio de maturação de 53 dias. Dessa maneira, como o grau de proteólise está relacionado ao tempo de fabricação, ou seja, os queijos mais envelhecidos podem apresentar maior grau de degradação de proteínas e, conseqüentemente, pH mais elevado.

Na Tabela 8 estão apresentados os valores do coeficiente de correlação de Pearson entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos das unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro.

**Tabela 8.** Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal da Cooperativa dos Produtores Rurais do Serro, M.G.

| Parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos |   |   |    |   |   |       |       |      |       |                |       |        |
|---|---|---|----|---|---|-------|-------|------|-------|----------------|-------|--------|
|   | B | C | CT | M | V | Cl    | N     | U    | S     | A <sub>w</sub> | P     | A      |
| B   | 1 |   |    |   |   | -0,04 | -0,04 | 0,21 | -0,21 | -0,22          | 0,13  | -0,03  |
| C   |   | 1 |    |   |   |       |       |      |       |                |       |        |
| CT  |   |   | 1  |   |   |       |       |      |       |                |       |        |
| M   |   |   |    | 1 |   |       |       |      |       |                |       |        |
| V   |   |   |    |   | 1 |       |       | 0,15 | -0,15 | -0,25          |       |        |
| Cl  |   |   |    |   |   | 1     |       |      |       | -0,47          | -0,32 |        |
| N   |   |   |    |   |   |       | 1     |      |       | -0,47          | -0,32 |        |
| U   |   |   |    |   |   |       |       | 1    |       | 0,17           |       |        |
| S   |   |   |    |   |   |       |       |      | 1     | -0,17          |       |        |
| A <sub>w</sub>  |   |   |    |   |   |       |       |      |       | 1              |       |        |
| P   |   |   |    |   |   |       |       |      |       |                | 1     | -0,80* |
| A   |   |   |    |   |   |       |       |      |       |                |       | 1      |

B = bactérias lácticas; C = coliformes totais; CT = coliformes termotolerantes; M = massa; V = volume; Cl = cloretos; N = cloreto de sódio; U = umidade e voláteis; S = sólidos totais; A<sub>w</sub> = atividade de água; P = pH; A = acidez titulável.

\* p < 0,05.

Não se observou, no presente estudo, variação significativa nos valores de ácido láctico. Entretanto, houve uma correlação negativa significativa (Tabela 8) entre a acidez titulável e o pH o que indicou que, a medida que o pH aumentou, a acidez titulável

diminuiu. De maneira semelhante, Martins (2006) também não encontrou variações significativas ( $p < 0,05$ ) em queijos maturados sob temperatura ambiente e a correlação estabelecida entre pH e acidez titulável também foi negativa ( $r = -0,46$ ,  $p < 0,01$ ). Segundo Furtado (1997) *apud* Martins (2006), o cálcio presente no queijo pode reagir com o ácido láctico produzido e ser convertido em lactato de cálcio mantendo-se em concentrações de equilíbrio mesmo durante a maturação. O ácido láctico também pode ser utilizado como fonte de carbono pela microbiota secundária (fungos e leveduras principalmente) e a proteólise decorrente do processo de maturação pode aumentar os valores de pH o que justifica a correlação inversa entre pH e acidez titulável (SOUZA *et al.*, 2003).

#### **4.2.2. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA**

Observou-se que, em média, houve redução significativa ( $p < 0,05$ ) da contagem de bactérias lácticas após 60 dias de maturação de 8,48 para 7,33 log UFC/g, com coeficiente de variação considerado baixo de 3,521 % nas unidades amostrais provenientes de propriedades não cadastradas no IMA (Tabela 9).

A contaminação por coliformes totais variou significativamente de valores iniciais de 4,20 para finais de 1,13 log NMP/g e a de coliformes termotolerantes também variou significativamente de 3,16 para 0,78 log NMP/g ao final da maturação (Tabela 9).

A elevada contaminação inicial por coliformes pode indicar a falta de adoção das BPF na ordenha e na fabricação dos queijos. Ao final de 60 dias de maturação, a população de coliformes já se encontrava dentro dos limites preconizados pelo Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. Ressalta-se que a maturação é utilizada para realçar as características sensoriais dos queijos e possui papel coadjuvante na garantia da segurança alimentar desse produto sendo que os queijos devem ser produzidos com alta qualidade para atender a rigorosos padrões microbiológicos que asseguram a sua inocuidade, já que são fabricados a partir de leite cru.

**Tabela 9.** Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

| <b>Amostra</b> | <b>Maturação<br/>(dias)</b> | <b>Bactérias<br/>lácticas</b> | <b>Coliformes<br/>Totais</b> | <b>Coliformes<br/>Termotolerantes</b> |
|----------------|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| B1             | 5                           | 8,95                          | 4,66                         | 2,56                                  |
| B2             |                             | 8,62                          | > 5,04                       | 2,87                                  |
| B3             |                             | 8,58                          | 4,04                         | < 2,48                                |
| B4             |                             | 8,71                          | 4,04                         | < 2,48                                |
| B5             |                             | 8,56                          | 4,04                         | 2,87                                  |
| A1             | 12                          | 8,18                          | > 4,04                       | > 4,04                                |
| A2             |                             | 8,30                          | > 4,04                       | 4,04                                  |
| A3             |                             | 8,38                          | > 4,04                       | 3,66                                  |
| A4             |                             | 8,45                          | > 4,04                       | 2,54                                  |
| A5             |                             | 8,08                          | > 4,04                       | > 4,04                                |
| B1             | 66                          | 7,23                          | < 0,48                       | < 0,48                                |
| B2             |                             | 7,53                          | < 0,48                       | < 0,48                                |
| B3             |                             | 6,93                          | < 0,48                       | < 0,48                                |
| B4             |                             | 7,26                          | < 0,48                       | < 0,48                                |
| B5             |                             | 7,08                          | < 0,48                       | < 0,48                                |
| A1             | 75                          | 7,74                          | 2,66                         | 1,63                                  |
| A2             |                             | 7,84                          | 0,96                         | 0,96                                  |
| A3             |                             | 7,04                          | 1,97                         | < 0,48                                |
| A4             |                             | 7,36                          | 1,97                         | 0,96                                  |
| A5             |                             | 7,34                          | 1,36                         | 1,36                                  |

A maturação por 60 dias sob temperatura ambiente e fora das embalagens das unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA promoveu variação média significativa dos valores físicos e físico-químicos, exceto para o teor de ácido láctico (Tabela 10). Essas variações foram decorrentes da perda de umidade durante o processo de maturação.

**Tabela 10.** Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

| Análises                                  | Maturação (dias) |          | CV (%) |
|---|------------------|----------|--------|
|   | > 60             | > 60     |        |
| <b>Massa (g)</b>                          | 995,14 a         | 500,43 b | 13,883 |
| <b>Diâmetro (cm)</b>                      | 15,23 a          | 14,03 b  | 8,123  |
| <b>Altura (cm)</b>                        | 4,53 a           | 3,4 b    | 15,016 |
| <b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>            | 826,50 a         | 527,67 b | 20,382 |
| <b>Cloretos (%)</b>                       | 0,475 a          | 0,568 b  | 16,026 |
| <b>NaCl (%)</b>                           | 0,783 a          | 0,937 b  | 16,007 |
| <b>Umidade e voláteis (%)</b>             | 54,34 a          | 40,17 b  | 2,509  |
| <b>Sólidos totais (%)</b>                 | 45,66 b          | 59,82 a  | 2,248  |
| <b>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</b>  | 0,915 a          | 0,871 b  | 0,827  |
| <b>pH</b>                                 | 5,72 a           | 6,47 b   | 5,082  |
| <b>Acidez titulável (% ácido láctico)</b> | 0,827 a          | 0,725 a  | 24,723 |

As médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade por ANOVA.

Na Tabela 11 estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas. O decréscimo da população de bactérias lácticas foi diretamente influenciado pela redução da atividade de água e umidade. Já o aumento dos teores de NaCl, cloretos e sólidos totais influenciaram inversamente a contagem de bactérias lácticas por interferirem na disponibilidade de água do queijo.

A perda de volume dos queijos relacionou-se diretamente com a umidade e, conseqüentemente, com o decréscimo da A<sub>w</sub>. Observou-se correlação inversa e significativa entre pH e acidez titulável.

**Tabela 11.** Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedades não cadastradas no IMA.

| <b>Parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos</b> |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
|--|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------------------|----------|----------|
|  | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>CT</b> | <b>M</b> | <b>V</b> | <b>Cl</b> | <b>N</b> | <b>U</b> | <b>S</b> | <b>A<sub>w</sub></b> | <b>P</b> | <b>A</b> |
| <b>B</b>   | 1        |          |           |          |          | -0,51*    | -0,51*   | 0,90*    | -0,90*   | 0,85*                | -0,81*   | 0,35     |
| <b>C</b>   |          | 1        |           |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>CT</b>  |          |          | 1         |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>M</b>   |          |          |           | 1        |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>V</b>   |          |          |           |          | 1        |           |          | 0,73*    | -0,73*   | 0,74*                |          |          |
| <b>Cl</b>  |          |          |           |          |          | 1         |          |          |          | -0,58*               | 0,24     |          |
| <b>N</b>   |          |          |           |          |          |           | 1        |          |          | -0,58*               | 0,24     |          |
| <b>U</b>   |          |          |           |          |          |           |          | 1        |          | 0,95*                |          |          |
| <b>S</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          | 1        | -0,95*               |          |          |
| <b>A<sub>w</sub></b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          | 1                    |          |          |
| <b>P</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      | 1        | -0,65*   |
| <b>A</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      |          | 1        |

B = bactérias lácticas; C = coliformes totais; CT = coliformes termotolerantes; M = massa; V = volume; Cl = cloretos; N = cloreto de sódio; U = unidade e voláteis; S = sólidos totais; A<sub>w</sub> = atividade de água; P = pH; A = acidez titulável.

\* p < 0,05.

#### **4.2.3. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA**

Observou-se que, em média, houve redução significativa da contagem de bactérias lácticas após 60 dias de maturação de 7,95 para 5,7 log UFC/g com coeficiente de variação baixo de 9,273 % nas unidades amostrais proveniente da propriedade cadastrada no IMA (Tabela 12).

A contaminação por coliformes totais variou de 2,75 para 0,48 log NMP/g após 60 dias de maturação e a contaminação por coliformes termotolerantes variou de 1,91 para 0,48 log NMP/g no mesmo período avaliado, ambos com diferença estatisticamente significativa (p < 0,05) (Tabela 12).

**Tabela 12.** Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g), enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

| Amostra | Maturação (dias) | Bactérias | Coliformes | Coliformes      |
|---------|------------------|-----------|------------|-----------------|
|         |                  | láticas   | Totais     | Termotolerantes |
| 1       | 7                | 8,78      | 3,04       | 2,0             |
| 2       |                  | 8,01      | 2,20       | 3,0             |
| 3       | 14               | 8,88      | 3,04       | 1,6             |
| 4       |                  | 8,66      | > 3,04     | 1,6             |
| 5       |                  | 7,28      | 1,97       | 1,6             |
| 6       | 21               | 7,43      | > 3,04     | 1,6             |
| 7       |                  | 7,36      | 3,04       | 2,4             |
| 8       |                  | 7,18      | 2,66       | 1,4             |
| 9       | 60               | 5,30      | < 0,48     | < 0,48          |
| 10      |                  | 5,18      | < 0,48     | < 0,48          |
| 11      |                  | 5,36      | < 0,48     | < 0,48          |
| 12      |                  | 5,48      | < 0,48     | < 0,48          |
| 13      | 67               | 5,32      | < 0,48     | < 0,48          |
| 14      |                  | 6,28      | < 0,48     | < 0,48          |
| 15      |                  | 6,32      | < 0,48     | < 0,48          |
| 16      |                  | 6,34      | < 0,48     | < 0,48          |

A maturação por 60 dias sob temperatura ambiente e fora de embalagens das unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes da propriedade cadastrada no IMA também promoveu variação média significativa dos valores físicos e físico-químicos, exceto para os teores de cloretos e NaCl e o valor pH (Tabela 13).

**Tabela 13.** Análise físico-química e coeficiente de variação (CV) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

| Análises                                  | Maturação (dias) |          | CV (%) |
|---|------------------|----------|--------|
|   | > 60             | > 60     |        |
| <b>Massa (g)</b>                          | 720,22 a         | 466,44 b | 8,175  |
| <b>Diâmetro (cm)</b>                      | 12,05 a          | 10,72 b  | 2,691  |
| <b>Altura (cm)</b>                        | 4,91 a           | 4,36 b   | 4,565  |
| <b>Volume (cm<sup>3</sup>)</b>            | 559,68 a         | 394,82 b | 6,486  |
| <b>Cloretos (%)</b>                       | 0,716 a          | 0,614 a  | 36,239 |
| <b>NaCl (%)</b>                           | 1,180 a          | 1,012 a  | 36,238 |
| <b>Umidade e voláteis (%)</b>             | 47,74 a          | 27,52 b  | 14,591 |
| <b>Sólidos totais (%)</b>                 | 52,26 b          | 72,48 a  | 8,804  |
| <b>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</b>  | 0,91 a           | 0,82 b   | 0,691  |
| <b>pH</b>                                 | 5,19 a           | 5,13 a   | 5,149  |
| <b>Acidez titulável (% ácido láctico)</b> | 1,026 a          | 1,584 b  | 10,346 |

As médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5 % de probabilidade por ANOVA.

Na Tabela 14 estão apresentados os coeficientes de correlação de Pearson entre as variáveis estudadas. O decréscimo da população de bactérias lácticas correlacionou-se diretamente com a redução da atividade de água e umidade. Já os aumentos dos teores de sólidos totais e da acidez titulável influenciaram inversamente a contagem de bactérias lácticas. Não foi observada correlações inversas entre bactérias lácticas e cloretos ou NaCl.

A perda de volume dos queijos também se correlacionou diretamente com a perda de umidade e, conseqüentemente, com o decréscimo da A<sub>w</sub>.

**Tabela 14.** Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes de propriedade cadastrada no IMA.

| Parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos |   |   |    |   |   |       |       |       |        |                |       |        |
|---|---|---|----|---|---|-------|-------|-------|--------|----------------|-------|--------|
|   | B | C | CT | M | V | Cl    | N     | U     | S      | A <sub>w</sub> | P     | A      |
| B   | 1 |   |    |   |   | -0,15 | -0,15 | 0,88* | -0,88* | 0,89*          | -0,23 | -0,89* |
| C   |   | 1 |    |   |   |       |       |       |        |                |       |        |
| CT  |   |   | 1  |   |   |       |       |       |        |                |       |        |
| M   |   |   |    | 1 |   |       |       |       |        |                |       |        |
| V   |   |   |    |   | 1 |       |       | 0,88* | -0,88* | 0,95*          |       |        |
| Cl  |   |   |    |   |   | 1     |       |       |        | 0,16*          | -0,30 |        |
| N   |   |   |    |   |   |       | 1     |       |        | 0,16*          | -0,30 |        |
| U   |   |   |    |   |   |       |       | 1     |        | 0,89*          |       |        |
| S   |   |   |    |   |   |       |       |       | 1      | -0,89*         |       |        |
| A <sub>w</sub>  |   |   |    |   |   |       |       |       |        | 1              |       |        |
| P   |   |   |    |   |   |       |       |       |        |                | 1     | -0,14  |
| A   |   |   |    |   |   |       |       |       |        |                |       | 1      |

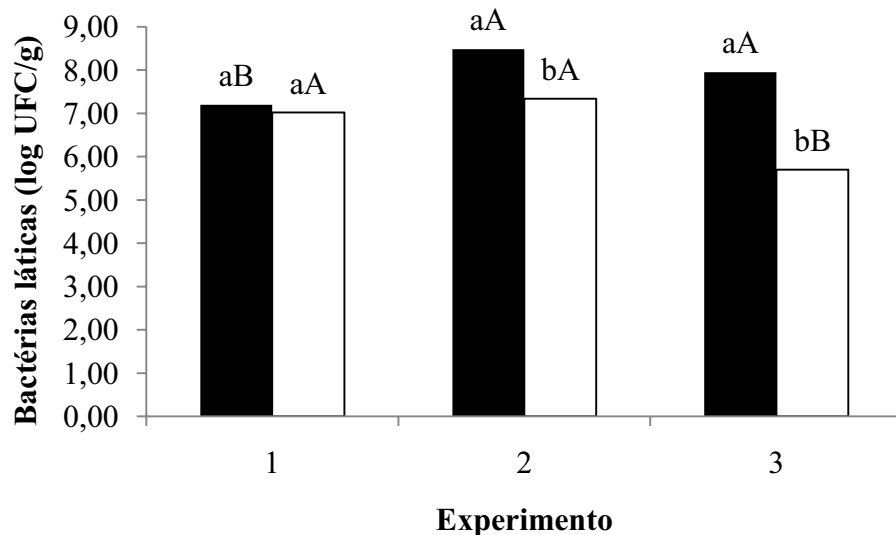
B = bactérias lácticas; C = coliformes totais; CT = coliformes termotolerantes; M = massa; V = volume; Cl = cloretos; N = cloreto de sódio; U = unidade e voláteis; S = sólidos totais; A<sub>w</sub> = atividade de água; P = pH; A = acidez titulável.

\* p < 0,05.

#### 4.2.4. Relação entre cadastramento das propriedades no IMA e condição de maturação

As análises realizadas estiveram de acordo com os experimentos 1, 2, e 3 os quais encontram-se apresentados no Quadro 6.

A maturação do queijo Minas artesanal dentro da embalagem original à vácuo e sob temperatura de refrigeração por 60 dias exerceu menor decréscimo na contagem de bactérias lácticas comparada à maturação do queijo fora das embalagens sob temperatura ambiente (Figura 2).



**Figura 2.** Contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3, analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Experimento 1:** Doze unidades amostrais de queijo Minas artesanal adquiridas de queijarias com o cadastro no IMA proveniente da Cooperativa dos Produtores Rurais. Seis unidades amostrais foram analisadas aos 37 dias de maturação e as outras seis foram maturadas na embalagem original sob refrigeração e analisadas com 69 dias de maturação.

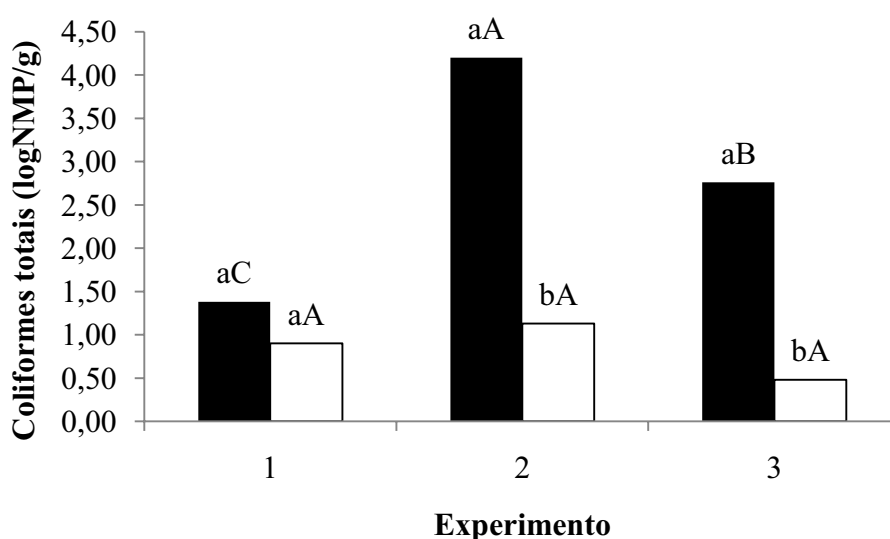
**Experimento 2:** Vinte unidades amostrais de queijo Minas artesanal adquiridas de duas queijarias sem o cadastro no IMA. Dez unidades amostrais, cinco de cada propriedade, foram analisadas com tempo de maturação inferior a 60 dias (cinco e 12 dias) e as outras dez foram maturadas fora da embalagem original sob temperatura ambiente e analisadas com tempo de maturação superior a 60 dias (66 e 75 dias).

**Experimento 3:** Dezesesseis unidades amostrais de queijo Minas artesanal adquiridas de uma queijaria cadastrada no IMA. Oito unidades amostrais foram analisadas com o tempo de maturação inferior a 60 dias (7, 14 e 21 dias) e oito foram maturadas fora da embalagem original sob temperatura ambiente e analisadas com tempo de maturação igual ou superior a 60 dias (60 e 67 dias).

O elevado número de bactérias lácticas encontrado em queijo Minas artesanal durante a maturação contribuem para o estabelecimento de condições que podem inibir a multiplicação de microrganismos indesejáveis. Beresford *et al.* (2001) já apontaram para uma população de culturas lácticas não iniciadoras (não *starter*), ao final da maturação, de  $10^8$  UFC/g em queijos produzidos com leite cru e de  $10^6$  UFC/g em queijos produzidos com leite pasteurizado.

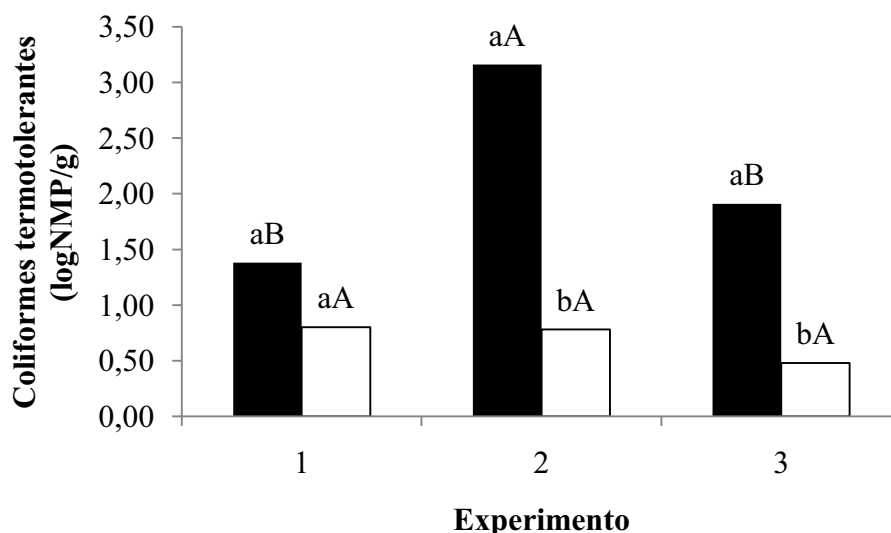
As bactérias lácticas iniciadoras, entre as quais *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremosis* (PERRY, 2004), são responsáveis pela fermentação da lactose com produção de ácidos o que leva a redução do pH do leite, alteram o potencial redox e o teor de umidade criando ambiente ideal para ação da quimosina e desenvolvimento posterior da microbiota secundária. A microbiota secundária composta por uma complexa mistura de bactérias, leveduras e fungos filamentosos juntamente com as enzimas produzidas pela cultura iniciadora é responsável pelos processos bioquímicos de proteólise e lipólise e formação de compostos voláteis os quais são responsáveis pelas características sensoriais do queijo.

Houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na enumeração inicial de coliformes totais entre todos os experimentos avaliados (Figura 3) o que não foi observado para a enumeração de coliformes termotolerantes (Figura 4). Não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) na enumeração de coliformes totais e termotolerantes após 60 dias de maturação provavelmente devido ao efeito da maturação sobre bactérias do grupo coliformes (Figura 3 e 4).



**Figura 3.** Enumeração de coliformes totais (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

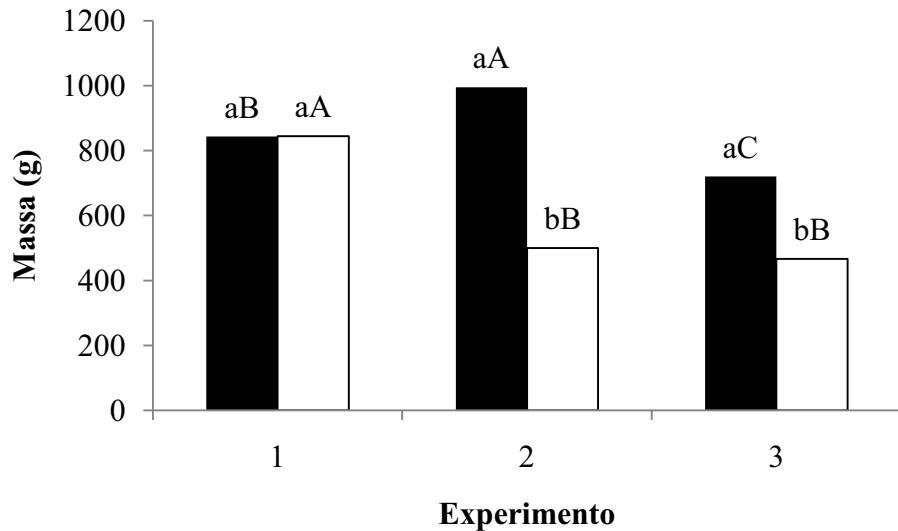


**Figura 4.** Enumeração de coliformes termotolerantes (log NMP/g) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

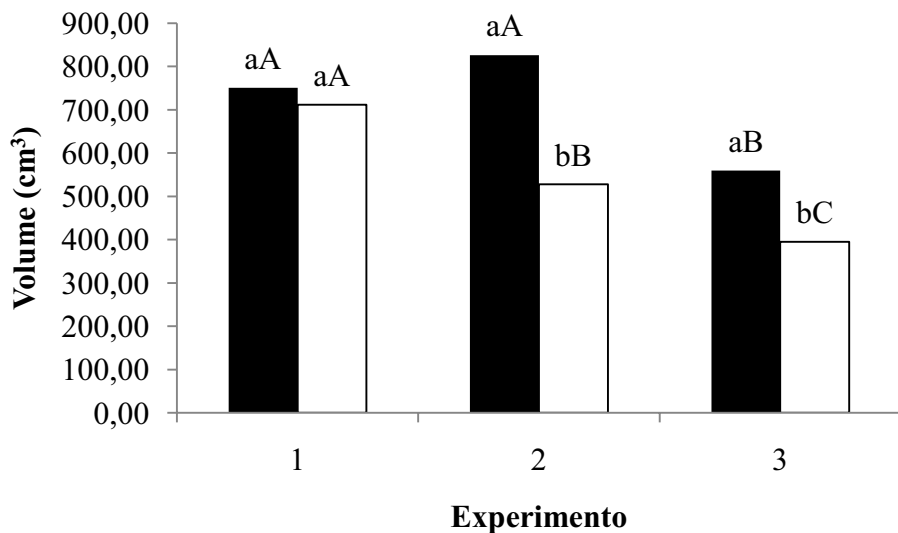
Em geral, a maturação do queijo Minas artesanal por 60 dias fora da embalagem à temperatura ambiente promoveu maiores variações nas características físicas e físico-químicas (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12).

As diferenças significativas encontradas nos valores de massa (Figura 5) e nos de volume (Figura 6) das unidades amostrais entre os experimentos avaliados podem estar associadas à perda de umidade durante a maturação. Houve redução significativa de massa e volume das unidades amostrais analisadas antes e após 60 dias de maturação à temperatura ambiente. Comportamento semelhantes de massa e dimensões do queijo Minas artesanal foram observados por Martins (2006) em unidades amostrais de queijo Minas artesanal maturadas sob temperatura de refrigeração e embaladas à vácuo e também em unidades amostrais maturadas sob temperatura ambiente fora das embalagens. De acordo Martins (2006), a massa do queijo pode ser considerada uma das características de maior importância devido a sua relação direta com o rendimento dos queijos, gerando questionamento sobre os custos de produção, caso os queijos sejam maturados por longos períodos.



**Figura 5.** Valores de massa (g) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

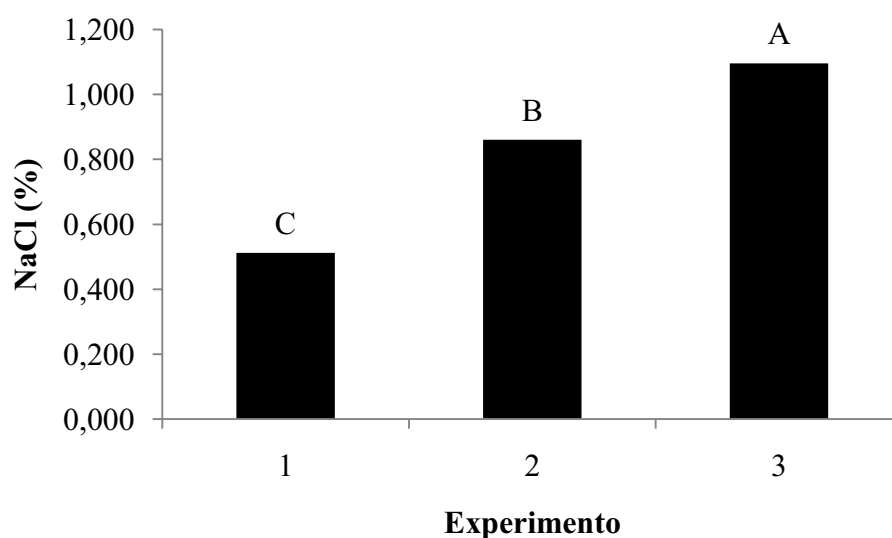


**Figura 6.** Valores de volume (cm<sup>3</sup>) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

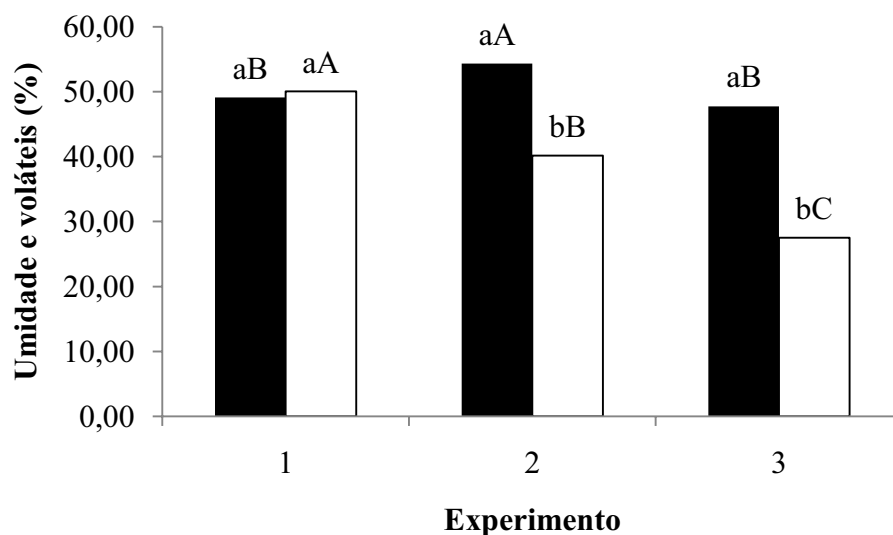
A falta de padronização da salga durante a manufatura dos queijos pode explicar as diferenças significativas dos resultados de NaCl (Figura 7) e de cloretos (dados não mostrados) entre os experimentos realizados. O processo de salga é feito manualmente, com adição de sal grosso sobre a superfície dos queijos, o que causa diferenças na quantidade de sal adicionada aos queijos. Não foi observada interação entre os períodos de maturação avaliados e a condição de maturação de cada experimento, de modo que foram apresentados na Figura 7 somente os resultados das diferenças encontradas entre os experimentos, pois foi significativo. Entretanto, no estudo de Martins (2006) foi possível observar interação entre período de maturação e condição de maturação.

O decréscimo do teor umidade e voláteis (Figura 8) e o aumento do teor de sólidos totais (Figura 9) após 60 dias de maturação foram significativos e dependentes da condição de maturação dos experimentos. Observou-se perda acentuada de umidade na condição de maturação sob temperatura ambiente sendo que foi mais acentuada nas unidades amostrais provenientes de propriedade cadastrada no IMA.



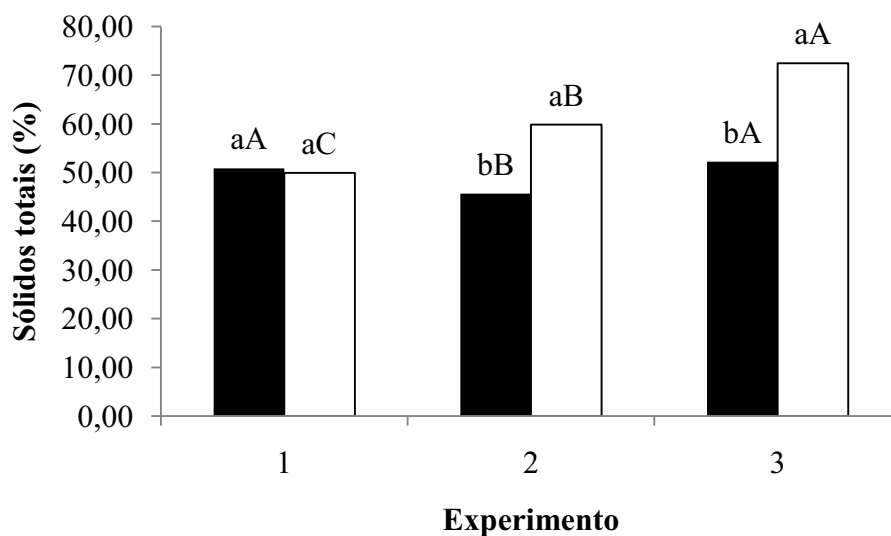
**Figura 7.** Valores de NaCl (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra maiúscula entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 8.** Valores de umidade e voláteis (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

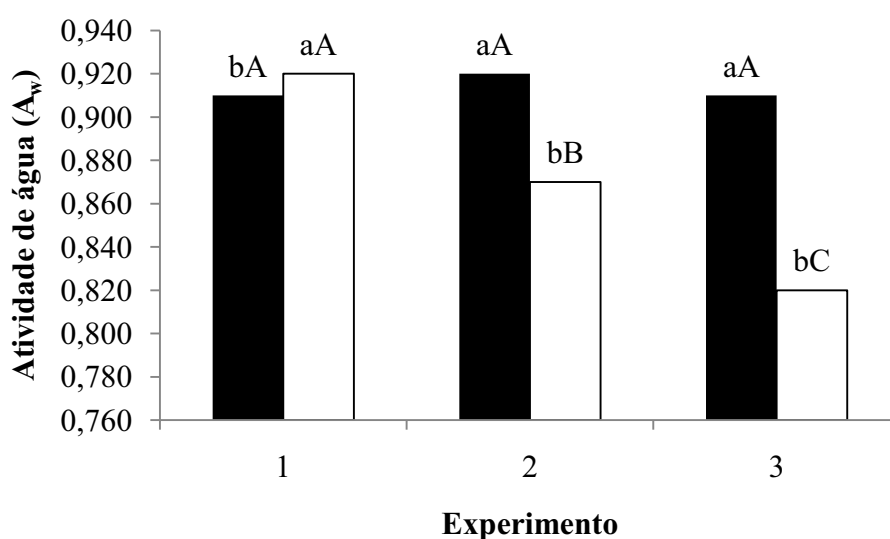
As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.



**Figura 9.** Valores de sólidos totais (%) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Houve redução significativa da  $A_w$  após 60 dias de maturação nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal maturadas sob temperatura ambiente fora das embalagens (Figura 10). A redução nos valores de atividade de água foi atribuída por Beresford *et al.* (2001) e Souza *et al.* (2003) pela evaporação da água, salga e também pela reação de hidrólise de proteínas à peptídeos e aminoácidos e de triglicérides à glicerol e ácidos graxos durante a maturação, reações essas que consomem moléculas de água.



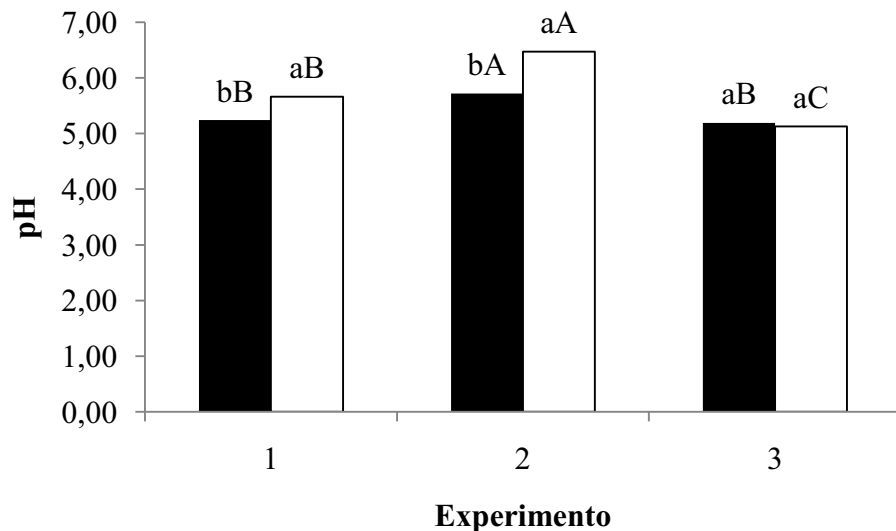
**Figura 10.** Valores de atividade de água ( $A_w$ ) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Observou-se um aumento significativo dos valores de pH tanto em unidades amostrais de queijo Minas artesanal maturadas dentro da embalagem original à temperatura de refrigeração quanto em unidades maturadas fora da embalagem à temperatura ambiente (Figura 11) o indica a maior ocorrência de proteólise que pode ser atribuída a elevada população de bactérias lácticas e coliformes apresentada por essas unidades amostrais.

O pH mais elevado pode comprometer a ação inibitória dos ácidos presentes no queijo. A ação inibitória do pH contra microrganismos está diretamente associada à presença de ácidos orgânicos na forma não dissociada. Como o principal ácido orgânico

presente no queijo Minas artesanal é o ácido láctico, que possui o valor da constante de dissociação (pKa) igual a 3,08, quanto menor o pH do meio maior a concentração da sua forma não dissociada. Dessa forma, os ácidos orgânicos penetram mais facilmente a membrana plasmática dos microrganismos e somente no citoplasma dessas células irão se dissociar ao encontrar um ambiente com o pH em torno de 7, ou seja, muito acima do seu valor de pKa.

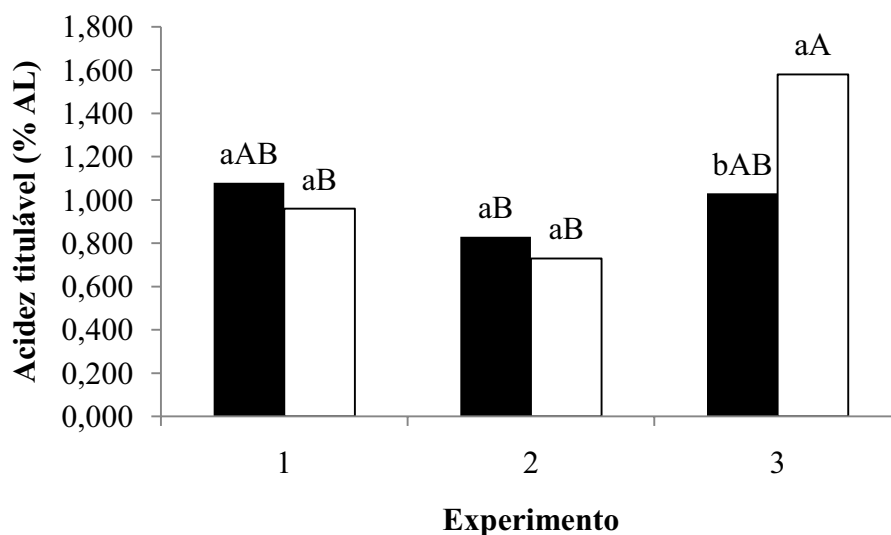


**Figura 11.** Valores de pH de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

Foi constatado aumento significativo de acidez titulável apenas nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal maturadas fora da embalagem à temperatura ambiente e produzidas na propriedade cadastrada no IMA (Figura 12).

Diferenças nos valores de pH observadas estão associadas à produção de ácido láctico por bactérias lácticas o qual ocasiona diminuição do pH durante a primeira semana de maturação. O incremento do valor do pH e a diminuição do percentual de ácido láctico após esse período pode ocorrer em função da utilização do ácido láctico como fonte de energia por fungos e leveduras aliado ao processo proteolítico o qual gera produtos nitrogenados tornando o meio alcalino (Souza *et al.*, 2003).

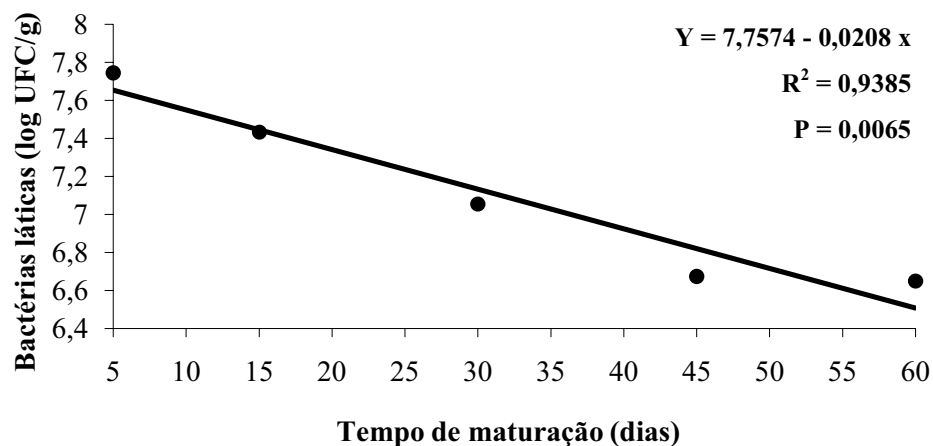


**Figura 12.** Valores de acidez titulável (% de AL = % de ácido láctico) de unidades amostrais de queijo Minas artesanal referentes aos experimentos 1, 2 e 3 (vide legenda da figura 2), analisadas antes de 60 dias (■) e após 60 dias (□) de maturação.

As médias seguidas de pelo menos uma mesma letra minúscula entre os tempos de maturação no mesmo experimento e maiúscula no mesmo tempo de maturação entre os experimentos não diferiram entre si ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

#### 4.2.5. Unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*

O comportamento da contagem de bactérias lácticas nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G. pode ser observado no modelo de regressão proposto, em que houve declínio significativo ( $P = 0,0065$ ) na população à medida que o tempo de maturação aumentou (Figura 13). A contagem variou de 7,74 log UFC/g para 6,65 log UFC/g aos 60 dias de maturação.



**Figura 13.** Evolução da contagem de bactérias lácticas (log UFC/g) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

Diferente dos achados do presente estudo, Souza *et al.* (2003) não encontrou variação significativa das contagens de *Lactococcus* e *Lactobacillus* do sétimo para o 60º dia de maturação, sendo que as contagens variaram de 9,31 para 8,00 log UFC/g e de 8,38 para 8,15 log UFC/g, respectivamente.

Redução considerável da população de coliformes totais decorrente do processo de maturação foi observada nas unidades amostrais intencionalmente contaminadas com *L. innocua* (Tabela 15). A enumeração de coliformes totais, em média, foi de 5,44 log NMP/g no quinto dia de maturação e reduziu para 1,14 log NMP/g aos 60º dia de maturação. Os resultados da enumeração de coliformes termotolerantes, considerando os valores médios, variaram de 4,87 log NMP/g iniciais para valores inferiores a 0,48 log NMP/g no tempo de análise final. Nota-se que os valores iniciais encontraram-se fora do que é preconizado pelo Regulamento da Lei Estadual 14.185, porém após 60 dias de maturação, esses valores já se encontravam nos limites aceitáveis.

Resultados semelhantes foram encontrados por Souza *et al.* (2003) em que redução significativa a valores admissíveis ocorreu na população de coliformes totais e termotolerantes em amostras de queijo artesanal com 60 dias de maturação. Esses autores ressaltaram que a contagem de coliformes totais variou do sétimo para o 60º dia de maturação, respectivamente, de 5,76 para 0,57 log UFC/g no período do verão e de 4,98 para 3,01 log UFC/g no período do inverno. Já a contagem de coliformes termotolerantes variou do sétimo para o 60º dia de maturação, respectivamente, de 3,92

para valores menores que 10 log UFC/g no período do verão e de 4,98 para 2,18 log UFC/g no período do inverno. Segundo os autores, a atividade de água e o teor de umidade do queijo são fatores que influenciaram no decréscimo da população de coliformes.

**Tabela 15.** Enumeração de coliformes totais e termotolerantes (log de NMP/g) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

| Amostra <sup>a</sup> | Maturação (dias) | Coliformes totais <sup>b</sup> | Coliformes termotolerantes <sup>c</sup> |
|----------------------|------------------|--------------------------------|---|
| LA                   | 5                | 5,18                           | 4,56                                    |
| LB                   | 5                | 6,66                           | 5,58                                    |
| LC                   | 5                | < 4,48                         | < 4,48                                  |
| LA                   | 15               | 3,18                           | < 2,48                                  |
| LB                   | 15               | 4,32                           | < 2,48                                  |
| LC                   | 15               | 3,63                           | < 2,48                                  |
| LA                   | 30               | 2,38                           | 0,87                                    |
| LB                   | 30               | 2,66                           | 1,63                                    |
| LC                   | 30               | 1,63                           | < 0,48                                  |
| LA                   | 45               | 2,38                           | < 0,48                                  |
| LB                   | 45               | > 3,04                         | 1,36                                    |
| LC                   | 45               | 2,38                           | 0,79                                    |
| LA                   | 60               | 0,56                           | < 0,48                                  |
| LB                   | 60               | 2,38                           | < 0,48                                  |
| LC                   | 60               | < 0,48                         | < 0,48                                  |

<sup>a</sup> LA, LB e LC representam os lotes dos queijos analisados em cada tempo de maturação.

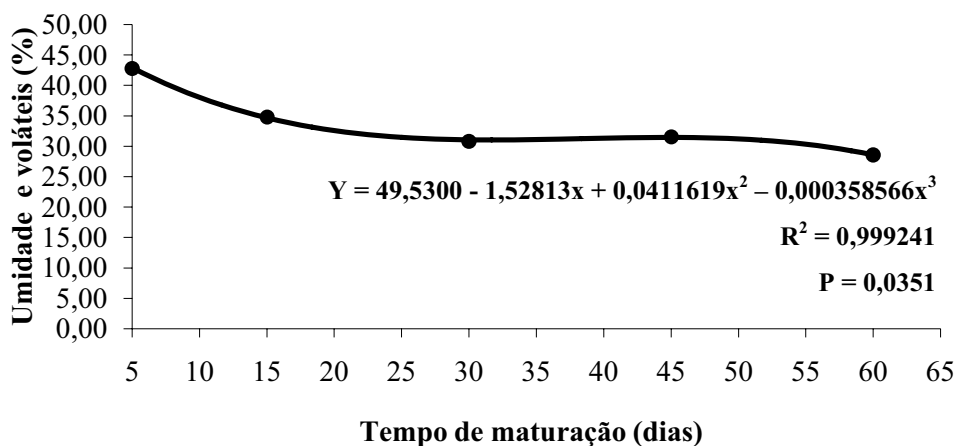
<sup>b</sup> Equação de regressão:  $Y = 5,124 - 0,067x$  ( $R^2 = 0,848$  ;  $P = 0,026$ ).

<sup>c</sup> Equação de regressão:  $Y = 4,160 - 0,071x$  ( $R^2 = 0,775$  ;  $P = 0,048$ ).

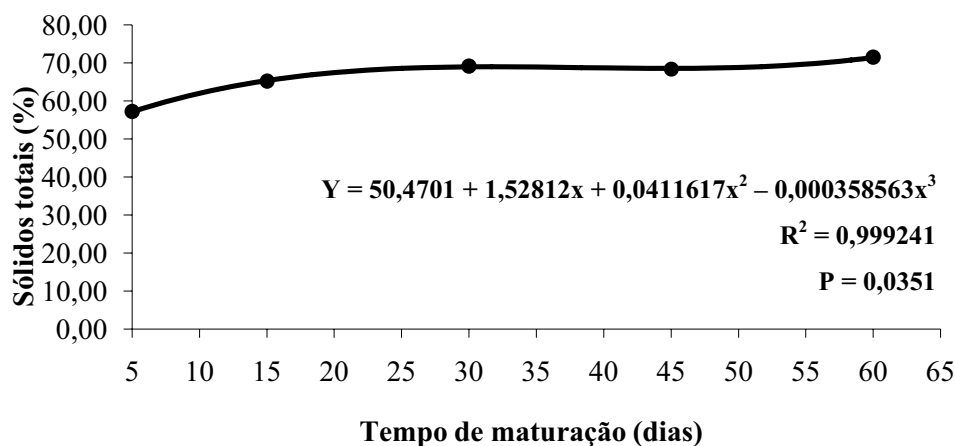
A massa e as dimensões das unidades amostrais não foram avaliadas nesse estudo em função da falta de uniformidade dos queijos produzidos. Alterações físico-químicas significativas advindas do processo de maturação estão apresentadas nas Figuras 14, 15, 16, 17.

Os valores de umidade e de sólidos totais variaram significativamente ( $P < 0,05$ ) ao longo da maturação, em razão da perda de água, até atingirem valores

aproximadamente constantes, de acordo com o modelo de regressão cúbico proposto (Figura 14 e 15).



**Figura 14.** Evolução da umidade (%) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

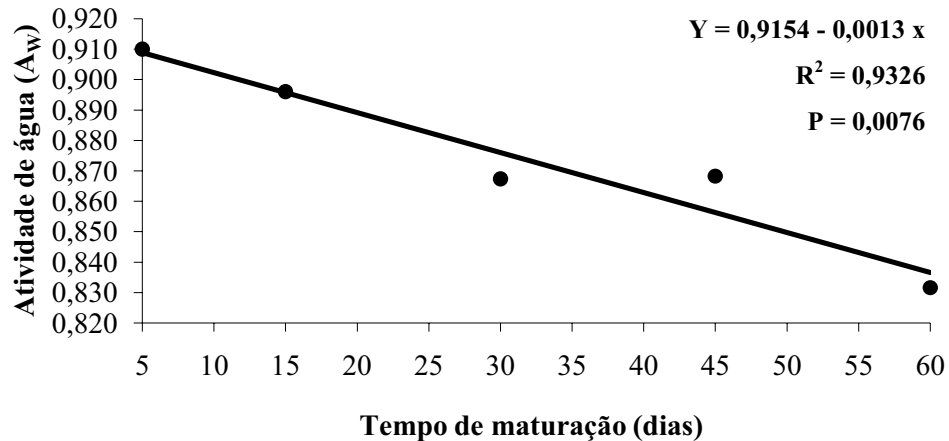


**Figura 15.** Evolução dos sólidos totais (%) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

Sálvio (1993) também encontrou diferenças entre os valores de umidade de queijo Minas maturados sob refrigeração, a 12 °C e à temperatura ambiente e afirmou que o baixo teor de umidade encontrado nos queijos a temperatura ambiente, após maturação pode contribuir para a inativação de microrganismos contaminantes. De forma semelhante, Souza *et al.* (2003) encontraram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o percentual de umidade no sétimo dia e no 60º dia de maturação de queijos

artesanais, respectivamente, com valores que variaram de 40,52 % para 27,57 % no período de verão e de 45,37 % para 32,98 % no período de inverno.

A  $A_w$  (Figura 16) e a acidez titulável (Figura 17) tiveram comportamentos lineares em função do tempo de maturação, com redução e aumento, respectivamente de forma significativa ( $P < 0,05$ ).

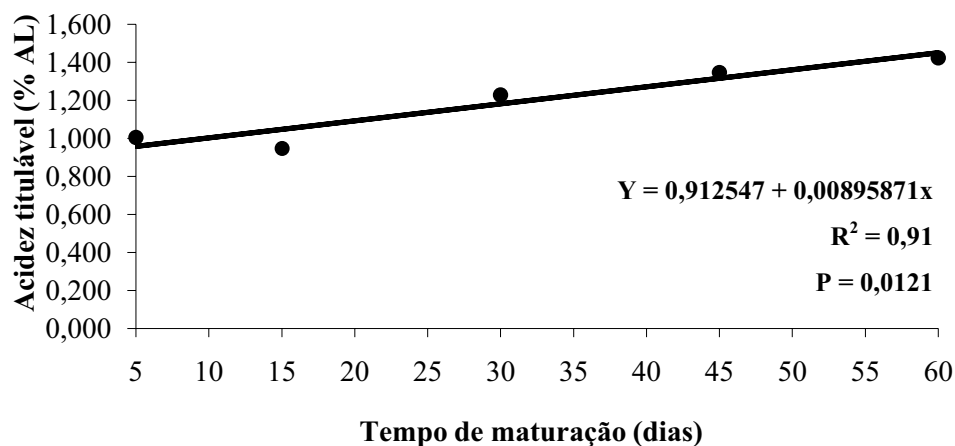


**Figura 16.** Evolução de  $A_w$  ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

Redução significativa nos valores de  $A_w$  de 0,970 para 0,935 durante a maturação de queijo Minas artesanal no período de verão também foi registrada por Souza *et al.* (2003).

O aumento da acidez titulável ao longo do tempo de maturação pode estar relacionada à produção eficiente de ácidos pela microbiota láctica presente no fermento natural e menor consumo do ácido por fungos e leveduras os quais contribuíram para uma maior acidificação do queijo e, conseqüentemente, aumento da acidez titulável com o tempo de maturação. De acordo com Nhuch *et al.* (2004), o aumento significativo na acidez titulável de valores iniciais de 0,58 % e de 2,18 % ao final de 60 dias de maturação ocorreu em queijos artesanais produzidos no Rio Grande do Sul.

Sálvio (1993) constatou que a maturação do queijo Minas, à temperatura ambiente, por 60 dias, resultou em uma concentração de ácido láctico, aproximadamente, duas vezes maior do que nos queijos maturados a 12 °C e sob refrigeração.



**Figura 17.** Evolução da acidez titulável (% de AL = % de ácido lático) ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente em unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

Apesar de se observar, em termos numéricos, um aumento do pH do quinto para o 15º dia e posterior diminuição nos demais tempos de maturação avaliados, a evolução de pH não foi explicada em função do tempo ( $P > 0,05$ ) por meio da análise de regressão nos modelos testados (Tabela 16). Sálvio (1993) também constatou, no decorrer da maturação de queijo Minas, redução gradual nos valores de pH para valores entre 5,27 e 5,54, com 60 dias de maturação. Pinto (2008) encontrou que, durante os 60 dias de maturação de queijo Minas artesanal do Serro, os valores de pH estiveram entre 4,50 e 4,87.

A evolução do percentual de NaCl e cloretos também não foram explicadas em função do tempo ( $P > 0,05$ ). O elevado coeficiente de variação indicou a falta de padronização do processo de salga dos queijos (Tabela 12). Nhuch *et al.* (2004) também atribuíram os valores discrepantes no percentual de cloretos à falta de padronização no processo de salga. Souza *et al.* (2003) encontraram teores de NaCl maiores do que os encontrados no presente estudo com variação de 1,9 % para 3,4 % (sétimo e 60º dia de maturação, respectivamente) no período de verão e de 1,8 % para 3,1 % no período de inverno. Pinto (2008) constatou teores de cloretos acima dos valores encontrados no presente estudo sendo que esses valores ultrapassaram 2 % somente após o 30º dia de maturação.

A evolução das características físico-químicas ao longo da maturação das unidades amostrais do queijo Minas artesanal produzidas na região do Serro, M.G. não

gerou condições antagonistas a ponto de *L. innocua* não ser detectada pelas metodologias de pesquisa utilizadas. Esse fato pode estar relacionado com a contaminação artificial e não da presença natural do microrganismo no ambiente de produção, sendo que os microrganismos naturalmente presentes no queijo, por estarem propícios a mais condições de stress, talvez não fosse detectado.

**Tabela 16.** Valores de contagem de bactérias lácticas e das análises físico-químicas com seus respectivos coeficientes de variação (CV em %) entre parêntesis ao longo de 60 dias de maturação a temperatura ambiente de unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas com *L. innocua*, produzidas na região do Serro, M.G.

| Análises (CV em %)                       | Tempo de Maturação (dias) |                   |                   |                   |                   |
|--|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|  | 5                         | 15                | 30                | 45                | 60                |
| <b>Bactérias lácticas (log UFC/g)</b>    | 7,74<br>(12,47)           | 7,43<br>(5,30)    | 7,05<br>(6,56)    | 6,67<br>(10,02)   | 6,65<br>(13,83)   |
| <b>Umidade (%)</b>                       | 42,8102<br>(1,06)         | 34,8312<br>(5,90) | 30,8442<br>(7,06) | 31,5717<br>(5,47) | 28,5437<br>(6,19) |
| <b>Sólidos totais (%)</b>                | 57,1898<br>(0,80)         | 65,1687<br>(3,15) | 69,1598<br>(3,14) | 68,4283<br>(2,52) | 71,4563<br>(2,47) |
| <b>Cloretos (%)</b>                      | 0,569<br>(5,54)           | 0,327<br>(25,55)  | 0,339<br>(15,24)  | 0,342<br>(16,52)  | 0,419<br>(18,53)  |
| <b>NaCl (%)</b>                          | 0,939<br>(5,45)           | 0,539<br>(25,88)  | 0,559<br>(15,18)  | 0,564<br>(16,50)  | 0,691<br>(18,46)  |
| <b>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</b> | 0,910<br>(0,479)          | 0,896<br>(1,21)   | 0,867<br>(2,33)   | 0,868<br>(1,60)   | 0,832<br>(4,34)   |
| <b>pH</b>                                | 5,49<br>(1,41)            | 5,78<br>(1,58)    | 5,61<br>(1,19)    | 5,53<br>(1,64)    | 5,39<br>(1,09)    |
| <b>Acidez titulável (%)</b>              | 1,004<br>(10,78)          | 0,948<br>(10,76)  | 1,228<br>(3,14)   | 1,348<br>(16,39)  | 1,423<br>(21,64)  |

Na Tabela 17 estão apresentadas as correlações significativas entre as variáveis analisadas no presente estudo.

**Tabela 17.** Correlação de Pearson (r) entre os parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos de unidades amostrais de queijo Minas artesanal artificialmente contaminadas, analisadas antes de 60 dias e após 60 dias de maturação.

| <b>Parâmetros microbiológicos, físicos e físico-químicos</b> |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
|--|----------|----------|-----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------------------|----------|----------|
|  | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>CT</b> | <b>M</b> | <b>V</b> | <b>Cl</b> | <b>N</b> | <b>U</b> | <b>S</b> | <b>A<sub>w</sub></b> | <b>P</b> | <b>A</b> |
| <b>B</b>   | 1        |          |           |          |          | 0,53      | 0,53     | 0,90*    | -0,90*   | 0,91*                | -0,41    | -0,94*   |
| <b>C</b>   |          | 1        |           |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>CT</b>  |          |          | 1         |          |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>M</b>   |          |          |           | 1        |          |           |          |          |          |                      |          |          |
| <b>V</b>   |          |          |           |          | 1        |           |          | 0,85*    | -0,85*   | 0,93*                |          |          |
| <b>Cl</b>  |          |          |           |          |          | 1         |          |          |          | 0,36                 | -0,54    |          |
| <b>N</b>   |          |          |           |          |          |           | 1        |          |          | 0,36                 | -0,54    |          |
| <b>U</b>   |          |          |           |          |          |           |          | 1        |          | 0,89*                |          |          |
| <b>S</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          | 1        | -0,89*               |          |          |
| <b>A<sub>w</sub></b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          | 1                    |          |          |
| <b>P</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      | 1        | -0,68    |
| <b>A</b>   |          |          |           |          |          |           |          |          |          |                      |          | 1        |

B = bactérias lácticas; C = coliformes totais; CT = coliformes termotolerantes; M = massa; V = volume; Cl = cloretos; N = cloreto de sódio; U = umidade e voláteis; S = sólidos totais; A<sub>w</sub> = atividade de água; P = pH; A = acidez titulável.

\* p < 0,05.

Bactérias lácticas correlacionaram-se diretamente com a A<sub>w</sub> e a umidade e indiretamente com os sólidos totais e a acidez titulável assim como observado anteriormente. Nota-se correlação direta entre a A<sub>w</sub> e a umidade e inversa entre a A<sub>w</sub> e os sólidos totais. Não foi observada correlação entre acidez titulável e pH.

## 5. CONCLUSÕES

O método de PCR-BAX<sup>®</sup> para a pesquisa de *Salmonella* sp. e VIDAS<sup>®</sup>-LMO para a pesquisa de *L. monocytogenes* apresentaram resultados semelhantes aos apresentados pela metodologia convencional.

*Salmonella* sp. e *L. monocytogenes* não foram recuperados nas unidades amostrais de queijo Minas artesanal provenientes da região do Serro, MG. analisadas, o que pode estar relacionado com a presença de número mais elevado de microrganismos competidores e por células injuriadas.

O período de maturação mínimo de 60 dias para maturação do queijo Minas artesanal, exigido pela Lei Estadual 14.185, não foi suficiente para garantir segurança microbiológica no produto quando queijos foram produzidos com leite cru artificialmente contaminado com *L. innocua*.

A caracterização físico-química permitiu avaliar as condições intrínsecas do queijo que poderiam influenciar na sobrevivência dos microrganismos avaliados além de fornecer informações que poderão contribuir para o estabelecimento dos padrões de identidade e qualidade do queijo Minas artesanal.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, R. M. C. M.; NOGUEIRA, P. A.; MALUCELLI, M. I. C. O comércio clandestino de carne e leite no Brasil e o risco da transmissão da tuberculose bovina e de outras doenças ao homem: um problema de saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 2, p. 1-17, 2005.
- ALEXANDRE, D. P.; SILVA, M. R.; SOUZA, M. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-Minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 4, p. 424-428, 2002.
- ANDREWS, W. H.; FLOWERS, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. In: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 357-380.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2004.3 *Salmonella* in Foods. Enzyme-linked Fluorescent Assay (ELFA) Screening Method. In: **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 18. ed., 2005. cap 17, p. 197-199.
- AOAC a. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2004.02 *Listeria monocytogenes* in Foods. VIDAS *Listeria monocytogenes* II (LMO2). In:

**Official Methods of Analysis of AOAC International.** 18. ed., 2006. cap 17. p. 233-234.

AOAC b. Association of Official Analytical Chemists. AOAC Official Method 2003.09 *Salmonella* in Selected Foods. BAX<sup>®</sup> Automated System. *In: Official Methods of Analysis of AOAC International.* 18. ed., 2006. cap 17. p. 194-196.

ARAGON-ALEGRO, L. C.; ARAGON, D. C.; MARTINEZ, E. Z.; LANDGRAF, M.; FRANCO, B. D. G. M.; DESTRO, M. T. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 483-486, 2008.

ARAÚJO, R. A. B. M. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal da região de Araxá.** 2004. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

ARSLAN, S.; ÖZDEMİR, F. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 360-363, 2008.

AYGUN, O.; ASLANTAS, O.; ONER, S. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 66, n. 3, p. 401-404, 2005.

BALDUINO, R.; OLIVEIRA, A. S.; HAULY, M. C. O. Cultura láctica mista com potencial de aplicação como cultura iniciadora em produtos cárneos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 3, p. 356-362, 1999.

BAROCCI, S.; CALZA, L.; BLASI, G.; BRISCOLINI, S.; CURTIS, M.; PALOMBO, B.; CUCCO, L.; POSTACCHINI, M.; SABBATINI, M.; GRAZIOSI, T.; NARDI, S.; PEZZOTTI, G. Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 750-756, 2008.

- 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.
- BOER, E.; BEUMER, R. R. Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1, p.119-130, 1999.
- BRANT, L. M. F.; FONSECA, L. M.; SILVA, M. C. C. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. **Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p.1570-1574, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Agropecuária e Abastecimento. Resolução nº. 7 de 28 de novembro de 2000. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 2 jan. 2001. Seção 1, p. 22. Disponível em: <[http://www.agais.com/normas/leite/queijo\\_func\\_queijarias.htm](http://www.agais.com/normas/leite/queijo_func_queijarias.htm)>. Acesso em: 11 nov. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº. 146 de 07 de março de 1996. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218>>. Acesso em: 11 nov. 2008.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para o Controle de produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472>>. Acesso em: 31 mar. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução – RDC nº. 12 de 2 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial {da} República Federativa do Brasil**. Brasília DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 22 dez. 2008

BUAZZI, M. M.; JOHNSON, M. E.; MARTH, E. H. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Swiss cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 2, p. 380-386, 1992.

CARMO, G. M. I. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2007. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacao_dta.pdf)>. Acesso em: 11 nov. 2008.

CARNIO, M. C.; EPPERT, I.; SCHERER, S. Analysis of the bacterial surface ripening flora of German and French smeared cheeses with respect to their anti-listerial potential. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 1-2, p. 89-97, 1999.

COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; BINGOL, E. B.; ULUSOY, B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 576-579, 2007.

CORDEIRO, A. **Queijo Minas Artesanal: em 2008, 30 queijarias se cadastram no Programa.** Disponível em: <<http://www.wwww.agrosoft.org.br/agropag/103054.htm>>. Acesso em: 29 out. 2008.

CORRY, J. E. L.; JARVIS, B.; PASSMOREC, S.; HEDGESD, A. A critical review of measurement uncertainty in the enumeration of food microorganisms. **Food Microbiology**, v. 24, n. 3, p. 230-253, 2007.

DE BUYESER, L. M.; DUFOUR, B.; MAIRE, M. LAFARGE, V. Implication of milk and products in food-borne diseases in France and different industrialized countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 1-17, 2001.

DE MÉDICI, D.; PEZZOTTI, G.; MARFOGLIA, C.; CACIOLO, D.; FOSCHI, G.; OREFI, L. Comparison between ICS-VIDAS, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 205-210, 1998.

DECAGON AQUALAB OPERATOR'S MANUAL. **Water activity measurement**, Model CX-2, 68 p.

DONNELLY, C. W.; RYSER, E. T. *Listeria*. In: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 343-356.

DUFFEY, P. S.; KANI, J. C.; LEE, J. O.; HILL, W. J.; KOKKA, R. *Salmonella* serogroup C2 and C3 identified by agglutination using an immunoglobulin G3 (Kappa) monoclonal antibody (321-1-E3) reactive with a somatic factor 8-like polysaccharide antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3050-3057, 1992.

EMATER. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais. **Programa de melhoria da qualidade do queijo artesanal supera metas.** Disponível em:

<[http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site\\_tpl\\_paginas\\_internas&id=1070](http://www.emater.mg.gov.br/portal.cgi?flagweb=site_tpl_paginas_internas&id=1070)>. Acesso em: 29 out. 2008.

EMBRAPA a. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção Mundial de Queijos – 2000 / 2008.** Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/industria/tabela0423.php>>. Acesso em: 07 mar. 2009.

EMBRAPA b. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção total de leite, sob inspeção e vacas ordenhadas no Brasil, 2000 / 2008.** Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br/nova/informacoes/estatisticas/producao/tabela0231.php>>. Acesso em: 07 mar. 2009.

EPI INFO. **A world processing, database and statistic program for epidemiology on microcomputers.** Version 6.04. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 1993.

FACON, M. J.; SKURA, B. J. Antibacterial activity of lactoferricin, lysozyme and EDTA against *Salmonella* Enteridis. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 3, p. 303-313, 1996.

FARBER, J. M.; GENDEL, S. M.; TYLER, K. D.; BOERLIN, P.; LANDRY, W. L.; FRITSCHER, S.; BARRET, T. J. Molecular typing and differentiation. In: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.** 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 127-156.

FERRETTI, R.; MANNAZZU, I.; COCOLIN, L.; COMI, G.; CLEMENTI, F. Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p.977-978, 2001.

FLETCHER, ROBERT H; FLETCHER, SUZANNE; WAGNER, EDWARD H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 281 p.

- FRANCO, B. D. G. M. Métodos alternativos de análise microbiológica: mais eficiência aos laboratórios. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, Anais do XVII Congresso Nacional de Laticínios, v. 55, n. 315, p. 136-138, 2000.
- FREITAS, E. I.; LEMOS, A. A.; MARIN, V. A. Validação de métodos alternativos qualitativos na detecção de patógenos alimentares. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1073-1083, 2006.
- GAMEIRO, N.; FERREIRA-DIAS, S.; FERREIRA, M.; BRITO, L. Evolution of *Listeria monocytogenes* populations during the ripening of naturally contaminated raw ewe’s milk cheese. **Food Control**, v. 18, n. 10, p.1258-1262, 2007.
- GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.
- GANGAR, V.; CURIALE, M. S.; D'ONORIO, A.; SCHULTZ, A.; JOHNSON, R. L.; ATRACHE, V. VIDAS<sup>®</sup> Enzyme-Linked Immunofluorescent Assay for detection of *Listeria* in foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 4, p. 903-918, 2000.
- GARCIA, J. L.; NAVARRO, I. T.; OGAWA, L.; OLIVEIRA, R. C.; GARCIA, S. M. F.; LEITE, J. Soroepidemiologia da toxoplasmose e avaliação ocular pela Tela de Amsler, em pacientes da zona rural, atendidos na unidade de saúde do município de Jaguapitã, PR, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 671-676, 1999.
- GLOBO.COM. **Queijo de Minas vira patrimônio cultural brasileiro. Disponível em:** <<http://g1.globo.com/Noticias/Brasil/0,,MUL471180-5598,00.html>>. Acesso em: 11 nov. 2008.
- GLYNN, B.; LAHIFF, S.; WERNECKE, M.; BARRY, T.; SMITH, T. J.; MAHER, M. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial

food safety. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 2, p. 126-139, 2006.

GRANT, I.R.; POPEA, C.M.; O'RIORDANA, L.M.; BALLB, H.J.; ROWEA, M.T. Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. **Veterinary Microbiology**, v.77, n. 3-4, p.369-378, 2000.

GOULART, E. M. A. **Metodologia e informática na pesquisa médica**. Belo Horizonte: Interlivros, 2000. 161 p.

GOUWS, P. A.; LIEDEMANN, Ilse. Evaluation of diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 201-205, 2005.

GUNASINGHE, C. P. G. L.; HENDERSON, C.; RUTTER, M. A. Comparative study of two plating media (PALCAM and Oxford) for detection of *Listeria* species in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. **Letters in Applied Microbiology**, v.18, n. 3, p. 156-158, 1994.

GUEDES-NETO, L. G.; SOUZA, M. R.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; SANTOS, W. L. M. Atividade antimicrobiana de bactérias ácido-lácticas isoladas de queijos de coalho artesanal e industrial frente a microrganismos indicadores. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 2, p.245-250, 2005.

HALL, P. A.; LEDENBACH, L.; FLOWERS, R. Acid-producing microorganisms. In: DOWNES, F. P. (Ed.); ITO, K. (Ed.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 203-205.

HUGAS, M. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 139-150, 1998.

IEPHA. Instituto Estadual do Patrimônio Histórico e Artístico de Minas Gerais. **Caracterização**. Disponível em: <

[http://www.iepha.mg.gov.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=27&Itemid=59](http://www.iepha.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=27&Itemid=59)>. Acesso em: 08 out. 2008.

Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos** 3. ed. São Paulo: O Instituto, 1985. 533 p.

JASSON, V.; RAJKOVIC, A.; DEBEVERE, J.; UYTTENDAELE, M. Kinetics of resuscitation and growth of *L. monocytogenes* as a tool to select appropriate enrichment conditions as a prior step to rapid detection methods. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 88-93, 2009.

KAMAT, A. S.; NAIR, P. M. Identification of *Listeria innocua* as a biological indicator for inactivation of *Listeria monocytogenes* by some meat processing treatment. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 29, n. 8, p. 714-720, 1996.

KANKI, M.; SAKATA, J.; TAGUCHI, M.; KUMEDA, Y.; ISHIBASHI, M.; KAWAI, T.; KAWATSU, K.; YAMASAKI, W.; INOUE, K.; MIYAHARA, M. Effect of sample preparation and bacterial concentration on *Salmonella enterica* detection in poultry meat using culture methods and PCR assaying of preenrichment broths. **Food Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 1-3, 2009.

LECLERCQ, A. Atypical colonial morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. **Journal of Microbiological Methods**, v. 57, n. 2, p. 251-258, 2004.

LEDO, C. A. S.; SILVA, S. O.; CONCEIÇÃO, K. S. **Avaliação do coeficiente de variação na experimentação com bananeira**. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/avaliacao\\_cv\\_ledoID-6BNwiAT178.pdf](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/avaliacao_cv_ledoID-6BNwiAT178.pdf)>. Acesso em 31 dez. 2008.

**Lei Estadual nº. 14.185 de 31 de janeiro de 2002 dispõe sobre o processo de produção do queijo minas artesanal e dá outras providências.** MINAS GERAIS DIÁRIO DO EXECUTIVO, 01/02/2002. Disponível em:

<[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/14185.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/14185.pdf)>. Acesso em: 26 out. 2007.

LEUSCHNER, R. G. K.; BOUGHTFLOWER, M. P. Laboratory-scale preparation of soft cheese artificially contaminated with low levels of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, and Dublin. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 3, p. 508-514, 2002.

LINTON, M.; MACKLE, A. B.; UPADHYAY, V. K; KELLY, A. L.; PATTERSON, M. F. The fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of Camembert-type cheese: a comparison between raw milk and milk treated with high hydrostatic pressure. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 423-428, 2008.

LIU, D. Preparation of *Listeria monocytogenes* specimens for molecular detection and identification. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 229-242, 2008.

LOGUERCIO, A. P.; ALEIXO, J. A. G.; VARGAS, A. C.; COSTA, M. M. ELISA indireto na detecção de *Salmonella* spp. em lingüiça suína. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p.1057-1062, 2002.

LONCAREVIC, S.; DANIELSSON-THAM, M-L.; THAM, W. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 245-250, 1995.

MACHADO, E. C.; FERREIRA, C. L. L. F.; FONSECA, L. M. SOARES, F. M. PEREIRA JÚNIOR, F. N. Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 516-521, 2004.

MALORNY, B; TASSIOS, P. T.; RADSTRÖM, P.; COOK, N.; WAGNER, M.; HOORFAR, J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne

pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, n. 1, p. 39- 48, 2003.

MANOLOPOULOU, E.; SARANTINOPOULOS, P.; ZOIDOU, E.; AKTYPIS, A.; MOSCHOPOULOU, E.; KANDARAKIS, I. G.; ANIFANTAKIS, E. M. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 153-161, 2003.

MANUAL DO KIT VIDAS<sup>®</sup> BIOLAB-MÉRIEUX S.A., 2007.

MARIN, V. A.; LEMOS, A. A.; FREITAS, E. I. Detecção de patógenos presentes nos alimentos: A falta de padronização e validação de métodos moleculares no Brasil. **Higiene Alimentar**, v. 20, n. 145, p. 46-50, 2006.

MARTINS, J. E. **Características físico-químicas e microbiológicas durante a maturação do queijo Minas artesanal da região do Serro**. 2006. 129 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

MASCARENHAS, G. C. C. **Indicações geográficas no Brasil: principais fatores determinantes do seu reconhecimento e desempenho**. IV ENEC - Encontro Nacional de Estudos do Consumo Novos Rumos da Sociedade de Consumo? 24, 25 e 26 de setembro de 2008 - Rio de Janeiro/RJ.

MENÉNDEZ, S.; GODÍNEZ, R.; CENTENO, J. A.; RODRÍGUEZ-OTERO, J. L. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of “Tetilla” raw cow-milk cheese. **Food Microbiology**, v. 18, n. 2, p. 151-158, 2001.

MORGAN, F.; BONNIN V.; MALLEREAU, M-P.; PERRIN G. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of soft lactic cheese made from raw goat milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64, n. 1-2, p. 217-221, 2001.

MULLIS, K. B.; ERLICH, HENRY A.; ARNHEIM, N.; HORN, GLENN T. SAIKI, R. K.; SCHARF, S. J. **Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences**. US.PI 4683195. 07 feb. 1986, 28 jul. 1987. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4683195.html>>. Acesso em: 25 abr. 2008.

MURTININGSIH; COX, J. M. Evaluation of the Serobact™ and Microbact™ systems for the detection identification and of *Listeria* spp. **Food Control**, v. 8, n. 4, p. 205-210, 1997.

NERO, L. A. ***Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção**. 2005. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-S.P.

NERO, L. A.; MATTOS, M. R.; BARROS, M. A. F.; BELOTI, V.; FRANCO, B. D. G. M. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. detection. **Microbiological Research**. 2006; (2007), doi:10.1016/j.micres.2007.04.003.

NIEDERHIAUSER, C.; CANDRIAN, U.; HOFLEIN, C.; JERMINI, M., H.; BUHLER, P.; LUTHY, J. Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1564-1568, 1992.

NHUCH, E.; GUEDES, F. F.; VARGAS, L.; KOCH, F. F. Caracterização dos queijos artesanais produzidos em Viamão, no estado do Rio Grande do Sul, quanto à evolução físico-química e microbiológica. **Veterinária em foco**, v. 2, n. 1, p. 15-24, 2004.

ORNELAS, E. A. **Diagnóstico preliminar para a caracterização do processo e das condições de fabricação do queijo artesanal da Serra da Canastra-MG**. 2005. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-M.G.

- PAK, S.; SPAHR, U.; JEMMI, T.; SALMAN, M. D. Risk factors for *L. monocytogenes* contamination of dairy products in Switzerland, 1990-1999. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 53, n. 1-2, p. 55-65, 2002.
- PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; COSTA-JÚNIOR, L. C. G.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. p. 124-125.
- PEREIRA, M. L.; GASTELOIS, M. C. A.; BASTOS, E. M. A. F.; CAIAFFA, W. T.; FALEIRO, E. S. C. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 5, p. 427-431, 1999.
- PERRY, K. S. P. Queijos: Aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**. v. 27, n. 2, p. 293-300, 2004.
- PIKNOVÁ, L'; STEFANOVICOVÁ, A.; DRAHOVSKÁ, H.; SÁSIK, M.; KUČHTA, T. Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction-based method. **Food Control**, v. 13, n. 3, p. 191-194, 2002.
- PINTO, M.; BURRI S.; MENA C.; ALMEIDA G.; CARNEIRO L.; TEIXEIRA P.; GIBBS P.A. Comparison of Oxford Agar, PALCAM and *Listeria monocytogenes* Blood Agar for the recovery of *L. monocytogenes* from foods and environmental samples. **Food Control**, v. 12, n. 8, p. 511-514, 2001.
- PINTO, M. S. **Diagnóstico socioeconômico, cultural e avaliação dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do queijo Minas artesanal do Serro**. 2004. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.
- PINTO, M. S. **Efeito da microbiota endógena e da nisina sobre *Listeria* sp. e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas artesanal do Serro**. 2008. 71 f. Tese

(Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

RAMOS, T. R. R.; PINHEIRO JUNIOR, J. W.; SOBRINHO, P. A. M.; SANTANA, V. L. A.; GUERRA, N. R., MELO, L. E. H.; MOTA, R. A. Epidemiological aspects of an infection by *Brucella abortus* in risk occupational groups in the microregion of Araguaína, Tocantins. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 133-138, 2008.

Regulamento (CE) nº 509/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, **relativo às especialidades tradicionais garantidas dos produtos agrícolas e dos gêneros alimentícios**. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32006R0509:PT:HTML>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho, de 20 de Março de 2006, **relativo à protecção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios**. Jornal Oficial da União Européia. Disponível em <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:093:0012:0025:PT:PDF>>. Acesso em: 16 nov. 2008.

Regulamento da Lei nº 14.185, de 31 de janeiro de 2002. **Dispõe sobre o processo de produção de queijo Minas artesanal** (Aprovado pelo decreto nº 42.645, de 5 de junho de 2002). Disponível em: <[http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros\\_documentos/42645.pdf](http://imanet.ima.mg.gov.br/nova/gce/outros_documentos/42645.pdf)>. Acesso em: 26 out. 2007.

REIS, R. B.; MAMIZUKA, E. M.; FRANCO, B. D. G. M. Produção de imunorreagentes para uso em um teste imunoenzimático de detecção de *Salmonella* em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 261-266, 2001.

- REZENDE, D. C. **Estratégias de coordenação e qualidade na cadeia dos queijos finos**. 2004. 216f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Agricultura e Sociedade) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-R.J.
- RICHARDSON, G. H. (Ed.) **Standard methods for the examination of dairy products**. 15 ed., 1985.
- ROBIN, L. T. C.; LEE, H.; HALL, J. C. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 2, p. 141-170, 2006.
- ROGGA, K. J.; SAMELIS, J.; KAKOURI, A.; KATSIARI, M. C.; SAVVAIDIS, I. N.; KONTOMINAS, M.G. Survival of *Listeria monocytogenes* in Galotyri, a traditional Greek soft acid-curd cheese, stored aerobically at 4° C and 12° C. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 1, p. 59-67, 2005.
- SAEG. **Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 9.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G., 2007.
- SÁLVIO, J. L. M. **Sobrevivência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica durante a maturação do queijo Minas**. 1993. 78 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.
- SAROJ, S. D.; SHASHIDHAR, R.; KARANI, M.; BANDEKAR, J. R. Rapid, sensitive, and validated method for detection of *Salmonella* in food by an enrichment broth culture – nested PCR combination assay. **Molecular and Cellular Probes**, In Press, 2008.
- SCHÖNENBRÜCHER, V.; MALLINSON, E. T.; BÜLTE, M. A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating media. **International Journal of Food Microbiology**, n. 123, n. 1-2, p. 61-66, 2008.

- SILBERNAGEL, K. M.; CARVER, C. N.; JECHOREK, R. P.; JOHNSON, R. L. Method for the detection of *Listeria monocytogenes* in Foods: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 5, p. 903-918, 2004.
- SILVA, C. S. F. **Preparo e avaliação de material de referência de *Salmonella*. Dissertação (Mestrado)**. 2008. 107f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - M.G.
- SILVA, D. G.; FAGLIARI, J. J.; GARCIA, T. B. Comparação da eficiência dos caldos de enriquecimento seletivo no isolamento de *Salmonella* Dublin. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n.3, p.766-768, 2008.
- SILVA, M. C. M.; SOUSA, R. M. C. A versão simplificada do *Therapeutic Intervention Scoring System* e seu valor prognóstico. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 38, n. 2, p. 217-224, 2004.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, F. A. N.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 536p.
- SOUZA, C. F. V.; ROSA, T. D.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 260-266, 2003.
- SPERBER, W. H.; DEIBEL, R. H. Accelerated Procedure for Salmonella Detection in Dried Foods and Feeds Involving Only Broth Cultures and Serological Reactions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 533-539, 1969.
- SPRONG, R. C.; HULSTEIN, M. F. E.; VAN DER MEER, R. Bactericidal Activities of Milk Lipids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1298-1301, 2001.
- TAPCHASRI, P.; WANGROONGSARB, P.; PANBANGRED, W.; CHONGSANGUAN, M.; SRIMANOTE, P.; KURAZONO, H.; HAYASHI, H.;

- CHAICUMPA, W. Detection of *Salmonella* contamination in food samples by dot-ELISA, DNA amplification and bacterial culture. **Asian Pacific Journal Allergy Immunology**, v. 17, n.1, p.41-51, 1999.
- THOMASON, B. M. Rapid detection of *Salmonella* microcolonies by fluorescent antibody. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 1064-1069, 1971.
- VALENTINI, S. R.; SOMMER, W. A.; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.
- VANEGAS, M. C.; VÁSQUEZ, E.; MARTINEZ, A. J.; RUEDA, A. M. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 430-432, 2009.
- VAZ-VELHO, M.; DUARTE, G.; GIBBS, P. Evaluation of mini-VIDAS rapid test for detection of *Listeria monocytogenes* from production lines of fresh to cold-smoked fish. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 147-151, 2000.
- VIEIRA-PINTO, M.; OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F.; MARTINS, C. Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent *in situ* hybridization: a comparison with VIDAS<sup>®</sup>-SLM system and ISO 6579 cultural method. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1388-1393, 2007.
- VITAS, A. I.; AGUADO, V.; GARCIA-JALON, I. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 90, n. 3, p. 349-356, 2003.
- VLAEMYNCK, G.; LAFARGE, V.; SCOTTER, S. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 3, p. 430-441, 2000.

VON RÜCKERT, D. A. S. **Comparação dos métodos microbiológico convencional, imunoanálise e reação da polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* sp. em frangos durante o abate.** 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-M.G.

VON RÜCKERT, D. A. S.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; MORAES, M. P.; SILVA-JUNIOR, ABELARDO, NERO, L. A. Assessment of conventional detection method, immunoanalysis and polymerase chain reaction for *Salmonella* spp. monitoring in chicken. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, v. 16, n. 2, p. 185-195, 2008.

WALKER, R. L.; KINDE, H.; ANDERSON, R. J.; BROWN, A. E. Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using Moore swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, n. 1-2, p. 123-129, 2001.

YEH, K.; TSAI, C. E.; CHEN, S. P.; LIAO, C. W. Comparison between VIDAS automatic enzyme-linked fluorescent immunoassay and culture method for *Salmonella* recovery from pork carcass sponge samples. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 10, p. 1656-1659, 2002.

YOUSEF, A. E. & MARTH, E. H. DAIRY FOODS: Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Parmesan Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 12, p. 3351-3356, 1990.